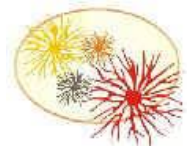




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DA ADMINISTRAÇÃO
INTRANASAL E INTRAPERITONEAL DE NANOEMULSÃO DE
QUERCETINA EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À HEMORRAGIA
INTRACEREBRAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Magno da Silva Marques

Rio Grande, RS, Brasil

2017

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DA ADMINISTRAÇÃO
INTRANASAL E INTRAPERITONEAL DE NANOEMULSÃO DE
QUERCETINA EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À HEMORRAGIA
INTRACEREBRAL**

POR

Magno da Silva Marques

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Horn

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiana Lima Dora

DEDICO:

A minha vó Maria Matta da Silva (*In memoriam*).

“O conhecimento da natureza é o caminho para a admiração do Criador”

Justos Von Liebig (1803-1873)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade. Também aos professores, sempre muito dedicados e compromissados com a ciência.

A CAPES pela bolsa de mestrado no qual fui presenteado durante esses dois últimos anos.

A minha orientadora e amiga prof.^a Dr^a Ana Paula Horn que sempre muito atenciosa e paciente nunca mediu esforços em todas as situações. Até mesmo os “puxões de orelhas” eram seguidos de um sorriso verdadeiro. A você todo meu respeito e gratidão, obrigado por tudo!

A minha co-orientadora prof.^a Dr^a Cristiana Dora, e a todo pessoal do NanoBio e CEME-SUL, todos sempre muitos simpáticos e prestativos.

A Juliana Bidone, educada e querida sempre disposta a ajudar a todos com um largo sorriso no rosto.

Ao amigo Gustavo Richter sempre disposto a fazer e ajudar, incansável com as permeações e HPLC nunca reclamou mesmo os experimentos se estendendo até as 2 h da madrugada. Certamente sem essa “força” os experimentos seriam menos tranquilos.

Ao Dr. Ademir, veterinário do frigorífico Bonsul, que sempre nos recebeu no seu estabelecimento com a maior das boas vontades, sendo muito solícito no fornecimento de material para nossos experimentos.

Ao amigo de graduação e de pós Marcelo Marinho que trabalhou muito nos experimentos deixando seus medos de lado (anestesiando os animais) sempre com proatividade e responsabilidade. Ainda, pelos momentos de descontração, risadas e até mesmo os “cafezinhos jovens” que fizeram com que esses anos se tornassem tão prazerosos.

A amiga Camila Vian que chegou a pouco tempo e conquistou a todos com seu jeito espontâneo sempre disposta a ajudar com uma qualidade que admiro muito: coragem. Aquela pessoa que você pode contar em qualquer momento da sua vida.

Ao Marcos Cordeiro pessoa que admiro muito desde a graduação, responsável e criativo sempre com ideias novas trazendo para o grupo um olhar diferenciado.

As amigas de pós e de vida Caroline Souto e Nicole Medeiros com as quais muitas vezes dividi alegrias e sofrimentos. Pessoas que a Furg me presenteou e que vou levar comigo.

Ao Fabricio Dias por sempre estar presente compartilhando os momentos felizes e tristes durante esses dois anos.

A minha família por sempre apoiarem e priorizarem os estudos na minha vida. Minha mãe Neusa Marques que sempre ensinou a ser humilde e bondoso com o seu exemplo, entendendo e respeitando meu silêncio nos dias cinzas e regozijando comigo as cores da vida nos dias claros. Minha irmã Patricia Marques, amiga e até mãe muitas vezes, pessoa que mais admiro e agradeço a Deus todos os dias por ter colocado no meu caminho. Minha sobrinha Maitê Hernandes, sempre trazendo bilhetinhos com frases do tipo “dindinho te amo” e que nos faz querer ser uma pessoa melhor. Meu pai Sergio Marques, homem íntegro que me ensinou os principais valores da vida. A vocês o meu muito obrigado, com amor souberam compreender meus momentos de ausência física ou mental em casa.

A Deus pelo dom da vida e pelo regozijo nos momentos difíceis.

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso”.

Albert Einstein

RESUMO

MARQUES, Magno da Silva. **Comparação dos efeitos protetores da administração intranasal e intraperitoneal de nanoemulsão de quercetina em ratos *Wistar* submetidos à hemorragia intracerebral** 2017. 66 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Os acidentes vasculares cerebrais (AVC) são atualmente um importante problema de saúde pública mundial. Estima-se que a hemorragia intracerebral (HI) seja responsável por 10% a 15% de todos os AVCs. Apesar dos avanços consideráveis feitos nos últimos anos para a compreensão e tratamento de distúrbios no sistema nervoso central (SNC), atingir especificamente o cérebro usando a farmacêutica atual ainda é um grande desafio. Na tentativa de contribuir com a busca de possíveis fármacos que possam ser utilizados para patologias do SNC, comparamos os efeitos de uma nanoemulsão contendo quercetina (QU-N) em um modelo de HI induzido por colagenase em ratos, utilizando duas vias de administração: intraperitoneal (IP) e intranasal (IN). Os nanocarreadores lipídicos foram preparados usando a técnica de difusão do solvente a quente associada ao método de inversão de fase. Foi realizado um teste de permeação *ex vivo*, a fim de avaliar o perfil de liberação da QU em mucosa suína. Nesse estudo, os ratos foram submetidos a HI e tratados com uma dose diária de QU-N IP (30 mg/kg^{-1}) ou IN ($0,25 \text{ mg/Kg}^{-1}$) durante três dias. Três testes comportamentais foram realizados: campo aberto (open field), deslocamento em haste elevada (beam walking) e motricidade em grade (foot fault) em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Ao término do experimento, os cérebros foram retirados e o tamanho do hematoma foi quantificado. Como resultado, a QU-N apresentou melhor padrão de permeação ao atravessar a mucosa nasal suína em comparação com QU livre, fornecendo evidências de que o nanoencapsulamento poderia melhorar a passagem nariz-cérebro. Os animais tratados com QU-N via IP apresentaram melhora significativa nos testes comportamentais, bem como diminuição do tamanho do hematoma. Já os animais tratados pela via IN mostraram alterações significativas somente nos testes comportamentais. A quantidade de QU administrada via IN foi menos de 1% da quantidade administrada pela via IP e mesmo nessa quantidade tão baixa os animais responderam de forma positiva aos testes comportamentais, sugerindo assim que, caso fossem realizadas mais administrações diárias e/ou por período maior de dias, possivelmente haveria também alterações nos resultados do tamanho do hematoma. Os resultados apresentados nessa dissertação nos levam a concluir que o QU-N utilizada neste estudo pode ser promissora para futuros estudos para o tratamento da HI.

Palavras-chave: quercetina, nanoemulsão, hemorragia intracerebral, intraperitoneal, intranasal.

ABSTRACT

Stroke is currently a major public health problem worldwide. It is estimated that intracerebral hemorrhage (ICH) is responsible for 10% to 15% of all strokes. Despite the considerable advances made in recent years in the understanding and treatment of central nervous system (CNS) disorders, specifically targeting the brain using the current pharmaceutical alternatives is still a major challenge. In an attempt to investigate new drugs to be used in SNC disorders, we compared the effects of a quercetin-loaded nanoemulsion (QU-N) in a collagenase-induced ICH model in rats using two routes of administration: intraperitoneal (IP) and intranasal (IN). The lipid nanocarriers were prepared using the hot solvent diffusion associated with the phase inversion temperature method. In this study, the animals were subjected to ICH and treated with a daily dose of QU-N IP (30 mg/kg^{-1}) or IN (0.25 mg/kg^{-1}) for three days. Three behavioral tests were performed: open field, beam walking and foot fault, at 24, 48 and 72 h, respectively. At the end of the experiment, the brains were removed and the size of the hematoma was quantified. An *ex vivo* permeation test was performed in order to evaluate the release profile of QU in porcine nasal mucosae. As a result, QU-N presented better permeation pattern when crossing the porcine nasal mucosae compared to free QU, thus providing evidence that nanoencapsulation could improve the nose-brain passage. The animals treated with QU-N via IP had a significant improvement in the behavioral tests as well as in the hematoma size, while the animals treated by the IN route presented significant alterations only in the behavioral tests. The amount of QU administered by IN was less than 1% of the amount administered via the IP route and even at such a low amount the animals responded positively to the behavioral tests, thus suggesting that if more daily and / or for a longer period of time could also reflect the results of hematoma size. These results suggest that the QU-N used in this study may be promising for future studies on ICH treatments.

