



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL TOXICIDADE DE UMA NANOEMULSÃO  
CONTENDO QUERCETINA EM RIM E FÍGADO DE RATOS *WISTAR***

Camila de Oliveira Vian

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

Co-orientador Msc. Magno da Silva Marques

Monografia apresentada como requisito  
da Disciplina de Trabalho de Graduação  
II - 15125 - do Curso de Bacharelado  
em Ciências Biológicas.

Rio Grande, 2017.

## **Agradecimentos**

Em primeiro momento agradeço aos meus pais, que por mais que sejam separados desde os meus quatro anos de idade, ambos me deram muitas forças. Claro, cada um com seu jeito diferente de se preocupar e demonstrar amor, porque realmente não tenho e não vejo a minha família como aquele padrão de filmes de famílias bem estruturadas e certinhas, contudo, são as únicas pessoas no qual eu seria, no momento, incapaz de viver sem. Quando penso neles, enxergo da seguinte forma: Meu pai sempre foi um cara mais rígido, durão, não é de demonstrar muito sentimento, contudo me fez enxergar a vida com lado mais da razão, me preparando para os tombos, os erros, os acertos da vida, ensinou-me sempre a ter responsabilidade enfim, orientando-me a ser adulta. Lembro-me da seguinte frase, “filha eu não estou te criando para tu estagnares no tempo com um emprego “meia boca”, quero te ver crescendo cade vez mais, e ter uma vida muito melhor da que eu tenho hoje, tendo oportunidades melhores do que eu tive”. E é claro, esse era e sempre foi o jeito dele de dizer eu te amo. Admiro muito essa pessoa o qual se chama ITAMAR VIAN, uma pessoa honesta, que me apoiou em muitos aspectos ao longo desta jornada (muitos mesmo), no qual antigamente não tínhamos essa relação e esse laço de pai e filha que construímos hoje. SOU GRATA POR TUDO PAI VOCÊ É MEU HERÓI E MEU MELHOR AMIGO.

Já minha mãe ROSANGELA OLIVEIRA é meu lado sentimental, meu lado cuidadoso, ansioso e preocupado que me faz enxergar a vida com mais amor e fragilidade, que manteve seu apoio sempre que pode com os mais sinceros conselhos, ajudando a amenizar minhas gastrites, minhas fobias sociais, e inúmeras outras coisas que desencadeei durante a graduação. Minha melhor amiga quem mais sabe sobre minha vida depois de Deus. Quero que saibam que amo muito vocês, e jamais chegaria até aqui sem as suas forças, meu lado RAZÃO e o meu lado EMOÇÃO.

Além disso, agradeço minha vó LUIZA e minha irmã PRISCILA que se mantiveram presentes sempre nos melhores e piores momentos da minha vida, amo muito vocês.

A Universidade Federal do Rio Grande-FURG e professores pela oportunidade, paciência, por todo o comprometimento com os alunos e com a ciência.

A CNPq pela bolsa de iniciação científica e todo o conhecimento.

A minha orientadora e amiga prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ANA PAULA HORN por toda a paciência, dedicação e comprometimento, muito obrigada por tudo. Você tem a minha admiração e respeito como pessoa e profissional.

Ao meu Co-orientador Msc. MAGNO MARQUES aquele irmão de alma que a FURG me deu, o qual nunca mediu esforços quando precisei de sua ajuda. Com seu jeito tímido, que engana bem, porque no fundo tem um cara muito extrovertido, honesto, assíduo, uma grande pessoa, que eu admiro toda sua batalha, trajetória de vida e inteligência, o qual terá um futuro brilhante, em quem me espelho muito.

Ao meu amigo MARCELO MARINHO que junto ao Magno faz parte do nosso grupo dos três “ermões”. Com seu jeito meigo, carinhoso, atencioso, amigo que se manteve sempre disposto a ajudar não medindo esforços. Admiro sua inteligência, organização e empenho com os estudos no qual também me espelho muito.

Agradeço também LETICIA FISS, a qual entrou a pouco em nosso grupo de pesquisa, mas com seu jeito prestativa e assídua, ajudou-me muito e sempre me encorajou de que tudo ia dar certo. Gratidão.

Agradeço todos aqueles outros amigos que a graduação me deu que levarei para a vida inteira, no qual me apoiaram muito. São eles: JADE RIET, PAULA ARAUJO, CAROLINE SOUTO, STEFANIE TEXEIRA, JESSIKA LOPES, MAYCON PINHEIRO, CHAELEN RODRIGUES, FRANCINE GRILLO. Vocês fizeram com que meus dias ficassem mais fáceis, mais divertidos e também mais sérios e responsáveis quando necessário. Gratidão.

**Por fim, agradeço a DEUS por eu existir, e peço perdão por todas minhas falhas.**

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	05
<b>Resumo</b> .....	06
<b>Abstract</b> .....	07
<b>Introdução Geral</b> .....	08
1.1 Hemorragia intracerebral.....	08
1.2 Vias de administração de fármacos.....	09
1.3 Quercetina.....	10
1.4 Nanocarreadores.....	11
1.5 Metabolismo de excreção.....	12
<b>Objetivos (gerais e específicos)</b> .....	15
<b>Artigo</b> .....	16
Resumo .....	16
Palavras chave .....	16
Introdução .....	17
Materiais e métodos.....	18
Resultados.....	20
Discussão .....	23
Agradecimentos .....	24
Referências .....	24
<b>Considerações finais</b> .....	28
<b>Referências bibliográficas</b> .....	29

**Lista de abreviaturas**

AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
CEUA	Comitê de ética em uso animal
H+B.N	Grupo hemorragia + tratamento com nanoemulsão sem o fármaco via IN
H+B.P	Grupo hemorragia + tratamento com nanoemulsão sem o fármaco via IP
H+Q.N	Grupo hemorragia + tratamento com nanoemulsão de quercetina via IN
H+Q.P	Grupo hemorragia + tratamento com nanoemulsão de quercetina via IP
HE	Hematoxilina e eosina
HI	Hemorragia intracerebral
HM	Grupo controle somente hemorragia
IN	Intranasal
IP	Intraperitoneal
NE	Nanoemulsão
QU	Quercetina
SNC	Sistema Nervoso Central

## **AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL TOXICIDADE DE UMA NANOEMULSÃO CONTENDO QUERCETINA EM RIM E FÍGADO DE RATOS *WISTAR***

**Resumo:** O acidente vascular cerebral é uma das principais causas de deficiência e morte em todo o mundo. Apesar dos constantes esforços e de ensaios pré-clínicos promissores, até o momento apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis, fazendo com que a busca de novas alternativas terapêuticas seja necessária. A quercetina (QU) pertence à classe dos bioflavonoides polifenólicos e encontra-se largamente na dieta. Trabalhos recentes têm demonstrado resultados positivos da sua utilização em doenças do sistema nervoso como Parkinson, Huntington, Alzheimer e inclusive o AVC, encorajando futuros estudos clínicos com essa molécula. O encapsulamento de um fármaco num nanocarreador adequadamente formulado pode aumentar as concentrações de fármacos no parênquima cerebral, contornando as dificuldades que a barreira hematoencefálica impõe. Antes que se pense em utilizar uma formulação para estudos clínicos, análises de toxicidade são primordiais para avaliação e estudo de possíveis novos fármacos. O rim e o fígado são órgãos centrais para esses estudos, pois estão envolvidos com a metabolização e a excreção de substâncias, sendo normalmente os primeiros a serem afetados. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar análises histopatológicas em rins e fígados de ratos *Wistar* tratados com quercetina em nanoemulsão por duas vias de administração diferentes: intraperitoneal (IP) e intranasal (IN), assim como avaliar qual das vias possui menor efeito adverso decorrente do tratamento. Para tal investigação, foi realizado um modelo de cirurgia estereotáxica para indução da hemorragia intracerebral em ratos *Wistar*. A seguir, os animais foram tratados com 4 administrações da nanoemulsão de QU (2, 24, 48 e 72 h) por duas vias (intraperitoneal 30 mg/kg ou intranasal 0,25 mg/kg). Após a eutanásia, rim e fígado foram retirados, fixados, cortados e corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica. Nossos resultados sugerem que, nas doses utilizadas, nas duas vias e no modelo estudado, a nanoemulsão de QU não induz alterações histopatológicas perceptíveis, assim sendo um agente neuroprotetor, encorajando-nos a seguir estudando sua ação.