Keywords: quercetin, nanotechnology, intracerebral hemorrhage, intraperitoneal, intranasal.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANE	- Auto-nanoemulsifying
ANE	- Auto-nanoemulsificante
AVC	- Acidente Vascular Cerebral
AVC-H	- Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
AVC-I	- Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
BBB	- Blood-brain Barrier
BHE	- Barreira Hematoencefálica
BP	- Blood Pressure
CEUA	- Animal Use Ethics Committee
CI	- Cerebral Ischemia
CLN	- Carreador Lipídico Nanoestruturado
CNS	- Central Nervous System
COL-VII	- Collagenase Type VII
EC	- Endotélio Cerebral
HI	- Hemorragia Intracerebral
HPLC	- High-Pressure Liquid Chromatography
IC	- Isquemia Cerebral
ICH	- Intracerebral Hemorrhage
ICP	- Intracranial Pressure
IN	- Intranasal
IN	- Intranasal
IP	- Intraperitoneal
IP	- Intraperitoneal
LCR	- Líquido Cefalorraquidiano
LNP	- Lipid Nanoparticles
LOD	- Limits of Detection
LOQ	- Limits of Quantification
LPH	- Lactase Florizine Hydrolase
LPH	- Lactose Florizina Hiddrolase
LS	- Lipossomas
MB	- Membrana Basal
NE	- Nanoemulsions
NE	- Nanoemulsões
NLS	- Nanopartícula Lipídica Sólidas
NPL	- Nanopartícula Lipídica
O/W	- Oil in Water
O/W	- Oil-in-water (óleo em água)

OMS	- Organização Mundial da Saúde
PA	- Pressão Arterial
PDI	- Polydispersity Index
PEG	- Polyethylene Glycol
PIC	- Pressão Intracraniana
PIT	- Phase Inversion Technique
QU	- Quercetin
QU	- Quercetina
QU-N	- Quercetin Loaded Nanocarriers
QU-N	- Quercetina Nanoencapsulada
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNF	- Simulated Nasal Fluid
WHO	- World Health Organization

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

PARTE I:

FIGURA A – Subtipos do acidente vascular cerebral.....	15
FIGURA B – Hemicorpo afetado após acidente vascular cerebral.....	18
FIGURA C – Organização da barreira hematoencefálica.....	19
FIGURA D – Possíveis caminhos da droga na cavidade nasal e no SNC.....	21
TABELA A – Vantagens e desvantagens da via intranasal	22
FIGURA E – Estrutura geral das diferentes classes de flavonoides.....	22
FIGURA F – Estrutura geral dos flavonoides.....	23
FIGURA G – Estrutura molecular da quercetina.....	25
TABELA B – Produtos que utilizam nanotecnologia disponíveis comercialmente.....	26
FIGURA H – Diferentes nanocarreadores lipídicos.....	27
TABLE 1 – Experimental groups.....	36
FIGURE 1 – Experimental design.....	37
TABLE 2 – Physico-chemical characteristics of quercetin loaded nanoemulsion.....	38
FIGURE 2 – Mass of quercetin permeated.....	38
FIGURE 3 – Open field test performed 24h after stereotaxic surgery.....	39

FIGURE 4 – Beam walking test performed 48h after stereotaxic surgery.....40

FIGURA 5 – Foot fault test performed 72h after stereotaxic surgery.....40

FIGURA 6 – Hematoma size 72h after ICH.....41

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	07
1.Introdução	14
1.1. Acidente vascular cerebral	14
1.1.1. Acidente vascular cerebral isquêmico	15
1.1.2. Acidente vascular cerebral hemorrágico	15
1.2. Patologias da hemorragia intracerebral (influência motora)	16
1.3. Transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica	18
1.3.1. Via intraperitoneal e distribuição de fármacos	20
1.3.2. Via intranasal e entrega de fármacos	20
1.4. Flavonoides	22
1.4.1. Quercetina	23
1.5. Nanocarreadores de fármacos	25
1.5.1. Nanoemulsões	27
2.Objetivo	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
ABSTRACT	31
1. Introduction	32
2. Materials and Methods	34
2.1. Materials	34
2.2. Preparation of quercetin nanoemulsions	34
2.3. Particle size and zeta potential measurements	34
2.4. Quercetin content determination and nanoemulsion recovery	34
2.5. <i>Ex vivo</i> drug release behavior	35
2.6. Animals	35
2.7. Intracerebral hemorrhage induction	36
2.8. Experimental groups	36
2.9. Doses and administrations of quercetin	36
2.10. Behavioral evaluations of the animals	36
2.10.1. Open field test	36

2.10.2. Beam walking test.....	37
2.10.3. Foot fault test.....	37
2.11. Measurement of the hematoma size.....	37
2.12. Experimental design.....	37
2.13. Statistical analysis.....	38
3. Results.....	38
3.1. Nanoemulsion characterization.....	38
3.2. <i>Ex vivo</i> drug release behavior.....	38
3.3. Influence of administration of quercetin on behavioral tests.....	39
3.3.1. Open field.....	39
3.3.2. Beam walking test.....	39
3.3.3. Foot fault test.....	40
3.4. Assessment of hematoma size.....	41
4. Discussion.....	41
5. Acknowledgments.....	43
6. References.....	44
3. Discussão.....	49
4. Considerações Finais.....	55
5. Perspectivas.....	56
6. Referências Bibliográficas.....	57
ANEXOS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente vascular cerebral

O termo “stroke” foi provavelmente introduzido pela primeira vez na medicina em 1689 por William Cole em “*A Physico-Medical Essay Concerning the Late Frequencies of Apoplexies*” (COLE, 1689). Antes de Cole, o termo comum usado para descrever lesões cerebrais não traumáticas muito agudas era “apoplexia”, que foi utilizado por Hipócrates cerca de 400 A.C. (ADAMS; BALTIMORE, 1939). O acidente vascular cerebral (AVC) é classicamente caracterizado como um déficit neurológico atribuído a uma lesão focal aguda do sistema nervoso central (SNC), através de uma causa vascular, incluindo a isquemia cerebral (IC) e a hemorragia intracerebral (HI), que são as principais causas de invalidez e morte no mundo (SACCO *et al.*, 2013).

A HI é responsável por 10 a 15% de todos os AVCs (KRISHNAMURTHI *et al.*, 2013), sendo a forma mais grave da doença cerebrovascular aguda, com alta taxa de mortalidade: estima-se que 30 a 50% dos pacientes morrem nos primeiros 30 dias; dos que sobrevivem, apenas 20% recuperam a independência dentro de seis meses (MA *et al.*, 2011). 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 no mundo, atrás apenas das doenças cardíacas, ocasionando 5,8 milhões de mortes, o 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Quanto a sua etiologia, essa patologia pode ser dividida em dois subtipos: AVC hemorrágico (AVC-H) e AVC isquêmico (AVC-I) (Figura A).

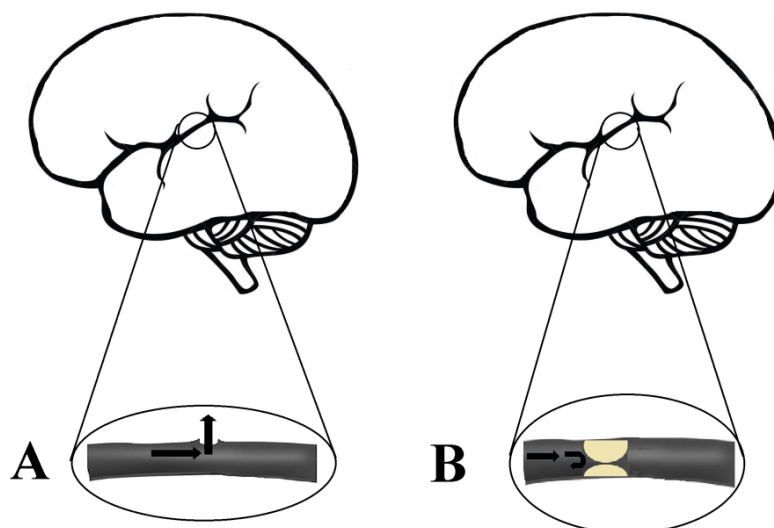


Figura A: Subtipos de AVC. AVC hemorrágico, caracterizado pelo extravasamento de sangue para o parênquima cerebral (A) e AVC isquêmico, causado por um fluxo sanguíneo insuficiente em parte ou em todo o cérebro (B).

1.1.1 Acidente vascular cerebral isquêmico

O AVC-I é causado por um fluxo sanguíneo insuficiente em parte ou em todo o cérebro. Dentre os AVC-I, o AVC-I focal é convencionalmente definido como um déficit neurológico, tendo duração superior a 24h, sendo causado por redução do fluxo sanguíneo em uma artéria que irriga parte do cérebro, o que irá resultar em infarto (LEWIS; TIMOTHY, 2011). Além disso, o AVC-I é caracterizado pela morte celular por hipóxia e pela perda de nutrientes através da interrupção do fluxo sanguíneo, em decorrência do bloqueio de um vaso por trombo ou estenose (MENDIS *et al.*, 2011).

O AVC-I pode ser ocasionado por duas maneiras: trombose ou embolia. A trombose é causada pela oclusão arterial por um trombo, que se forma lentamente numa placa arteriosclerótica. Já a embolia, é causada pela formação de um coágulo embólico. Os AVCs de pequenos vasos, comumente chamados de lacunas, são causados por oclusões de pequenas arteríolas, a lesão histológica nos vasos classicamente é chamada de lipohialinose e alguns são ocasionados por anormalidades vasculares locais e outros por pequenos êmbolos, como dito anteriormente (LEWIS; TIMOTHY, 2011).

1.1.2 Acidente vascular cerebral hemorrágico

O AVC-H é caracterizado pelo extravasamento de sangue para o parênquima cerebral e formação de hematoma no cérebro, conduzindo ao edema e danos nos tecidos nervosos (KATSUKI, 2010). As principais consequências patológicas são a formação de um 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 microglial na região do peri-hematoma, responsável por intensa resposta inflamatória local (GALHO *et al.*, 2016; KATSUKI, 2010; XI *et al.*, 2006).

Os fatores de risco incluem o tabagismo, abuso de álcool, drogas, fenilpropanolamina e outros simpatomiméticos, hipertensão arterial descontrolada, má formação vascular, angiopatia amiloide, entre outros (KATSUKI, 2010; MESTRINER *et al.*, 2011). A área do cérebro mais afetada é a região dos gânglios da base, mais especificamente o estriado (XI; KEEP; HOFF, 2006). Esta área do cérebro executa funções relacionadas ao movimento ativo, preparação ou início de respostas comportamentais, respostas a estímulos visuais e processamento de informações ligadas a respostas motoras (PAWLOWSKI *et al.*, 2013).

Apesar das tentativas em curso para encontrar intervenções eficazes com base no entendimento fisiopatológico da doença, as opções são limitadas e os resultados são pouco animadores. Terapias médicas para HI são limitadas a redução sobre a pressão arterial (PA), monitoramento da pressão intracraniana (PIC), cirurgia para drenagem do edema, dentre outras (GAGLIARDI; RAFFIN; CABETTE, 2001; QURESHI; MENDELOW; HANLEY, 2009).

Modelos de AVC-H em animais de experimentação, com base na injeção de colagenase (que rompe a lâmina basal dos vasos sanguíneos) ou inserção de sangue autólogo no parênquima cerebral (geralmente para o corpo estriado), foram desenvolvidos, contribuindo-se, em muito, nos avanços da compreensão dos complicados mecanismos fisiopatológicos dessa doença. Estes modelos experimentais também têm sido usados para explorar fármacos candidatos a terapias para o AVC (SUZUKI, 2010).

1.2. Patologia da hemorragia intracerebral (influência motora)

As principais consequências patológicas da HI são: (I) a ativação microglial na região do peri-hematoma, responsável pela intensa resposta inflamatória local, (II) a formação

de edema na região afetada, que inicia logo após a ruptura do vaso e aumenta até dias após a lesão, (III) a morte maciça de neurônios e células gliais na região afetada, (IV) a formação de um hematoma, que se expande por horas ou mesmo dias e (V) a deficiência ou perda de capacidade motora e/ou função (GALHO *et al.*, 2016; XI *et al.*, 2006). Muitos sobreviventes de AVC apresentam algum grau de comprometimento motor que limita o estado funcional após o AVC (BAJAJ *et al.*, 2016). Indivíduos com lesão de hemisfério direito, por exemplo, podem apresentar hminegligência a estímulos sensoriais contralaterais ao hemisfério lesado (Figura B) (MAGLIARO *et al.*, 2009; SOARES, 2012).

Sabe-se que o sistema nervoso é o responsável por dar origem as diferentes formas de comportamento, portanto, a observação comportamental pode ser considerada a forma mais essencial para a avaliação das funções neurais (FERNANDES *et al.*, 2014). Neste sentido, a utilização de testes comportamentais que visem a quantificação dos prejuízos motores pós AVC é de extrema importância no estudo de compostos que possam ser utilizados como tratamento para essa patologia. Exemplos de testes utilizados para este fim são: beam walking (teste em haste elevada), foot fault (teste de motricidade em grade) e open field (campo aberto) (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010; GOLDSTEIN *et al.*, 2012; ROGERS *et al.*, 1997).

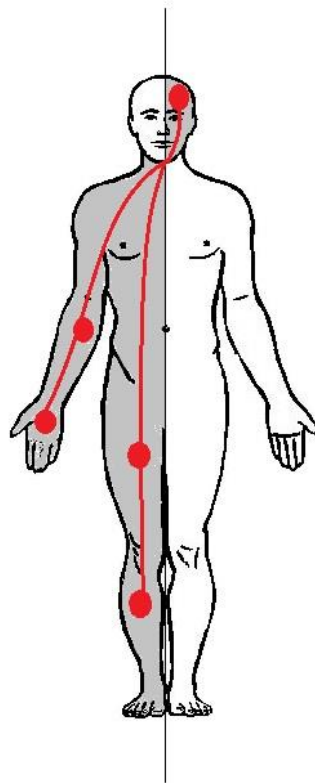


Figura B: Hemicorpo afetados pós AVC: Relação inversa ao lado cerebral afetado.

1.3. Transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica

Apesar dos consideráveis avanços feitos nos últimos anos para a compreensão e tratamento de distúrbios no SNC, ainda é um grande desafio o desenvolvimento de fármacos que atinjam especificamente o cérebro usando a farmacêutica convencional (BODE *et al.*, 2016). Um dos obstáculos que um fármaco precisa superar para atingir o parênquima cerebral é a barreira hematoencefálica (BHE), que representa uma das barreiras mais seletiva do nosso organismo (FREESE *et al.*, 2017).

A homeostase do SNC é preservada principalmente pela BHE, que consiste em uma barreira de difusão formada por células endoteliais especializadas, caracterizadas pela ausência de fenestrações, e por extensas junções oclusivas. Essas junções limitam o fluxo paracelular de moléculas hidrofílicas, mas permitem a difusão de substâncias lipofílicas e gases respiratórios (O₂ e CO₂) (BALLABH *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2017).

O transporte de fármacos através do BHE representa um desafio particularmente importante devido à sua baixa permeabilidade intrínseca e à presença de transportadores ativos de efluentes (PARDRIDGE, 2012). A função de barreira dos capilares cerebrais é um resultado das especializações mencionadas acima do endotélio cerebral (EC). O EC, em associação com astrócitos, pericitos e neurônios, forma estruturas especializadas denominadas unidades neurovasculares, que são responsáveis pelas propriedades únicas da BHE (Figura C) (ABBOTT, 2013; ABBOTT *et al.*, 2010). Ela garante a homeostase da BHE por meio de um transporte altamente regulado de substratos e impede que as substâncias xenobióticas entrem no cérebro usando transportadores de efluxo eficientes (FREESE *et al.*, 2017), dificultando, assim, a entrada de fármacos no SNC. Sabe-se que a HI é sempre seguida por rompimento da BHE, o que contribui para o aumento da permeabilidade de fármaco ao cérebro (KEEP *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011) o que aumentaria a biodisponibilidade destes para o meio intracerebral.

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 distribuídos ao parênquima cerebral (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; FATTAL; VAUTHIER, 2006).