**Palavras-chave:** histopatologia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, intraperitoneal, intranasal, nanotecnologia.

## EVALUATION OF THE POSSIBLE TOXICITY OF A QUERCETIN-LOADED NANOEMULSION IN THE KIDNEY AND LIVER OF WISTAR RATS

**Abstract:** Stroke is one of the leading causes of disability and death around the world. Despite ongoing efforts and promising pre-clinical trials, so far only symptomatic treatments are available, making necessary the search for new therapeutic alternatives. Quercetin (QU) belongs to the class of polyphenolic bioflavonoids, and is widely found in the diet. Recent works have shown positive results of its use in nervous system diseases such as Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's and even stroke, encouraging future clinical studies with this molecule. Encapsulation of a drug in a suitable nanocarrier formulation may increase drug concentrations in the cerebral parenchyma, bypassing the difficulties that the blood-brain barrier imposes. Before a formulation is considered for clinical studies, toxicological analyzes are paramount for the evaluation and study of possible new drugs. The kidney and the liver are central organs for these studies because they are involved in the metabolism and excretion of substances and are usually the first ones to be affected. The aim of the present study was to perform histopathological analyzes in the kidneys and livers of Wistar rats treated with QU in nanoemulsion by two different routes of administration: intraperitoneal (IP) and intranasal (IN), as well as to evaluate which of the routes is associated with fewer adverse effects. For this investigation, a stereotactic surgery model was used to induce intracerebral hemorrhage in Wistar rats. Next, the animals were treated with 4 administrations of QU nanoemulsions (2, 24, 48, and 72 h) by two routes (IP or IN). After euthanasia, the kidneys and the livers were removed, fixed, cut, and stained with hematoxylin and eosin, and analyzed by light microscopy. Our results show that QU nanoemulsions do not induce perceptible histopathological alterations, and is therefore a promising neuroprotective agent.

**Key words:** histopathology, nephrotoxicity, hepatotoxicity, intraperitoneal, intranasal, nanotechnology.

## 1- Introdução Geral

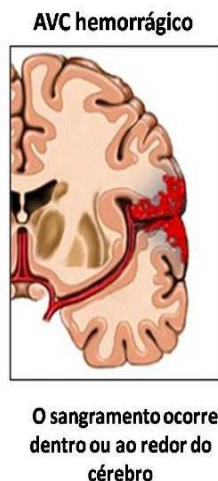
Nosso grupo de pesquisa tem como foco de estudo o acidente vascular cerebral (AVC), mais especificamente a hemorragia intracerebral (HI) e o estudo de moléculas que atuem como possíveis fármacos, a fim de amenizar o sofrimento dos pacientes acometidos por essa patologia. Na busca de efeitos colaterais desses possíveis compostos, a análise histopatológica torna-se uma ferramenta essencial para a investigação de efeitos adversos das formulações, sempre visando uma futura utilização clínica das moléculas testadas.

### 1.1 Hemorragia intracerebral

O AVC representa a terceira causa de morte em países industrializados e a primeira causa de incapacidade entre adultos (Krishnamurthi *et al.*, 2013). Além da elevada incidência, deve-se considerar as sérias consequências médicas e sociais que podem resultar de um AVC, como sequelas de ordem física, de comunicação, funcionais, emocionais, entre outras (Sacco *et al.*, 2013). Essas sequelas implicam algum grau de dependência, principalmente no primeiro ano após o AVC, com cerca de 30 a 40% dos sobreviventes são impedidos de voltarem ao trabalho e requerem algum tipo de auxílio no desempenho de atividades cotidianas básicas (Sacco *et al.*, 2013). No Brasil, apesar do declínio nas taxas de mortalidade, o AVC ainda é uma das principais causas de morte. Sua incidência após os 55 anos dobra a cada década, ocupando posição de destaque entre a população idosa, sendo a prevalência geral na população mundial estimada em 0,5 a 0,7% (Ministério da Saúde, 2007).

A HI é um dos subtipos de AVC (figura 1) que, em muitos casos, leva à morte ou é seguida de graves déficits neurológicos para os sobreviventes. Ocorre quando há um extravasamento sanguíneo para o parênquima cerebral, comumente devido à pressão arterial elevada. Apesar dos constantes esforços e de ensaios pré-clínicos promissores, até o momento apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis, fazendo com que a busca de novas alternativas terapêuticas seja necessária. Os danos nos tecidos cerebrais associados à HI envolvem perda de neurônios na região invadida pelo hematoma. Além da citotoxicidade direta dos constituintes do sangue nos neurônios, as reações inflamatórias contribuem para a indução da morte neuronal (Hijioka *et al.*, 2011).





**Figura 1:** Esquema de hemorragia intracerebral, sangramento focal de um vaso sanguíneo no interior do parênquima cerebral (Fonte: cirugianeurologica.com.mx).

Os danos nos tecidos cerebrais associados à HI envolvem morte neuronal, influenciada pelas reações inflamatórias na região do peri-hematoma, além da citotoxicidade direta dos constituintes sanguíneos na região afetada (Katsuki, 2010). As principais consequências patológicas da hemorragia intracerebral são a formação de hematoma, que se expande por horas ou até dias; a formação de edema na região afetada, que se inicia imediatamente após a ruptura do vaso e aumenta até dias após a lesão; a morte massiva de neurônios e células gliais na região afetada e a ativação glial na região do peri-hematoma, responsável por intensa resposta inflamatória local (Hijioka *et al.*, 2011).

### **1.2 Vias de administração de fármacos (intraperitoneal e intranasal)**

Neste trabalho foi utilizado para administração da molécula de quercetina as vias IN e IP, explicitadas a seguir. Existem diversas vias para administração de fármacos, como por exemplo, oral, intramuscular, subcutânea, endovenosa, intrarterial, intratecal, intraperitoneal (IP), intrapleural, intravesical, intra-retal, aplicação tópica (Bonassa & Santana, 2005). É essencial o conhecimento dos procedimentos técnicos. Compreender as ações da medicação e o modo como administrá-la de forma a incrementar seu efeito terapêutico e evitar ou minimizar seus efeitos colaterais. O conhecimento científico aplicado a esse procedimento enfatiza o fato de que há locais selecionados e apropriados para aplicação a fim de reduzir o desconforto e possíveis complicações ao paciente e que devem, portanto, ser conhecidos e respeitados (Bonassa & Santana, 2005). Existe a via de administração intranasal (IN), como um meio de fornecimento de agentes terapêuticos,

preferencialmente ao cérebro, ganhando recentemente um interesse significativo (Serralheiro *et al.*, 2015).

Os fármacos de baixo peso molecular são absorvidas pela via intraperitoneal (IP), especificamente pelos capilares fenestrados peritoneais, e chegam rapidamente à circulação sistêmica, passando primeiramente pela circulação portal e posteriormente alcançando outros órgãos (Marcon, 2011). É uma via muito utilizada em estudos pré-clínicos. Contudo, há alguns desafios em relação às terapias utilizando-se essa via, como tentar proporcionar alta concentração local de um composto por mais tempo, uma vez que em alguns casos a permanência do medicamento de pequeno peso molecular na cavidade peritoneal não é eficiente (Bajaj & Yeo 2010).

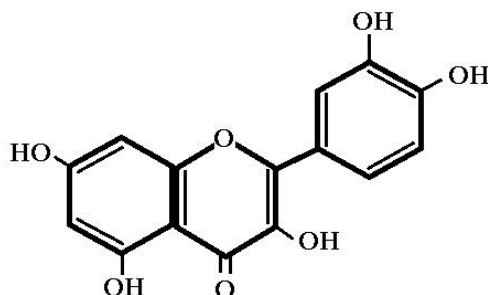
Já a administração por via intranasal (IN) consiste em usar um método considerado não invasivo para fornecer moléculas diretamente à mucosa nasal, que conecta-se com o cérebro e a medula espinhal, minimizando a exposição sistêmica. Como principal vantagem, a utilização da via IN proporciona um método não invasivo de contornar a barreira hematoencefálica (BHE) para fornecer produtos biológicos, tais como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos, vetores virais e mesmo células-tronco ao SNC (Lochhead *et al.*, 2012; Serralheiro *et al.*, 2015). Essa via tem sido vista atualmente como uma esperança para o tratamento de patologias do sistema nervoso (como o AVC hemorrágico, foco do nosso estudo). Uma das principais desvantagens dessa via é que a absorção limitada através do epitélio nasal tem restringido sua aplicação a substâncias particularmente potentes, embora isso possa ser superado, em alguns casos, pela utilização de intensificadores de permeação. Outra desvantagem é a limpeza mucociliar, que remove muito das moléculas que possuam uma permeação baixa ou mais lenta (Lochhead *et al.*, 2012; Serralheiro *et al.*, 2015).