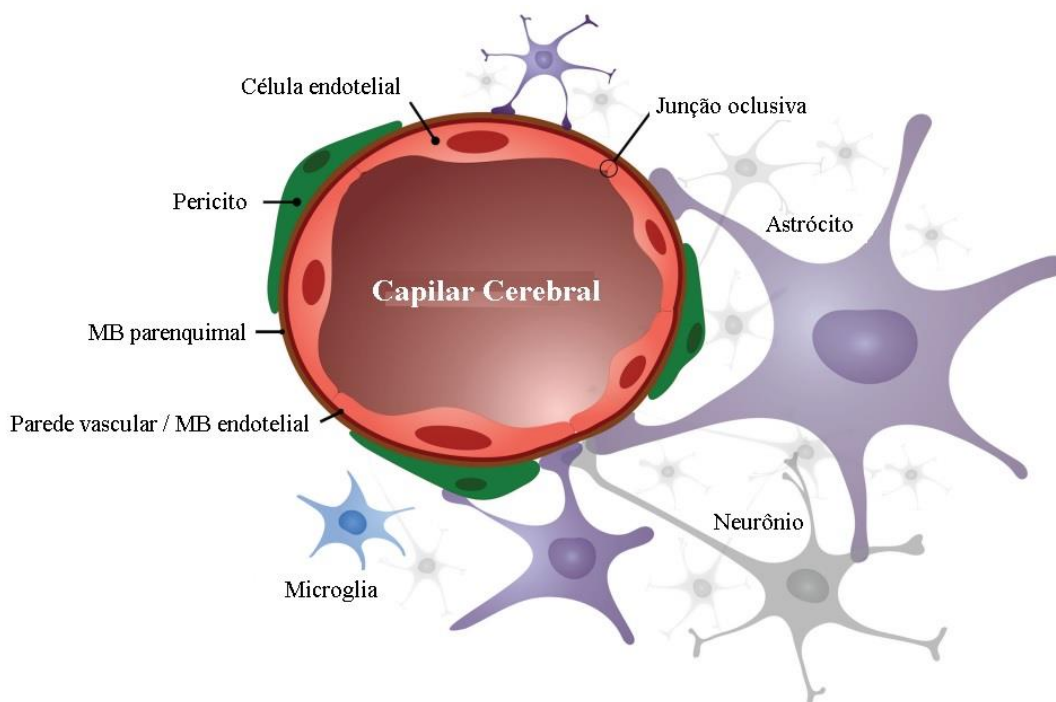


Figura C: Organização celular da barreira hematoencefálica. As células endoteliais do cérebro formam junções de oclusão nas suas margens, que selam a via de difusão paracelular aquosa entre as células. Os pericitos são distribuídos de forma descontínua ao longo dos capilares cerebrais e envolvem parcialmente o endotélio. Projeções de astrócitos formam uma rede complexa que envolve os capilares. Esta estreita associação de células é essencial para a indução e manutenção da barreira. As projeções axonais de neurônios no músculo liso arteriolar contêm neurotransmissores vasoativos e peptídeos que regulam o fluxo sanguíneo local. Microglia são células imunocompetentes residentes do cérebro. MB: Membrana basal (adaptado de PINTO *et al.*, 2017)

1.3.1. Via intraperitoneal e distribuição de fármacos

A aplicabilidade e a eficácia da administração de fármacos por via intraperitoneal (IP) é mostrada em diversos trabalhos (BAJAJ; YEO, 2010; CHAUDHARY *et al.*, 2010). Sabe-se que drogas de baixo peso molecular são absorvidas pelos capilares peritoneais e chegam rapidamente à circulação sistêmica, passando primeiro pela circulação portal, fígado e posteriormente alcançando outros órgãos (MARCON, 2011). Além disso, a terapia utilizando a via IP pode fornecer concentrações relativamente altas do fármaco (BAJAJ; YEO, 2010). Contudo, 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 (JOHN; DAVID, 2006).

1.3.2. Via intranasal e entrega de fármacos

A administração intranasal (IN) como um meio de fornecimento de agentes terapêuticos, preferencialmente ao cérebro, ganhou recentemente um interesse significativo (SERRALHEIRO *et al.*, 2015). Ela foi inicialmente proposta e patenteada em 1989 por William H. Frey II do *Alzheimer's Research Center*. Posteriormente, foi demonstrado que os agentes terapêuticos administrados via IN para o SNC possuíam potencial para tratar doenças e distúrbios neurológicos (DHURIA *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade de uma vasta gama de moléculas ao SNC após a administração IN foi demonstrada em roedores, primatas e seres humanos (HANSON *et al.*, 2009; HANSON *et al.*, 2012), e esta, proporciona um método não invasivo de contornar a BHE para potencialmente fornecer produtos biológicos, tais como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos, vetores virais e mesmo células tronco ao SNC (Figura D) (BENEDICT *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2012; LOCHHEAD *et al.*, 2012).

A rota IN tem sido associada há muito tempo com uma série de vantagens, por exemplo, início rápido de efeitos utilizando métodos de administração não injetáveis. 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 em alguns casos (Tabela A) (LOCHHEAD *et al.*, 2012; SERRALHEIRO *et al.*, 2015).

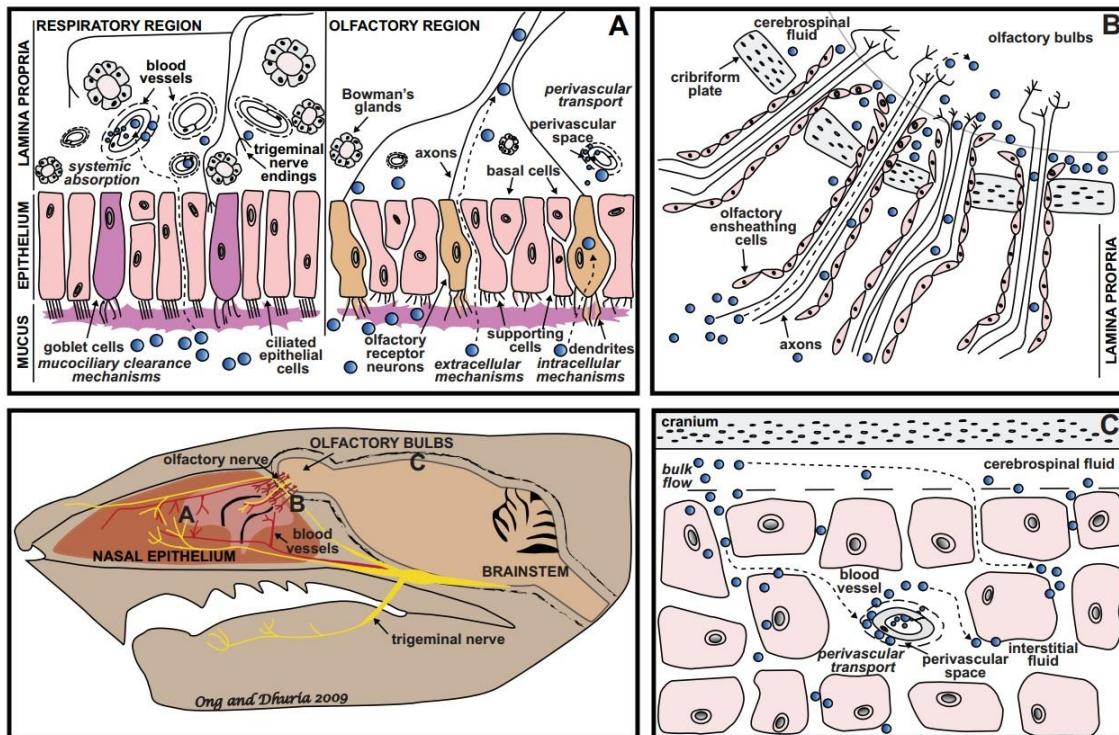


Figura D: Possíveis caminhos de distribuição do fármaco na cavidade nasal e no sistema nervoso central. Após administração intranasal, os fármacos (círculos azuis) entram em contato com a mucosa nasal, que é inervada pelos nervos olfativos e trigêmiros. (A) Na região respiratória, células epiteliais ciliadas e células caliciformes secretoras de mucosas no epitélio formam a base do mecanismos de depuração mucociliar que removem substâncias estranhas da camada mucosa para a nasofaringe para eliminação. Os fármacos podem ser transportados através da mucosa nasal para o SNC através da entrada de canais perivasculares (linhas tracejadas ao redor dos vasos sanguíneos) na lâmina própria ou através de mecanismos extracelulares ou intracelulares envolvendo nervos olfativos e trigeminais (flechas tracejadas). O suprimento de sangue para o epitélio respiratório é relativamente maior em comparação com o epitélio olfatório, tornando-o um local ideal para absorção sistêmica de drogas aplicadas por via nasal. (B) Após atingir a lâmina própria, as drogas podem entrar nos canais criados pelas células olfatórias que envolvem os nervos olfatórios, onde podem acessar o líquido cefalorraquidiano (LCR) e os bulbos olfatórios (setas tracejadas). (C) A partir do LCR, os fármacos podem ser distribuídos através de mecanismos de fluxo em massa e misturados com o fluido intersticial cerebral em todo o cérebro (setas tracejadas). Os fármacos também podem entrar em espaços perivasculares após chegarem ao cérebro para serem rapidamente distribuídas por todo o SNC. Medicamentos que entraram em espaços perivasculares da mucosa nasal também podem sair desses espaços no cérebro. Estes mesmos percursos na direção inversa estão envolvidos na depuração de solutos do SNC para a periferia (DHURIA *et al.*, 2009).