### 1.3 Quercetina

A quercetina (QU) (3,3', 4', 5,7-penta-hidroxi-flavona) (figura 2) pertence à classe dos bioflavonoides polifenólicos e encontra-se largamente na dieta. Suas fontes principais são chá verde, cebolas, maçãs e vinho tinto (Adedara *et al.*, 2017; Chamorro *et al.*, 2016). Flavonoides como a QU vêm sendo utilizados em estudos *in vitro* e *in vivo* (Elumalai & Lakshmi, 2016). Trabalhos recentes têm demonstrado resultados positivos da utilização dela em doenças que acometem o SNC como esclerose múltipla, Parkinson, Huntington,

Alzheimer e até mesmo o AVC, devido a sua ação antioxidante e anti-inflamatória (Zhang *et al.*, 2014).

A QU segue uma via metabólica complexa, sendo absorvida pelo intestino delgado por difusão passiva ou polipeptídico orgânico transportador de ânions. Após a absorção, a QU é metabolizada no intestino delgado, intestino grosso, rim e fígado (Elumalai & Lakshmi, 2016). Estudos com tratamento por sondagem oral em camundongos com a QU observaram resultados neurotóxicos (Choi & Kim, 2010). Neste mesmo trabalho, as administrações em elevadas doses acarretou na sua acumulação no fígado, levando a efeitos colaterais. A dose de QU de 250 mg / kg foi suficiente para causar apoptose tanto no fígado como no cérebro de camundongos. A hipótese mais aceita para explicar os efeitos adversos da QU é sua atividade pró-oxidante adquirida em certas condições, pois estudos sugerem que essa atividade é decorrente da interação com íons metálicos presentes nas células e no plasma sanguíneo. Essa interação provoca uma redução da atividade antioxidante e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Choi & Kim, 2010).



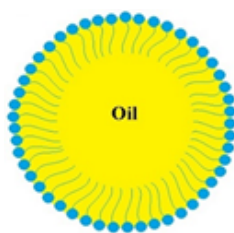
**Figura 2:** Estrutura molecular da quercetina (Fonte: <http://www.abq.org.br>).

#### 1.4 Nanocarreadores

Uma abordagem promissora para melhorar a solubilidade em água de moléculas lipofílicas, tais como a QU, consiste em incorporá-las em nanoestruturas à base de lipídios, as quais são capazes de protegê-las da degradação e melhorar a biodisponibilidade e controlar a liberação das mesmas. Dessa forma, a incorporação de um fármaco num nanocarreador adequadamente formulado pode aumentar sua concentração nas células do cérebro em comparação com fármacos sozinhos, se este nanocarreador for capaz de atravessar a BHE e atingir o parênquima cerebral. Este sucesso pode ser atribuído a funcionalidades específicas dentro do nanocarreador, que o tornam com melhor capacidade de atravessar a BHE do que o fármaco na forma livre, possuindo inúmeros benefícios em

relação aos fármacos convencionais. Dentre eles destaca-se a facilidade na absorção, aumento da biodisponibilidade e vetorização dos fármacos, possibilitando a administração de doses menores, entretanto com mais eficiência (Wen *et al.*, 2017). Com tantas vantagens, tem sido desenvolvido diferentes tipos de nanocarreadores, tais como carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), lipossomas (LS), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e as nanoemulsões (NE) (GANESAN *et al.*, 2015).

Um dos sistemas mais utilizados no qual focamos neste trabalho são as nanoemulsões óleo-em-água, que são sistemas heterogênicos estabilizados por surfactante e compostos por gotículas de óleo dispersas em água ou em meio aquoso (figura 3). Os tamanhos das gotas de óleo das nanoemulsões variam de 10 a 500 nm, tornando-os sistemas interessantes para melhorar a administração de fármacos. Além disso, as moléculas lipofílicas podem ser solubilizadas e protegidas dentro das gotículas de óleo e os métodos de produção laboratorial podem ser facilmente escalonados para um nível industrial (Hädrich *et al.*, 2016). Essa ideia de melhorar ou facilitar a administração de fármacos é bastante atraente, porém pode ser um fator preocupante em relação a toxicidade dessas formulações a outras partes do organismo, como o rim e o fígado, que são órgãos de metabolização e excreção de compostos.



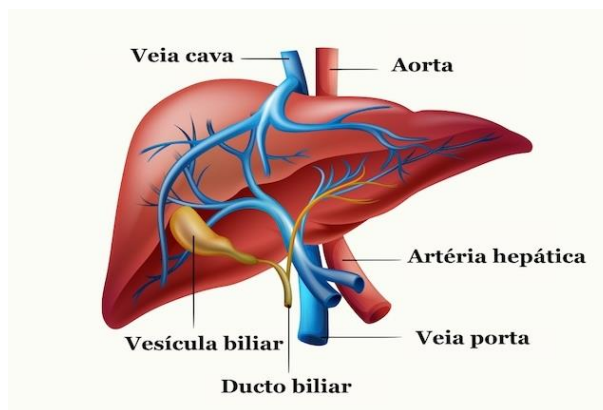
**Figura 3:** Estrutura esquemática da nanoemulsões óleo-em-água.

### 1.5 Metabolismo de excreção

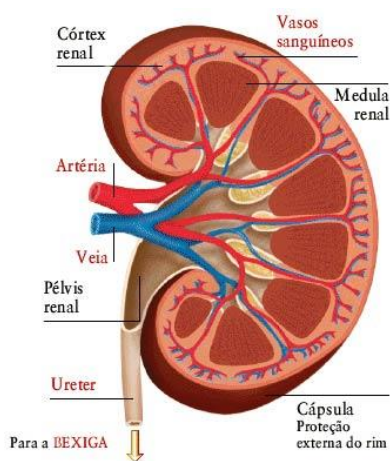
O rim e o fígado (figuras 4 e 5, respectivamente) são órgãos envolvidos com a excreção e a metabolização de fármacos, respectivamente, sendo normalmente afetados quando os mesmos apresentam toxicidade.

O fígado produz a bile, um fluido importante na digestão de gorduras e desempenha um papel essencial no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, além de inativar e metabolizar muitas substâncias tóxicas e medicamentos. Esse órgão também participa do metabolismo do ferro, síntese de proteínas do plasma sanguíneo e fatores necessários para a coagulação do sangue. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos e para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. O fígado é organizado em lóbulos hepáticos, que se caracterizam pelo agrupamento de hepatócitos (células responsáveis pela metabolização) e tecido conjuntivo propriamente dito. No centro de cada lóbulo há uma vênula centro lobular, e nos cantos estão situados os espaços porta, onde se encontra o espaço portal, formado por ramos da veia porta, da artéria hepática, vasos linfáticos e ductos biliares. É pelo espaço porta que entra o sangue vindo do trato digestório (Junqueira & Carneiro, 2013).

O rim contribui para a manutenção da homeostase, produzindo a urina, por meio da qual são eliminados diversos resíduos do metabolismo e água, eletrólitos e não eletrólitos em excesso no meio interno. Essas funções se realizam nos túbulos uriníferos, por meio de um processo complexo que envolve filtração, absorção ativa, absorção passiva e secreção (Junqueira & Carneiro, 2013). Os glomérulos são massas de capilares fenestrados, podócitos e células mesangiais, responsáveis pela filtração do sangue. O processo de filtração é realizado pela lâmina basal dos capilares e é baseado no tamanho das partículas, onde substâncias de baixo peso molecular passam livremente pelo glomérulo, enquanto substâncias de maior peso, como as proteínas plasmáticas, encontram dificuldade. Os túbulos renais têm como função recuperar as substâncias necessárias filtradas no glomérulo, e seu bom funcionamento é essencial para a manutenção hidroeletrólítica do sangue. Alterações no glomérulo e nos túbulos prejudicam tanto a filtração como a reabsorção de moléculas essenciais, levando a um desequilíbrio que pode levar à falência renal e de outros órgãos (Ross & Pawlina, 2012).