Tabela A. Vantagens e desvantagens da via intranasal (LOCHHEAD *et al.*, 2012)

Vantagens	Desvantagens
Não invasivo / Risco reduzido de infecção da aplicação / Baixo risco de transmissão de doenças.	Limitado a fármacos potentes / pequenos volumes (25-200 µl).
Facilidade de auto-administração / ajuste de dose	Transporte mucociliar ativo.
Grande área de superfície para absorção (humano ~ 160 cm ²).	Degradação enzimática pelo citocromo nasal P450 / peptidases / proteases.
Rápida absorção / início rápido da ação.	A baixa permeabilidade para fármacos hidrofílicos sem intensificadores de absorção requer grandes doses.
Submucosa com grande vascularização e sistema linfático abundante.	Baixo pH do epitélio nasal.
Evita a eliminação hepática de primeira passagem.	Variabilidade interindividual.
Possíveis vias diretas para o SNC pela ultrapassagem da BHE.	Baixa eficiência de entrega ao SNC para as proteínas medida até agora (<0,05%).

1.4. Flavonoides

Durante a última década, a proporção de estudos científicos baseados em componentes não nutritivos de dieta tem aumentado. Estes componentes estão presentes na dieta e têm a capacidade de proteger contra desordens do organismo, que são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Os flavonoides são fitoquímicos e representam valiosos componentes nutritivos da dieta e que vem sendo bastante estudados (ZHANG; HÖLSCHER, 2017).

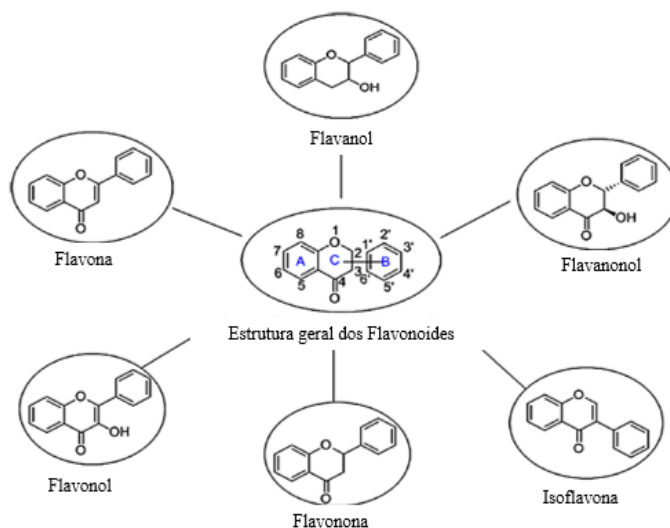


Figura E: Estrutura geral das diferentes classes de flavonoides (adaptado de RAVISHANKAR *et al.*, 2013).

Os carotenoides têm por função mais importante serem fontes dietéticas de provitamina A (principalmente alfa-caroteno, beta-caroteno, zeaxantina, beta-criptoxantina) (ZHAI *et al.*, 2016). Já os flavonoides são metabólitos secundários polifenólicos de plantas com um anel difenilpropano comum (C6-C3-C6) categorizados em calconas, flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (Figura E). Estes compostos, em geral, diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, e pela presença ou não de ligação dupla e carbonila no anel C (Figura F) (DORA; TAGLIARI, 2010). Por eles

beneficiarem a permeabilidade dos vasos sanguíneos eles foram chamados de vitamina P, sendo que seu potencial para a promoção da saúde humana tem atraído muita atenção e tem sido amplamente investigado (ELUMALAI, 2016; KAWABATA; MUKAI; ISHISAKA, 2015).

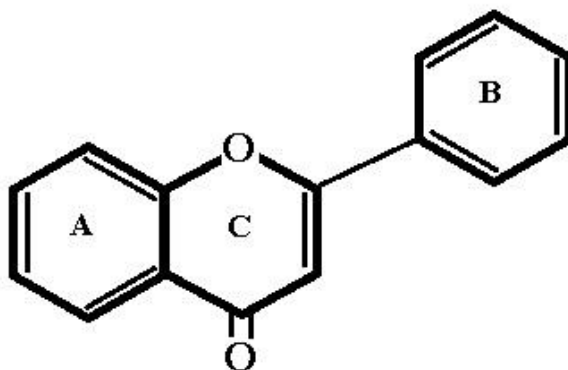


Figura F: estrutura geral dos flavonoides.

1.4.1. Quercetina

Quercetina (QU) (3, 3', 4', 5, 7- pentahidroxi-flavona) (Figura G) vem da palavra latina "Quercetum", que significa floresta de carvalho, e pertence à classe chamada de flavonois que não podem ser produzidos pelo corpo humano. É de cor amarelada, tem peso molecular 302.24 g/mol, ponto de fusão 316°C e é pouco solúvel em água quente, bastante solúvel em álcool e lipídios e é insolúvel em água fria (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016).

Ela é um polifenol que está presente em uma ampla variedade de plantas e alimentos, como cebolas, uvas, maçãs, cerejas, brócolis, e produtos derivados destes como sucos, chás e vinhos (ADEDARA *et al.*, 2017; CHAMORRO *et al.*, 2016; HÄDRICH *et al.*, 2016) A ingestão dietética estimada de QU varia de 4 a 68 mg/dia, com uma probabilidade de aumentar para 200-500 mg/dia em indivíduos que consomem grandes quantidades de frutas e vegetais ricos em flavonoides. Além disso, a QU é vendida como suplemento dietético com uma dosagem recomendada de 1 g/dia (ADEDARA *et al.*, 2017).

A QU alimentar existe principalmente como glicosídeos (uma porção de açúcar como glicose, galactose, rutinose ou xilose, ligada a um dos grupos hidroxilo do composto) em vez de agliconas (sem açúcar) (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008; GUO; BRUNO, 2015). Na dieta humana, a QU pode atingir altos níveis, (DAJAS, 2012; ELUMALAI; LAKSHMI, 2016) no entanto, o uso dela para aplicação clínica é altamente prejudicado

pela sua baixa biodisponibilidade oral (PATEL *et al.*, 2012). De fato, para além da sua baixa solubilidade aquosa, a QU é um substrato tanto das bombas de efluxo intestinal (eg, glicoproteína-P e MRP2) (CHABANE *et al.*, 2009) como das enzimas citocromo P450 (CYC3A) (CHOI; PIAO; KANG, 2011). Consequentemente a biodisponibilidade oral desse flavonoide em seres humanos é baixa, em torno de 2% (MORENO *et al.*, 2017).

A QU segue uma via metabólica complexa. Ambas as formas, glicosídicas e agliconas, são absorvidas pelo intestino delgado por difusão passiva ou polipeptídeo orgânico transportador de ânions. O estômago é incapaz de absorver QU glicosilada, no entanto, uma β -glucosidase, a lactase florizina hidrolase (LPH), na borda de escova das células intestinais, realiza deglicosilação e a absorve na forma aglicona. Após a absorção, a QU é metabolizada no intestino delgado, intestino grosso, fígado e rim (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008; ELUMALAI; LAKSHMI, 2016; RUSSO *et al.*, 2012).

Apesar das evidências sobre o potencial terapêutico demonstrado em experimentos *in vitro* e *in vivo*, a atividade neuroprotetora da QU não é completamente aproveitada. As razões plausíveis são a permeabilidade cerebral fraca, a baixa biodisponibilidade oral (<2%), o metabolismo extensivo de primeira passagem, a instabilidade da molécula frente ao pH fisiológico e a fotodegradação (BAGAD; KHAN, 2015; GHOSH *et al.*, 2013; JAIN; MEHRA; SWARNAKAR, 2015; KUMAR *et al.*, 2016).

Hoje em dia existe uma inclinação para o uso de novas formulações de fármacos, na tentativa de contornar as limitações existentes como solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade por utilização de meios não sintéticos (KATARE *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2016; RAZA *et al.*, 2014). Uma abordagem promissora para melhorar a solubilidade em água de fármacos lipofílicos, tais como a QU, consiste em incorporá-los em nanocarreadores à base de lipídios - um sistema de administração de fármacos composto por lipídios líquidos e sólidos (ou uma mistura de ambos). Mais importante ainda, estes sistemas são capazes de proteger o fármaco da degradação, melhorar a biodisponibilidade e controlar a libertação do mesmo. Os estudos de formulação representam uma chave crucial para o desenvolvimento de uma formulação de administração de fármaco bem-sucedida (HÄDRICH *et al.*, 2016).

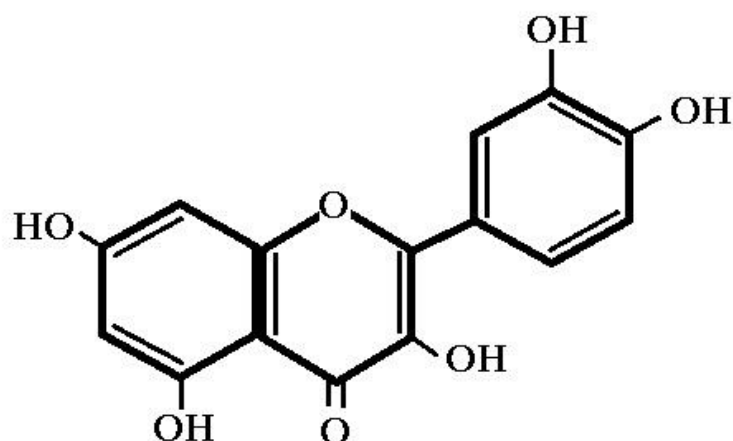


Figura G: estrutura molecular da quercetina

1.5. Nanocarreadores de fármacos

Os recentes avanços na nanotecnologia têm proporcionado grandes oportunidades no possível tratamento de doenças do SNC. O encapsulamento de um fármaco num nanocarreador adequadamente formulado pode aumentar as concentrações de fármaco nas células do cérebro em comparação com o fármaco livre, se este nanocarreador for capaz de atravessar a BHE e acumular-se na célula neuronal. Este aumento pode ser atribuído a funcionalidades específicas dentro do nanocarreador que o torna com melhor capacidade de atravessar a BHE do que a droga na forma livre. Deste modo, os nanocarreadores podem ser modificados com porções alvo para se ligar a receptores ou transportadores constitutivamente expressos na BHE, aumentando assim a seletividade e a permeabilidade ao SNC (WEN *et al.*, 2017).

Sistemas carreadores coloidais, como os nanocarreadores lipídicos (NPL), para administração de fármacos, têm atraído a atenção dos pesquisadores por diminuírem a toxicidade de ativos, protegerem os fármacos da degradação rápida, distribuírem seletiva e eficazmente o fármaco ao local alvo, aumentarem a solubilidade do fármaco, prolongarem o tempo de exposição do fármaco, melhorarem o resultado terapêutico, reduzirem os efeitos do estresse oxidativo e reduzirem a resistência aos fármacos (BIRHANU *et al.*, 2017; GALHO *et al.*, 2016; GANESAN *et al.*, 2015; RICHTER, 2015; WEN *et al.*, 2017; YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2010). Com tantas vantagens, numerosas formulações têm sido desenvolvidas, tais como carreadores lipídicos

nanoestruturados (CLN), lipossomas (LS), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e as nanoemulsões (NE) (Figura H).

O método de produção é classificado com base em se o composto é um sólido ou líquido e cada um possui vantagens e desvantagens distintas, baseadas na atividade da molécula bioativa (GANESAN *et al.*, 2015).

Existem atualmente alguns medicamentos desenvolvidos com base nanotecnológica já disponíveis no mercado e muitos outros em fase de desenvolvimento pré-clínico e clínico. Exemplos de produtos que utilizam a nanotecnologia disponíveis comercialmente estão na tabela B. Vale ressaltar que na área cosmética já existem muitos nanocarreadores sendo utilizados em cremes e fotoprotetores, como é o caso do Photoprot, desenvolvido pela UFRGS em parceria com a Biolab (DALZOTTO, 2010).

Tabela B. Produtos que utilizam nanotecnologia disponíveis comercialmente (RICHTER, 2015)

Nanocarreador	Indicação	Referências
Dexametasona	Anti-inflamatório	(PANYAM; LABHASETWAR, 2004)
Propofol	Anestésico	(RODRIGUES, T. A. <i>et al.</i> , 2012)
Prostaglandina E1	Antiagregante plaquetário	(YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1995)
Alprostadiol	Vasodilatador	(PRAVEEN KUMAR, 2015)
Diazepam	Sedativo	(SWEETMAN, 2006)
Etomidato	Hipnótico	(AKKAR; MÜLLER, 2003)
Palmitato de dexametasona	Anti-inflamatório	(WABEL, 1998)
Vitaminas A, D, E e K	Nutrição parenteral	(PRAVEEN KUMAR, 2015)

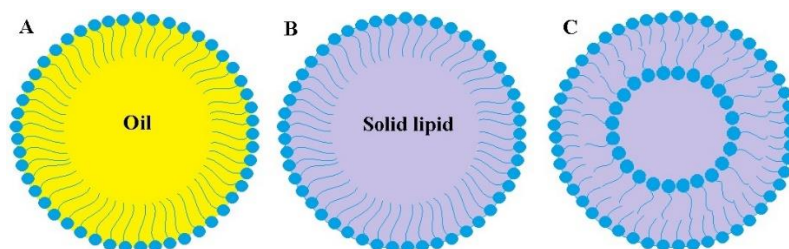


Figura H: Diferentes nanocarreadores lipídicos: (A) nanoemulsão, (B) nanopartícula lipídica sólida, (C) lipossoma.

1.5.1. Nanoemulsões

Um dos sistemas mais utilizados são as NEs ou nanoemulsões “oil-in-water” (O/W) 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. 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. No entanto, alguns desses sistemas sofrem algumas limitações, como a instabilidade durante o armazenamento, resultando na separação de fases e consequentes e imediatos efeitos de liberação (WEN *et al.*, 2017).

As NEs podem ser obtidas através de várias técnicas de preparo, incluindo a microfluidização, homogeneização a alta pressão, sonicação, difusão do solvente a frio ou a quente, temperatura de inversão de fases ou associações destas técnicas (DORA *et al.*, 2012; TADROS *et al.*, 2004). A caracterização destes sistemas compreende a avaliação do diâmetro da nanoemulsão através de diversas técnicas, como por exemplo a técnica de espalhamento de luz dinâmico, ou técnicas microscópicas como a microscopia eletrônica de transmissão, de força atômica ou criofratura, que são importantes também para análise da morfologia das partículas (HALL *et al.*, 2007). Caracterizar os sistemas quanto ao tamanho é importante, pois esta característica é influenciada pela composição quali e quantitativa das formulações e pelo método de preparo utilizado (PREETZ *et al.*, 2010). NEs com o diâmetro variando entre 20 e 200 nm são mais vantajosas em relação às demais NEs, pois apresentam maior estabilidade frente à cremação e à sedimentação além de serem translúcidas e fluídas (SOLANS *et al.*, 2005; TADROS *et al.*, 2004). Deve-se ainda determinar o potencial zeta, pois este desempenha um papel importante na estabilização das emulsões, refletindo o potencial superficial das gotículas. Valores de potencial zeta maiores de 30 mv em módulo são requeridos para uma completa estabilização eletrostática (HEURTAULT, 2003). O grau de ionização do agente emulsificante influencia diretamente neste potencial e, portanto, é pH dependente. A determinação do potencial zeta pode ser realizada com aparelhos de anemometria laser doppler, como o Zetasizer (KLANG; BENITA, 1998).

Nanomateriais diferentes têm sido empregados na nanomedicina. Quanto aos nanoveículos para incremento na solubilidade dos fármacos, as nanoemulsões lipídicas

têm sido consideradas como uma alternativa ideal para aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (NAZARI-VANANI; MOEZI; HELI, 2017).