**Figura 4:** Estrutura anatômica esquemática do fígado (Fonte:tuasaude.com).



**Figura 5:** Estrutura esquemática do rim (Fonte:anatomiadocorpo.com).

Nesse contexto, nosso estudo concentrou-se em avaliar possíveis alterações histopatológicas em rins e fígados de ratos *Wistar* submetidos à HI e que foram tratados com nanoemulsão de QU por duas vias de administração (IP ou IN).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar se a administração de nanoemulsão de QU possui efeitos tóxicos em rim e fígado de ratos *Wistar*.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Realizar análises histopatológicas de rins de ratos *Wistar* tratados com nanoemulsão de QU por via IP ou IN, buscando modificações histopatológicas no glomérulo, túbulo contorcido proximal e distal.

2.2.2 Realizar análises histopatológicas de fígados de ratos *Wistar* tratados com nanoemulsão de QU por via IP ou IN, buscando modificações histopatológicas no espaço porta e nos cordões de hepatócitos.

2.2.3 Avaliar qual das vias possui menor efeito adverso em rim e fígado de ratos *Wistar* decorrente do tratamento com quercetina em nanoemulsão.

**Manuscrito:** Está nas normas do periódico [Nanotechnology](#)

## **AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL TOXICIDADE DE UMA NANOEMULSÃO CONTENDO QUERCETINA ADMINISTRADA POR DUAS VIAS (INTRAPERITONEAL OU INTRANASAL) EM RINS E FÍGADOS DE RATOS *WISTAR***

C O Vian<sup>1,2\*</sup>, M S Marques<sup>2,3</sup>, M A G Marinho<sup>2,3</sup>, M F Cordeiro<sup>2,3</sup>, C L Dora<sup>4,5</sup>, Leticia Fiss<sup>1,3</sup>, G R Vaz<sup>4,5</sup> e A P Horn<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Histologia, <sup>2</sup>Laboratório de Neurociências, <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, <sup>5</sup>Laboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96203-900, Brasil.

**Autor correspondente:** \*Camila de Oliveira Vian - Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Av. Itália, Km 8 - Rio Grande, RS, 96210-900, Brasil. telefone: +55 53 981324034, e-mail: [camilavianbio@gmail.com](mailto:camilavianbio@gmail.com)

**Resumo:** O acidente vascular cerebral é uma das principais causas de deficiência e morte em todo o mundo. Apesar dos constantes esforços e de ensaios pré-clínicos promissores, até o momento apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis, fazendo com que a busca de novas alternativas terapêuticas seja necessária. A quercetina (QU) pertence à classe dos bioflavonoides polifenólicos e encontra-se largamente na dieta. Trabalhos recentes têm demonstrado resultados positivos da sua utilização em doenças do sistema nervoso como Parkinson, Huntington, Alzheimer e inclusive o AVC, encorajando futuros estudos clínicos com essa molécula, contudo existe uma problemática relacionado a sua utilização clínica devido a sua baixa biodisponibilidade. O encapsulamento de um fármaco num nanocarreador adequadamente formulado pode aumentar as concentrações de fármacos no parênquima cerebral, contornando as dificuldades que a barreira hematoencefálica impõe. Antes que se pense em utilizar uma formulação para estudos clínicos, análises de toxicidade são primordiais para avaliação e estudo de possíveis novos fármacos. O rim e o fígado são órgãos centrais para esses estudos, pois estão envolvidos com a metabolização e a excreção de substâncias, sendo normalmente os primeiros a serem afetados. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar análises histopatológicas em rins e fígados de ratos *Wistar* tratados com quercetina em nanoemulsão por duas vias de administração diferentes: intraperitoneal (IP) e intranasal (IN), assim como avaliar qual das vias possui menor efeito adverso decorrente do tratamento. Para tal investigação, foi realizado um modelo de cirurgia estereotáxica para indução da hemorragia intracerebral em ratos *Wistar*. A seguir, os animais foram tratados com 4 administrações da nanoemulsão de QU (2, 24, 48 e 72 h) por duas vias (intraperitoneal 30 mg/kg ou intranasal 0,25 mg/kg). Após a eutanásia, rim e fígado foram retirados, fixados, cortados e corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica. Nossos resultados sugerem que, nas doses utilizadas, nas duas vias e no modelo estudado, a nanoemulsão de QU não induz alterações histopatológicas perceptíveis, assim sendo um agente neuroprotector, encorajando-nos a seguir estudando sua ação.

**Palavras-chave:** histopatologia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, intraperitoneal, intranasal, nanotecnologia.



## 1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) representa a terceira causa de morte em países industrializados e a primeira causa de incapacidade entre adultos. Além da elevada incidência, sérias consequências médicas e sociais que podem resultar de um AVC, como sequelas de ordem física, de comunicação, funcionais, emocionais, entre outras (SACCO *et al.*, 2013). No Brasil, apesar do declínio nas taxas de mortalidade, ainda é uma das principais causas de morte. A incidência de AVC após os 55 anos dobra a cada década, ocupando posição de destaque entre a população idosa, sendo a prevalência geral na população mundial estimada em 0,5 a 0,7% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Um dos subtipos de AVC é a hemorragia intracerebral (HI) que em muitos casos, leva à morte ou é seguida de graves déficits neurológicos para os sobreviventes. Ocorre quando acontece extravasamento sanguíneo para o parênquima cerebral, comumente devido à pressão arterial elevada. Apesar dos constantes esforços e de ensaios pré-clínicos promissores, até o momento apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis, fazendo com que a busca de novas alternativas terapêuticas seja necessária (HIJOKA *et al.*, 2011).

Em busca de novas alternativas de tratamento, flavonoides como a quercetina (QU) vêm sendo utilizados em estudos *in vitro* e *in vivo* em trabalhos recentes, nos quais têm demonstrado resultados positivos após utilização em doenças do sistema nervoso como esclerose múltipla, Parkinson, Huntington, Alzheimer e inclusive o AVC. Esses resultados são atribuídos a sua ação antioxidante e anti-inflamatória (ZHANG *et al.*, 2014). Estudos com tratamento por gavagem oral em camundongos com a QU obtiveram resultados neurotóxicos em altas concentrações, pois a administração dela em uma dose elevada leva à sua acumulação no fígado, acarretando efeitos colaterais. A dose de QU de 250 mg / kg foi suficiente para causar apoptose tanto no fígado como no cérebro de camundongos (CHOI & KIM, 2010). Além disso, um dos fatores mais investigados para os efeitos adversos da QU é sua atividade pró-oxidante adquirida em certas condições. Estudos sugerem que essa atividade é decorrente da interação com íons metálicos presentes nas células e no plasma sanguíneo. Essa interação provoca uma redução da atividade antioxidante e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHOI *et al.*, 2003).

Uma abordagem promissora para melhorar a solubilidade em água de moléculas lipofílicas, tais como a QU, consiste em incorporá-los em nanoestruturas à base de lipídios, as quais são capazes de proteger o fármaco da degradação, melhorar a biodisponibilidade e controlar a liberação do mesmo. Um dos sistemas mais utilizados são as nanoemulsões óleo-em-água, que são sistemas heterogênicos estabilizados por surfactante e compostos por gotículas de óleo, dispersos em água ou em meio aquoso. Os tamanhos das gotas de óleo das nanoemulsões variam de 10 a 500 nm, tornando-os sistemas interessantes para melhorar a administração de fármacos (HÄDRICH *et al.*, 2016). Essa facilitação da absorção leva a um fator preocupante em relação à toxicidade a órgãos importantes, como o rim e o fígado, que são responsáveis pela metabolização e excreção de drogas.

Alterações nesses órgãos são importantes parâmetros a serem pesquisados, uma vez que possíveis alterações patológicas podem inviabilizar a utilização de moléculas como futuros fármacos. Nesse contexto o trabalho tem por objetivo avaliar possíveis alterações histopatológicas em rim e fígado de ratos *Wistar* submetidos à HI e tratados com nanoemulsão de QU por duas vias de administração (IP e IN).