Sood e colaboradores, ao estudarem sistemas de nanoemulsão contendo curcumina para o tratamento de Alzheimer, pelo método de nanoemulsificação espontânea, obtiveram resultados positivos nas formulações desenvolvidas, uma vez que essas partículas não foram tóxicas e mostraram segurança pelos testes de citotoxicidade *in vitro* e estudos de ciliotoxicidade nasal. As nanoemulsões de curcumina mostraram o fluxo mais alto através da mucosa nasal de ovelha em comparação com a curcumina livre, assim, possui potencial para administração intranasal de curcumina pouco solúvel (SOOD; JAIN; GOWTHAMARAJAN, 2014).

Ainda, nanoemulsões contendo QU com partículas de 20 nm foram produzida pela técnica de difusão do solvente a quente com temperatura de inversão de fase reduzindo estresse oxidativo e danos motores em ratos *wistar* tratados via IP após HI (GALHO *et al.*, 2016). Também, a mesma nanoemulsão quando administrada por via oral em ratos, testando edema de patas, demonstrou propriedades anti-edematosas e antioxidantes e não demonstrou efeitos tóxicos, indicando assim, que possui potencial aplicação no tratamento de doenças inflamatórias (HÄDRICH *et al.*, 2016).

Com base nisso, neste trabalho procuramos comparar os efeitos da administração IP e IN da QU-N, uma vez que esta apresenta diversas ações antioxidantes e neuroprotetoras em relação ao AVC, além do que estudos com nanocarreadores mostram resultados significativos quando trata-se da distribuição de fármaco ao SNC (KUMAR *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Comparar os possíveis efeitos neuroprotetores da administração de nanoemulsão contendo quercetina por via intraperitoneal e intranasal em um modelo de hemorragia intracerebral em ratos *Wistar*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a passagem dos nanocarreadores desenvolvidos pela mucosa nasal suína, utilizando-se o teste da permeação *ex vivo* com células do tipo Franz, comparando-se a nanoemulsão com a quercetina na forma livre;

- Analisar se a nanoemulsão contendo quercetina administrada por via intranasal é capaz de minimizar as possíveis mudanças comportamentais motoras induzidas pela hemorragia intracerebral e se esse efeito é diferente do que quando administrada por via intraperitoneal;

- Investigar se a nanoemulsão contendo quercetina é capaz de alterar o tamanho do hematoma causado pela hemorragia intracerebral em ratos e se esse efeito depende da via de administração.

Manuscrito

Manuscrito a ser submetido ao periódico Nanotechnology.

COMPARISON OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF INTRANASAL AND INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF QUERCETIN-LOADED NANOEMULSION IN *WISTAR* RATS SUBMITTED TO INTRACEREBRAL HEMORRHAGE

M S Marques^{1,3}, M F Cordeiro^{1,3}, M A G Marinho^{1,3}, C O Vian², G R Vaz^{4,5}, C L Dora^{4,5} and A P Horn^{1,2,3*}.

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

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, ⁵Laboratório 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 6987, e-mail: anapaulahorn@pq.cnpq.br.

Abstract: Stroke is currently a major public health problem worldwide. It is estimated that intracerebral hemorrhage (ICH) is responsible for 10% to 15% of all strokes. Despite the considerable advances made in recent years in the understanding and treatment of central nervous system (CNS) disorders, specifically targeting the brain using the current pharmaceutical alternatives is still a major challenge. In an attempt to investigate new drugs to be used in SNC disorders, we compared the effects of a quercetin-loaded nanoemulsion (QU-N) in a collagenase-induced ICH model in rats using two routes of administration: intraperitoneal (IP) and intranasal (IN). The lipid nanocarriers were prepared using the hot solvent diffusion associated with the phase inversion temperature method. In this study, the animals were subjected to ICH and treated with a daily dose of QU-N IP (30 mg/kg⁻¹) or IN (0.25 mg/kg⁻¹) for three days. Three behavioral tests were performed: open field, beam walking and foot fault, at 24, 48 and 72 h, respectively. At the end of the experiment, the brains were removed and the size of the hematoma was quantified. An *ex vivo* permeation test was performed in order to evaluate the release profile of QU in porcine nasal mucosae. As a result, QU-N presented better permeation pattern when crossing the porcine nasal mucosae compared to free QU, thus providing evidence that nanoencapsulation could improve the nose-brain passage. The animals treated with QU-N via IP had a significant improvement in the behavioral tests as well as in the hematoma size, while the animals treated by the IN route presented significant alterations only in the behavioral tests. The amount of QU administered by IN was less than 1% of the amount administered via the IP route and even at such a low amount the animals responded positively to the behavioral tests, thus suggesting that if more daily and / or for a longer period of time could also reflect the results of hematoma size. These results suggest that the QU-N used in this study may be promising for future studies on ICH treatments.

Keywords: quercetin, nanotechnology, intracerebral hemorrhage, intraperitoneal, intranasal.

1. INTRODUCTION

Stroke is classically characterized as a neurological deficit attributed to an acute central nervous system (CNS) disease through a vascular cause, including cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage (ICH), which are the leading causes of disability and death in the world (SACCO *et al.*, 2013).

ICH accounts for 10% to 15% of all strokes (KRISHNAMURTHI *et al.*, 2013), however, it is the most severe form of the acute cerebrovascular disease with high mortality rate: 30% to 50% of patients die within the first 30 days. Of the patients who survive, only 20% regain independence within six months (MA *et al.*, 2011). This pathology is associated with high rates of morbidity and mortality in the world population. According to estimates by the World Health Organization (WHO), stroke is the second leading cause of death in the world, behind only from heart disease, causing 5.8 million deaths, equivalent to 10% of the total (KRISHNAMURTHI *et al.*, 2013).

ICH is characterized by extravasation of blood to the intracerebral parenchyma and consequent hematoma formation in the brain, leading to edema and nerve tissue damage (KATSUKI, 2010). The main pathological consequences of ICH are the formation of a hematoma, which expands for hours or even days; the formation of edema in the affected region, which begins immediately after vessel rupture and increases until days after injury; the massive death of neurons and glial cells in the affected region and the glial activation in the peri-hematoma region, responsible for intense local inflammatory response (GALHO *et al.*, 2016; KATSUKI, 2010; XI; KEEP; HOFF, 2006).

The most affected brain area is the basal ganglia, more specifically the striatum. This area performs functions related to active movement, preparation or initiation of behavioral responses, responses to visual stimuli, and information processing related to motor skills (GALHO *et al.*, 2016; MACLELLAN *et al.*, 2009).

Many stroke survivors have some degree of motor impairment that limits functional status after stroke (BAJAJ *et al.*, 2016). People with right hemisphere lesions, for example, may present hemineglect to sensory stimuli contralateral to the injured hemisphere (MAGLIARO; MATAS, 2009; SOARES, 2012). It is known that the nervous system is responsible for giving rise to different forms of behavior, therefore, behavioral observation can be considered an essential way for the evaluation of neural functions (FERNANDES; CAVALCANTE; MESTRINER, 2014). Therefore, the use of behavioral tests aimed to evaluate motor damage after stroke is extremely important in the study of compounds that can be used as a treatment for this pathology (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010; GOLDSTEIN *et al.*, 2012; ZHANG, L. *et al.*, 2002).

Although considerable advances have been made in recent years for the understanding and treatment of CNS disorders, it is still a major challenge to specifically target the brain using the current pharmaceutical alternatives (BODE *et al.*, 2016). One of the obstacles a drug needs to overcome to reach the brain is the blood-brain barrier (BBB) which is one of the most controlled barriers in our body (FREESE *et al.*, 2017). The transport of drugs through the BBB represents a particularly important challenge due to its low intrinsic permeability and the presence of active effluent carriers (PARDRIDGE, 2012). Only molecules with less than 5,000 Daltons, lipophilic and electrically neutral, diffuse passively through the BBB. Therefore, several strategies are being developed to improve the amount and concentration of therapeutic compounds in the brain (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995; FATTAL; VAUTHIER, 2006).

Recent advances in nanotechnology have provided superior opportunities in the management of CNS diseases. The loading of a drug into a suitably formulated nanocarrier can increase drug concentrations in brain cells compared to the drug alone if this nanocarrier is able to cross the BBB and accumulate in the correct neuronal cell. This increment can be attributed to specific functionalities within the nanocarrier which makes it more able to cross the BBB than the drug on its own (WEN *et al.*, 2017).