A influência das vias de administração deve ser considerada para que o fármaco exerça seus devidos efeitos no organismo. As drogas de baixo peso molecular são absorvidas de forma eficiente pela via intraperitoneal (IP), chegando rapidamente à circulação sistêmica, passando primeiro pela circulação portal e posteriormente alcançando outros órgãos. Contudo, há alguns desafios em

relação a terapias com a via IP, como tentar proporcionar alta concentração local de um composto por mais tempo, uma vez que em alguns casos a permanência do medicamento de pequeno peso molecular na cavidade peritoneal não é eficiente (BAJAJ & YEO 2010). Já a administração por via intranasal (IN) consiste em usar um método considerado não invasivo para fornecer medicamentos, indo diretamente da mucosa nasal para o cérebro e a medula espinhal, com o objetivo de tratar transtornos do SNC, minimizando a exposição sistêmica. Uma das principais desvantagens da via é que a absorção limitada através do epitélio nasal tem restringido sua aplicação a substâncias particularmente potentes, embora isto possa ser superado pela utilização de intensificadores de permeação (LOCHHEAD *et al.*, 2012; SERRALHEIRO *et al.*, 2015). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar se a administração de nanoemulsão de QU por via IP ou IN, possui efeitos tóxicos em rim e fígado de ratos *Wistar*, através de análises histopatológicas destes órgãos.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Modelo experimental**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* heterogênicos, da colônia *Wistar*, machos, com peso de aproximadamente 290-390 g. Os animais foram mantidos em criação convencional, em condições padrão (temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade de 60-80 %, sob ciclo de 12h claro/escuro), quatro animais por caixa, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram provenientes do CREAL da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela CEUA/FURG, possuindo certificado de autorização nº 066/2015.

### **2.2 Indução da hemorragia intracerebral**

Os animais foram anestesiados utilizando uma injeção intraperitoneal de cetamina (90 mg/kg) e xilasina (13 mg/kg) e foram colocados no aparelho para cirurgia estereotáxica. A HI foi induzida por injeção de colagenase tipo VII (Sigma), nas coordenadas referentes ao estriado do animal (3 mm médio-lateral; 0 mm ântero-posterior e 5 mm ventral a partir de Bregma), local cuja ocorrência de AVC é maior (PAXINOS; WATSON, 2013). A dose de colagenase administrada foi de 0,23 U em 2  $\mu\text{L}$  de solução salina (AHMAD *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2007; LEKIC *et al.*, 2011). Imediatamente após o procedimento, os animais receberam a administração subcutânea de meloxicam 2 mg/kg para analgesia (ANTUNES, 2013).

### **2.3 Desenvolvimento e caracterização dos nanocarreadores contendo quercetina**

Os nanocarreadores contendo quercetina foram desenvolvidos em colaboração com a Dra. Cristiana Lima Dora do Laboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde da FURG. Os nanocarreadores lipídicos foram preparados pelo método de difusão do solvente a quente associado a técnica de temperatura de inversão de fases. Ao término do processo em gotículas extremamente pequenas, em torno de 20 nm, contendo 1,5 mg/ml de QU foram produzidas. O tamanho diminuto relevante no que se refere a passagem nariz-cérebro (DORA, 2010).

## 2.4 Tratamento com quercetina nanoencapsulada

A dose de QU a ser administrada pela via IP foi de 30 mg/kg, dose demonstrada por Ahmad e colaboradores 2011 e por Galho e colaboradores 2016 como mostrando efeito neuroprotetor tanto para isquemia oclusiva como para hemorragia intracerebral (AHMAD *et al.*, 2011; GALHO *et al.*, 2016). Já a dose de QU administrada por via IN foi de 0,25 mg/kg, correspondendo a aproximadamente 50  $\mu$ L, sendo 25  $\mu$ L aplicados em cada narina (HANSON *et al.*, 2009). A nanoemulsão sem o composto (nano “branca”) ou a nanoemulsão contendo QU foram administradas nos animais por via intraperitoneal ou por via intranasal, 1 vez ao dia, durante 3 dias, iniciando-se 2 horas após a indução da HI.

## 2.5 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais (Tabela 1).

**Tabela 1:** Grupos experimentais.

Nº animais*	Grupos	Tratamentos
9	HM	Hemorragia Somente (controle)
9	H+B.P	Hemorragia + Nano Branca (intraperitoneal)
9	H+B.N	Hemorragia + Nano Branca (Intranasal)
9	H+Q.P	Hemorragia + Nano Quercetina (intraperitoneal)
9	H+Q.N	Hemorragia + Nano Quercetina (Intranasal)

\* Nº total 45.

## 2.6 Preparo das lâminas histológicas

A eutanásia dos animais ocorreu 3 dias após a lesão, utilizando-se uma injeção letal de tiopental sódico (100 mg/Kg) (ARTWOHL *et al.*, 2006). Após, rim e fígado foram retirados, fixados por um período de 8 horas com formol 10% e logo após armazenados em álcool 70%. Os órgãos foram desidratados, emblocados com Paraplast® (Sigma) e cortados a 6  $\mu$ m em micrótomo. As lâminas resultantes foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente fotografadas em microscópio óptico (Olympus BX51 câmera acoplada DP72).

## 2.7 Avaliação da toxicidade em rins e fígados:

Os parâmetros avaliados para o rim e o fígado estão especificados nas respectivas tabelas abaixo 2 e 3, segundo a metodologia de RHODEN *et al.* (2000); CARVALHO *et al.* (2007) e KUHNEL (2010). Todas as análises foram acompanhadas pela patologista Leticia Fiss.

A intensidade das características histopatológicas, para ambos os órgãos, foi expressa em graduações (0 a 3), obtidas através da média de três campos microscópios aleatórios, sendo avaliados em aumento de 200x, considerando-se a seguinte graduação:

- 0: ausência de alterações;
- 1: alterações de intensidade leve (menos de 25% do campo analisado);
- 2: alterações de intensidade moderada (25 a 50 % do campo analisado);
- 3: alterações de intensidade severa (mais de 50% do campo analisado).

**Tabela 2:** Características histológicas analisadas para rim.

<b>Características histológicas para padrão considerado normal do rim</b>	
Corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros	Alças de Henle íntegras e túbulos/ductos coletores com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico
Glomérulos formados por capilares íntegros	Cápsula de Bowman íntegra
Podócitos, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas	Presença de células cúbicas ou poliédricas, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleo arredondado

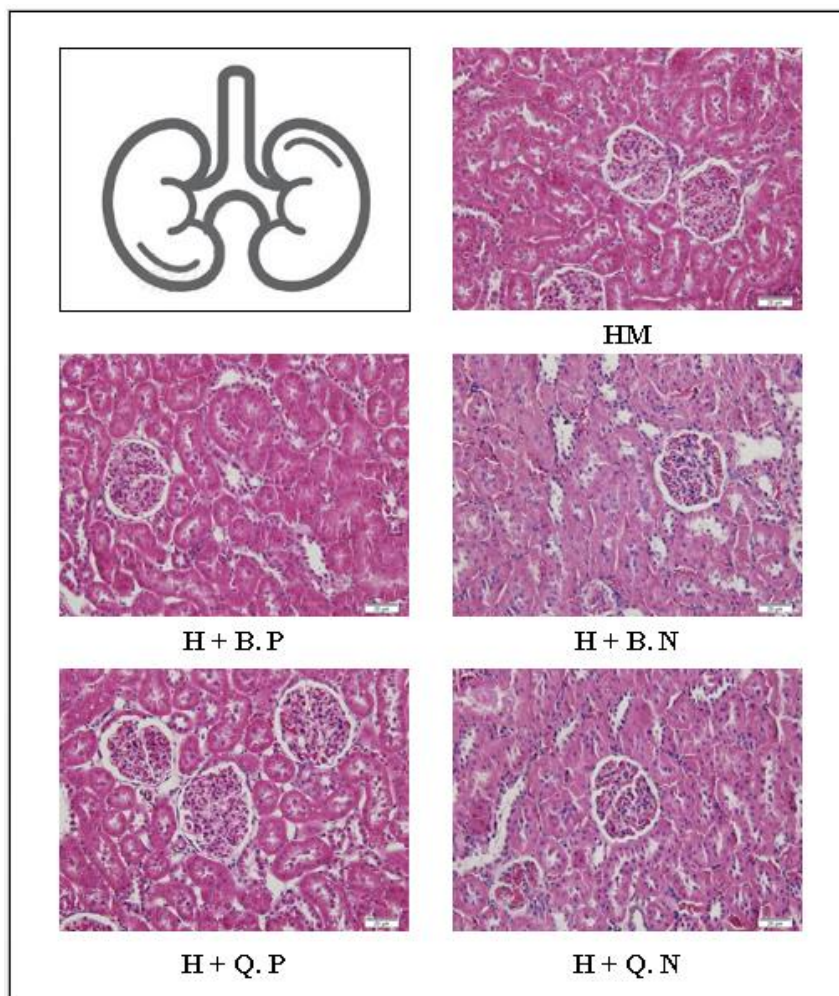
**Tabela 3:** Características histológicas analisadas para fígado.

<b>Características histológicas para padrão considerado normal do fígado</b>	
Lóbulos hepáticos íntegros	Espaço porta íntegro
Vênula centro-lubular sem alterações	Hepatócitos sem alterações histológicas

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação das características histopatológicas em rim.

Foi realizada a análise histopatológica nos rins dos animais tratados com QU em nanoemulsão após sofrerem HI. Morfologicamente, não foram encontradas quaisquer alterações, apresentando padrão de normalidade para a observação em microscopia óptica (figura 1 e tabela 4). Foram visualizados corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais (na cortical), ductos coletores e alça de Henle (na medular) típicos (tabela 2).



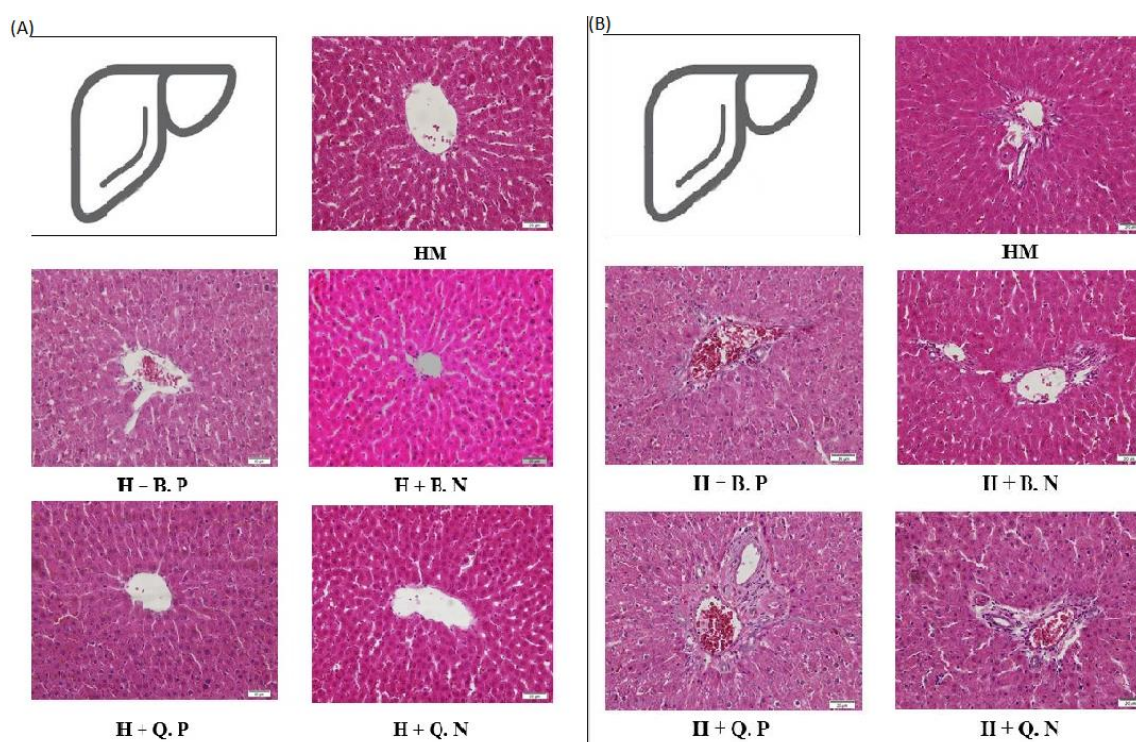
**Figura 1.** Imagens representativas de rins de ratos mostrando cápsula de Bowman e túbulos contorcidos proximais e distais. Grupos: HM; H+B.P; H+B.N; H+Q.P; H+Q.N, respectivamente, hemorragia (controle); hemorragia + nanobranca (IP); hemorragia + nanobranca (IN); hemorragia + nanoquercetina (IP); hemorragia + nanoquercetina (IN). Coloração: hematoxilina/eosina, aumento 400x.

**Tabela 4.** Alterações histopatológicas em rim de ratos tratados com nanoemulsão de quercetina.

Tratamentos	Córtex			Medula	
	Cápsula Bowman	Glomérulo	Túbulo contorcido (proximal e distal)	Alça de Henle	Túbulo coletores
HM	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)
H + B.P	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)
H + B.N	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)
H + Q.P	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)
H + Q.N	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)

### 3.2 Avaliação das características histopatológicas em fígado.

Foi realizada a análise histopatológica nos fígados dos animais tratados com QU em nanoemulsão após sofrerem HI. Morfologicamente, não foram encontradas quaisquer alterações perceptíveis à microscopia óptica em nenhum dos grupos estudados (figura 2 e tabela 5). Foram visualizados facilmente os lóbulos hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineadas. Os hepatócitos formavam cordões confluentes para a veia centro-lobular (figura 2). A presença de um grau leve de esteatose foi observada em todos os grupos estudados, não sendo relacionada ao tratamento com a QU.



**Figura 2.** Imagens representativas de fígados de ratos mostrando veia centro-lobular e cordão de hepatócitos (A) e espaço porta (B). Grupos: HM; H+B.P; H+B.N; H+Q.P; H+Q.N, respectivamente, hemorragia (controle); hemorragia + nanobranca (IP); hemorragia + nanobranca (IN); hemorragia + nanoquercetina (IP); hemorragia + nanoquercetina (IN). Coloração: hematoxilina/eosina, aumento 400x.

**Tabela 5.** Alterações histopatológicas em fígado de ratos tratados com nanoemulsão de quercetina.

Tratamentos	Veia centrolobular		Espaço-porta	
	Necrose	Esteatose	Necrose	Esteatose
HM	0 (9)	1 (9)	0 (9)	1 (9)
H + B.P	0 (9)	2 (9)	0 (9)	0 (9)
H + B.N	0 (9)	3 (9)	0 (9)	1 (9)
H + Q.P	0 (9)	2 (9)	0 (9)	0 (9)
H + Q.N	0 (9)	2 (9)	0 (9)	0 (9)



## 4 DISCUSSÃO

Utilizamos em nosso trabalho duas vias de administração (IP e IN) afim de elucidar se alguma delas apresentaria possível toxicidade e em qual delas os efeitos adversos seriam mais proeminentes. Não encontramos alterações em nenhum dos grupos estudados tanto os tratados por via IP quanto IN o que sugere possível segurança da QU nessa dose, para os parâmetros avaliados.

Revisando-se a literatura sobre o tema, muitos são os estudos que falam sobre a QU e o seu potencial farmacológico, contudo são poucos os trabalhos que investigam o seu potencial tóxico para o organismo. A utilização de flavonoides como a QU vem sendo amplamente utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo* (ELUMALAI; LAKSHMI, 2016; POGAČNIK *et al.*, 2016). Trabalhos recentes têm demonstrado resultados positivos da utilização dela em doenças decorrentes do sistema nervoso como esclerose múltipla, Parkinson, Huntington, Alzheimer e HI (AY *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2017; PLEMEL *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Reafirmando seu potencial farmacológico temos o estudo de Galho e colaboradores (2016) que compararam os efeitos da nanoemulsão contendo QU com a sua forma livre em um modelo de HI em ratos induzido por colagenase. Estes foram tratados com uma única dose IP de QU (forma livre ou nanoemulsão) e obtiveram redução no tamanho do hematoma dos animais tratados tanto com a forma livre como a que foi incorporada em nanoemulsões, mas quando avaliado o efeito antioxidante, o grupo nanoemulsionado obteve aumento nesse efeito, refletindo assim, em resultados de testes comportamentais realizados (GALHO *et al.*, 2016).

Assim como a maior parte dos compostos tóxicos que conhecemos, a QU é metabolizada pelo fígado e excretada pelo rim. Assim sendo, estes órgãos estão vulneráveis aos seus possíveis efeitos tóxicos e esse potencial efeito adverso deve ser investigado. Nossos resultados mostraram não haver alterações histopatológicas em rim e fígado de ratos *Wistar* tratados com QU nanoemulsionada (figuras 1 e 2, tabelas 2 e 3) nas nossas condições experimentais. Bona e colaboradores em 2010, utilizaram QU com dose 50 mg/Kg pela via intraperitoneal no tratamento de cirrose e demonstraram sua ação hepatoprotetora, avaliando a diminuição nos níveis séricos de marcadores de lesão no fígado. Ainda, uma redução da presença de nódulos fibróticos foi observada, concluindo-se que houve uma melhora funcional dos hepatócitos, concordando com nossos resultados, no qual utilizamos a mesma via, não havendo toxicidade. (BONA 2010).

Gomes e colaboradores (2010) trouxeram em seus estudos as vantagens da terapia nutricional com a QU, detectando efeitos da melhora na função renal, pelo aumento de creatinina, diminuição da proteinúria e importante redução da incidência de hipertrofia renal. Evidenciando o papel protetor renal deste flavonóide contra os danos provocados pela diabetes nas células do túbulo renal, foram tratados com 10 mg/kg de QU livre, por via oral, diariamente, durante 4 semanas (GOMES 2010). Já em nosso trabalho analisamos características histopatológicas em lâminas de rim e fígado de animais tratados com QU em nanoemulsão nas concentrações de 30 mg/Kg e 0,25 mg/Kg e não encontramos quaisquer alterações observáveis a microscopia óptica, corroborando assim, com os autores acima e com Hädrich e colaboradores que tiveram resultados que demonstraram que a nanoemulsão contendo QU pela via oral na concentração de 20 mg/kg durante cinco dias de tratamento, reduziu significativamente o edema na pata de ratos. Isso provavelmente deve-se à redução de ativação NF- $\kappa$  B caminho no qual a QU pode inibir NF- $\kappa$ B atuando assim como antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica. Além disso, a mesma nanoemulsão não mostrou efeitos tóxicos. Trazendo indícios novamente de que ela possui uma aplicação potencial no tratamento de doenças inflamatórias (HÄDRICH *et al.*, 2016).

No entanto, alguns pontos de esteatose foram observados no fígado dos animais (inclusive no grupo controle), no qual acreditamos ser pelas características da ração com o qual os animais são alimentados, não sendo assim, pelos tratamentos. Além da composição rica em gordura da ração, a mesma é fornecida *ad libitum* no biotério setorial, o que não é mais recomendado pelos guias de bem-estar animal. Nos próximos experimentos atentaremos para esse aspecto, fornecendo apenas a ração que supra a necessidade diária dos animais.

Mostramos em nosso trabalho que a formulação da nanoemulsão descrita por Dora e colaboradores (DORA 2010) não causou efeitos adversos visíveis aos órgãos investigados. Resultados semelhantes foram observados por Luz e colaboradores em 2014, no qual demonstraram que as formulações de QU livre nas doses administradas de 30 mg/kg via intraperitoneal durante 4 dias, não foram capazes de causar danos no fígado de ratos. Além disso, o estudo também demonstrou que a QU livre não alterou o funcionamento renal, medido através dos testes de creatinina e ureia 500. Este trabalho demonstrou, através de testes bioquímicos e histopatológicos, que as formulações de QU livre nas doses testadas não foram capazes de causar danos no fígado de ratos. Os níveis de AST/ALT (resultados obtidos por testes de dano hepático) mantiveram-se semelhantes aos grupos controles (LUZ 2014).

Os resultados obtidos até o momento sugerem que, nas doses, vias e no modelo estudado, a QU nanoemulsionada não induz alterações histopatológicas perceptíveis, sendo está pouco tóxica para rins e fígado. Portanto, um potencial composto a ser estudado como agente neuroprotetor.

## 5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CNPq PROCAD (nº. 552457/2011-6) e UNIVERSAL (nº 447828/2014-2).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. *et al.* Quercetin Protects Against Oxidative Stress Associated Damages in a Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Neurochemical Research*, ago. +2011. v. 36, n. 8, p. 1360–1371.

ANTUNES, M. F. Investigação do efeito de analgésicos no pós-operatório de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de hemorragia intracerebral. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 2013. Dissertação de Mestrado.

ARTWOHL, J. *et al.* Report of the ACLAM Task Force on Rodent Euthanasia. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2006. v. 45, n. 1, p. 98–105.

AY, M. *et al.* Molecular mechanisms underlying protective effects of quercetin against mitochondrial dysfunction and progressive dopaminergic neurodegeneration in cell culture and MitoPark transgenic mouse models of Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, jun. 2017. v. 141, n. 5, p. 766–782.

BAJAJ, G.; YEO, Y. Drug Delivery Systems for Intraperitoneal Therapy. *Pharmacological Research*, 2010. v. 28, n. 5, p. 735–738.



BONA, S. Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CARVALHO, ADELINO, M, SIMÕES, RICARDO, S, OLIVEIRA, FÁBIO H. 2007. Análise morfológica dos fígados e rins no binômio materno-fetal após tratamento de ratas prenhez com Ritovanir durante toda a prenhez. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v.29, nº7, 348-353.

CHOI EJ, KIM G-H. 2010. Quercetin accumulation by chronic administration causes the caspase-3 activation in liver and brain of mice. *BioFactors*, 36(3):216–221.

CHOI EJ, CHEE K-M, LEE BH. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol*. 2003;482(1-3):281–285. doi:10.1016/j.ejphar.2003.09.067.

DORA, C. Nanocarreadores lipídicos contendo quercetina: desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica *in vivo*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. Tese de Doutorado.

ELUMALAI, P.; LAKSHMI, S. Role of Quercetin Benefits in Neurodegeneration. *In: ESSA, M. M.; AKBAR, M.; GUILLEMIN, G. (Org.). The Benefits of Natural Products for Neurodegenerative Diseases*. Cham: Springer International Publishing, 2016, V. 12, p. 229–245. DOI: 10.1007/978-3-319-28383-8\_12.

JUNQUEIRA, LC, CARNEIRO, J. 2013, *Histologia Básica – texto e atlas*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap 16: 318-128p; cap 19: 368-380p.

GALHO, A. R. *et al.* Protective role of free and quercetin-loaded nanoemulsion against damage induced by intracerebral haemorrhage in rats. *Nanotechnology*, 29 abr. 2016. v. 27, n. 17, p. 175101.

GALHO, A. R. *et al.* Protective role of free and quercetin-loaded nanoemulsion against damage induced by intracerebral haemorrhage in rats. *Nanotechnology*, 29 abr. 2016. v. 27, n. 17, p. 175101.

GOMES, I.B.S. Efeito do tratamento com quercetina sobre a nefropatia diabética em camundongos ateroscleróticos. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

HÄDRICH, G, VAZ, GR, MAIDANA, M, et al. 2016. Anti-inflammatory effect and toxicology analysis of oral delivery quercetin nanosized emulsion in Rats. *Pharmaceutical Research*. v. 33, n. 4.

HANSON, L. R. *et al.* Intranasal Deferoxamine Provides Increased Brain Exposure and Significant Protection in Rat Ischemic Stroke. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1 set. 2009. v. 330, n. 3, p. 679–686.

HIJIOKA, M, MATSUSHITA, H, HISATSUNE, A, et al. 2011. Therapeutic Effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 338, n. 3, p. 741–749.

KIM, M. *et al.* Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, dez. 2007. v. 1770, n. 12, p. 1627–1635.

KUHNEL, W. 2010. *Histologia Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Editora Artmed.

LEKIC, T. *et al.* Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage. *Experimental Neurology*, jan. 2011. v. 227, n. 1, p. 96–103.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, maio. 2012a. v. 64, n. 7, p. 614–628.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2007: uma análise da situação de saúde. *In: COORDENAÇÃO GERAL DE INFORMAÇÃO E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA – CGIAE*, 2008, Brasília-Brasil. Anais eletrônicos... Brasília-Brasil: Editora MS, 2008. V. 1, p. 641. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_brasil\\_2007.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2007.pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2017.

MORENO, L. C. G. E I. *et al.* Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. *International Journal of Pharmaceutics*, jan. 2017. v. 517, n. 1–2, p. 50–57.

LUZ, D. C. Investigação dos possíveis efeitos adversos da quercetina livre e nanoencapsulada no fígado e no rim de ratos *Wistar*. 2014. n° 42. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio grande – FURG. Instituto de Ciências Biológicas.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7. ed. USA: Academic Press, 2013.

PLEMEL, J. R. *et al.* Over-the-counter anti-oxidant therapies for use in multiple sclerosis: A systematic review. *Multiple Sclerosis Journal*, 2015. v. 21, n. 12, p. 1485–1495.

POGAČNIK, L. *et al.* Potential for brain accessibility and analysis of stability of selected flavonoids in relation to neuroprotection in vitro. *Brain Research*, nov. 2016. v. 1651, p. 17–26.

ROHDEN, EL, LIMA, LP, RHODEN, CR, et al. 2000. Análise das alterações histopatológicas dos fígados de ratos pré-tratados com Alopurinol e submetidos à isquemia: reperfusão hepática. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro, v. 27, n°6, 373-377.

ROSS, MH & PAWLINA, W. 2012. Sistema Urinário. *In: Histologia Texto e Atlas*. Guanabara Koogan Ltda. pág:710–751.

SACCO, R. L. *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*, 1 jul. 2013. v. 44, n. 7, p. 2064–2089.

SERRALHEIRO, A. *et al.* Direct nose-to-brain delivery of lamotrigine following intranasal administration to mice. *International Journal of Pharmaceutics*, jul. 2015. v. 490, n. 1–2, p. 39–46.

ZHANG, Y, YI, B, MA, J, ZHANG, L, ZHANG, H, YANG, Y, DAI, Y. 2014. Quercetin Promotes Neuronal and behavioral recovery by suppressing inflammatory response and apoptosis in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurochemical Research*. v. 40, n. 1, p. 95–203.

ZHANG, Y. *et al.* Quercetin Promotes Neuronal and Behavioral Recovery by Suppressing Inflammatory Response and Apoptosis in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *Neurochemical Research*, jan. 2015. v. 40, n. 1, p. 195–203.

### 3 Considerações finais

Em suma, o trabalho buscou avaliar se a administração de nanoemulsão de QU em ratos *Wistar* pode levar a efeitos tóxicos em rim e fígado, sendo administrado por duas vias diferentes em duas concentrações, IP (30 mg/kg) e IN (0,25 mg/kg). Como resultado vimos que a QU, em ambas as vias, não gera alterações celulares nos órgãos estudados. No entanto, os efeitos dela em doses contínuas e em outros aspectos do organismo devem ser investigados, como as enzimas hepáticas por exemplo.

Além disso, o teste com a nanoemulsão branca foi importante para demonstrar que os compostos utilizados na sua produção não apresentam comportamento citotóxico, assim como a nano incorporada da QU. Dessa forma, considerando o potencial farmacológico da QU e os benefícios da sua nanoemulsificação, é necessário estudos futuros mostrando os efeitos deste composto com doses mais elevadas. Além disso, a administração contínua e diferentes vias de administração também devem ser investigadas para possíveis danos toxicológicos.

Faz-se necessário também a investigação em outros órgãos além do fígado e do rim, devido o pouco conhecimento da distribuição deste composto no organismo. Com análises e testes bioquímicos e imunohistoquímica, fazendo a comparação das duas vias de administração e investigando se a via intranasal em concentrações maiores causa alterações tóxicas no organismo, para reafirmarmos os resultados encontrados. Por fim, os resultados deste presente trabalho são precursores em demonstrar que, na dose e vias de administração testadas, ambas não apresentaram toxicidade.

### Referências bibliográficas

ADEDARA, I A, IDRIS, TS, EGO, VC, et al. 2017 Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. *Chemico-Biological Interactions*. v. 263, p. 88–98.

BAJAJ, G.; YEO, Y. 2010. Drug delivery systems for intraperitoneal therapy. *Pham Res*. v. 28, n. 5, p. 735–738.

BONASSA, E.M.A.& SANTANA, T (2005) *Enfermagem em terapêutica oncológica*. (3a ed.) São Paulo: Atheneu. 538pp.

CHAMORRO, V, PANDOLFI ,R, MORE, L, et al. 2016. Effects of Quercetin in a rat model of hemorrhagic traumatic shock and reperfusion. *molecules*. v. 21, n. 12, p. 1739.

CHOI EJ, KIM G-H. 2010. Quercetin accumulation by chronic administration causes the caspase-3 activation in liver and brain of mice. *BioFactors*, 36(3):216–221.

ELUMALAI, P. & LAKSHMI, S. 2016. Role of Quercetin Benefits in Neurodegeneration. *In: ESSA, M. M.; AKBAR, M.; GUILLEMIN, G. (Org.)*. The benefits of natural products for neurodegenerative diseases. Cham: Springer International Publishing. v. 12, p. 229–245.

GANESAN, P. *et al*. Recent trends in the development of nanophytobioactive compounds and delivery systems for their possible role in reducing oxidative stress in Parkinson's disease models. *International Journal of Nanomedicine*, out. 2015. p. 6757.

HÄDRICH, G, VAZ, GR, MAIDANA, M, et al. 2016. Anti-inflammatory effect and toxicology analysis of oral delivery quercetin nanosized emulsion in Rats. *Pharmaceutical Research*. v. 33, n. 4, p. 983–993.

HIJOKA, M, MATSUSHITA, H, HISATSUNE, A, et al. 2011. Therapeutic Effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 338, n. 3, p. 741–749.

JUNQUEIRA, LC, CARNEIRO, J. 2013, *Histologia Básica – texto e atlas*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap 16: 318-128p; cap 19: 368-380p.

KATSUKI, H. Exploring Neuroprotective Drug Therapies for Intracerebral Hemorrhage. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2010. v. 114, n. 4, p. 366–378. . Acesso em: 14 maio 2014.

KRISHNAMURTHI, R. V. *et al.* Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet Global Health*, nov. 2013. v. 1, n. 5, p. e259–e281.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, maio. 2012a. v. 64, n. 7, p. 614–628.

MARCON, L. Efeito do tratamento lipossomal com antimoniato de meglumina em camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: análise das vias de administração e da resposta ao fármaco em modelo de desnutrição. Ouro Preto - Brasil: Universidade Federal de Ouro Preto, 2011. Dissertação de Mestrado.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2007: uma análise da situação de saúde. *In: COORDENAÇÃO GERAL DE INFORMAÇÃO E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA – CGIAE*, 2008, Brasília-Brasil. Anais eletrônicos. Brasília-Brasil, 2008. V. 1, p. 641. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_brasil\\_2007.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2007.pdf)>. Acesso em: 11 out. 2017.

ROSS, MH & PAWLINA, W. 2012. Sistema Urinário. *In: Histologia Texto e Atlas*. Guanabara Koogan Ltda. pág:710–751.

SERRALHEIRO, A, ALVES, G, FORTUNA, A, FALCAO, A. 2015. Direct nose-to-brain delivery of lamotrigine following intranasal administration to mice. *International Journal of Pharmaceutics*. jul.v. 490, n. 1–2, p. 39–46.

SACCO, R. L. *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*, 1 jul. 2013. v. 44, n. 7, p. 2064–2089.

ZHANG, Y, YI, B, MA, J, ZHANG, L, ZHANG, H, YANG, Y, DAI, Y. 2014. Quercetin Promotes Neuronal and behavioral recovery by suppressing inflammatory response and apoptosis in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurochemical Research*. v. 40, n. 1, p. 95–203.

WEN, M. M. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *Journal of Controlled Release*, jan. 2017. v. 245, p. 95–107.