Quercetin (QU) (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavone) comes from the Latin word “Quercetum”, meaning oak forest, belongs to the class called flavonols that cannot be produced in the human body (SUGANTHY *et al.*, 2016). It is a polyphenol belonging to the class of flavonoids that is present in a wide variety of plants and foods, such as onions, grapes, apples, cherries, broccoli, and products such as juices, teas, and wines (ADEDARA *et al.*, 2017; CHAMORRO *et al.*, 2016; HÄDRICH *et al.*, 2016). The use of flavonoids such as QU has been tested in in vitro and in vivo studies (ELUMALAI; LAKSHMI, 2016; POGAČNIK *et al.*, 2016). Recent studies have demonstrated positive results of using it in degenerative diseases of the nervous system such as multiple sclerosis, Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's and in acute diseases such as ICH (AY *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2017; PLEMEL *et al.*, 2015; ZHANG, Y. *et al.*, 2015).

The estimated dietary intake of QU ranges from 4 to 68 mg/day, with a probability of increasing to 200-500 mg/day in individuals who consume large quantities of fruit and vegetables rich in flavonoids. In addition, QU is sold as a dietary supplement with a recommended dosage of 1 g/day (ADEDARA *et al.*, 2017). In the human diet, QU intake can reach high levels (DAJAS, 2012; ELUMALAI; LAKSHMI, 2016), however, the use for clinical application is highly impaired by its low oral bioavailability (PATEL *et al.*, 2012). In addition to its low aqueous solubility, QU is a substrate of both the intestinal efflux (P-glycoprotein and MRP2) (CHABANE *et al.*, 2009) and cytochrome P450 (CYC3A) enzymes (CHOI; PIAO; KANG, 2011). As a consequence, the oral bioavailability of this flavonoid in humans is low, around 2% (MORENO *et al.*, 2017).

A promising approach to improving the water solubility of lipophilic drugs such as QU consists of incorporating them into lipid nanocarriers, like nanoemulsions, once such systems are capable of protecting the drug from degradation, improving drug bioavailability, and controlling the release of the drug. Drug formulation studies represent a crucial key to the development of a successful drug delivery formulation (HÄDRICH *et al.*, 2016).

Previous studies have shown significant improvements in quercetin-loaded nanocarriers (QU-N) treated animals compared to free QU after ICH, using only the intraperitoneal (IP) administration route (GALHO *et al.*, 2016). Thus, we used a new route of intranasal (IN) administration because several studies have already shown this route to be a non-invasive method of circumventing BBB and taking the drug to the CNS (BENEDICT *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2012; LOCHHEAD; THORNE, 2012). Intranasal administered drugs reach the brain directly through the olfactory neuroepithelium using the paracellular or transcellular pathways and-or through the trigeminal pathway (ILLUM, 2000; KUMAR *et al.*, 2008). Both the olfactory and trigeminal nerves innervate the nasal cavity, providing a direct connection to the CNS. Intranasal delivery of drugs targeting the CNS is now an alternative route for drug administration (ILLUM, 2000; VYAS *et al.*, 2005). In view of the foregoing, the aim of the study was to compare the protective effects of IP and IN of QU-N administration in a model of ICH in rats.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Materials

Quercetin, 12-hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (PEG 660-stearate/Solutol HS15®), castor oil, type VII collagenase (COL-VII), ethanol, acetone, and phosphoric acid were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Hydrogenated soybean lecithin (SbPC/lipoid S75-3N) was purchased from Lipid (Ribeirão Preto, Brazil). High-pressure liquid chromatography (HPLC) grade methanol was purchased from Pareac® (Barcelona, Spain) and HPLC grade water was prepared using a Milli-Q system from Millipore (Billerica, USA).

2.2. Preparation of quercetin nanoemulsion

The QU-N was prepared by a hot solvent diffusion method associated to phase inversion technique (PIT) (DORA, 2010; GALHO *et al.*, 2016; HÄDRICH *et al.*, 2016). Briefly, a mixture of castor oil (150 mg) and lecithin (20 mg) in acetone: ethanol (60:40, v/v; 5 ml) at 60°C was added to an aqueous phase (50 ml) containing the PEG-660 stearate (1.5%) surfactant 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 (239 mbar, 5 min; 58 mbar, 3 min; 23 mbar, 9 min) and the final volume reduced to 20 ml, to ensure that the final formulation contained no organic solvent. Finally, the colloidal suspensions were filtered through an 8 µm filter cellulose nitrate. For the preparations of QU-N 10 mg of QU was added to the organic phase of the formulation. Still, free quercetin was solubilized in castor oil in the same proportion as QU-N.

2.3. Particle size and zeta potential measurements

The particle size and zeta potential of the nanoemulsion 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 κ_B is Boltzmann's constant (J/K), T is the temperature (in K), D is the diffusion coefficient and η is the viscosity of the medium – water in this case ($\eta = 0.89$ cP at 25°C). For zeta potential measurements, the samples were diluted in ultrapure Milli-Q® water and placed in the electrophoretic cell where an alternating voltage of ± 150 mV was applied. The zeta potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation. The analyses were performed in triplicate batches (n=3) (GALHO *et al.*, 2016).

2.4. QU content determination and nanoemulsion recovery

The QU content and recovery in the nanoemulsion was determined by HPLC using a Perkin Elmer Flexar System HPLC (Perkin Elmer Inc., United States) coupled to Photodiode Array detector, set at 369 nm, quarternary pump, and automated sampler. The stationary phase used was a reversed-phase C18 zorbax eclipse plus (4.6 mm x 150 mm x 5 µm) column. The mobile phase was composed of methanol: Milli-Q® water (55:45 v / v, pH adjusted to 2.7 with 1% phosphoric acid) and was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL min⁻¹ at 40°C (+- 1°C). The injection volume of the analyses was 20 µl.

The HPLC method was validated according to the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005). The calibration graph for QU was linear over the range of 0.25 to 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.9996. The regression equation of the media calibration graph ($n = 3$) was $y = 74799x - 4150,8$. The variance analysis (ANOVA) confirmed the linearity of the method ($F_{\text{caln}} > F_{\text{critical}}$; $P = 0.05$). The LOD and LOQ calculated for HPLC were 0.12903 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ and 0.39099 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectively, indicating that the method was sufficiently sensitive to determine the QU content in the colloidal suspensions. 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 μg 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. Detailed QU-N physico-chemical characteristics are represented in table 2.

2.5. *Ex vivo* drug release behavior

Ex vivo study on porcine nasal mucosae was performed using Franz diffusion cell. The nasal mucosae were maintained for 30 minutes at simulated nasal fluid (SNF) pH 6.4 (NaCl 8,766 mg/mL, KCl 2,98 mg/mL, NaH_2PO_4 0,8998 mg/mL, Na_2HPO_4 0,4258 mg/mL, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5549 mg/mL). Nasal mucosae with a contact area of 2.268 cm^2 were mounted on receptor compartment of the Franz diffusion cells (diameter 10 mm, 12 mL volume), with dermal face in contact with acceptor SNF medium containing polyethylene glycol 400 (70:30, v/v). Two experimental sets in triplicates were performed keeping the temperature at 37 ± 1 $^\circ\text{C}$, 400 rpm. The formulation/drug suspension of 5 mg/mL (QU-N or QU free) was applied on the outer surface of the nasal mucosae. One milliliter of the sample was withdrawn from receptor compartment at 2, 4, 8, 10 and 12 h duration and replaced with 1 mL of fresh medium acceptor to maintain *sink* conditions. Samples were analyzed using HPLC to calculate the drug released from the membrane into the acceptor medium, and calculation was done accordingly in order to determine the diffusion kinetics. At the end of the set time (12 h), the porcine nasal mucous membranes were removed from the diffusion cells, and excess of unabsorbed nanoemulsion was removed by mucosal cleaning with three jets methanol apical side of the mucosae. Furthermore, an absorbent paper was used to remove excess moisture. Mucous membranes exposed to nanoemulsion were fragmented and transferred to volumetric flasks of 10.0 mL and subjected to overnight extraction with methanol.

2.6. *Animals*

Fifty-one *Wistar* rats, male, heterogenic, weighing around 350–400 g were used in this study. The animals were kept in conventional cages, with standard conditions of temperature (22 $^\circ\text{C} \pm 2$ $^\circ\text{C}$) and relative humidity (60%–80%), and light/dark cycle of 12 h. Four animals were kept in each cage. For environmental enrichment, a roll of cardboard was placed every day in the cages. This experimental protocol was carried out in accordance with the Brazilian law and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of the Rio Grande (FURG) (license number P066/2015). For all procedures, the animals were randomly assigned to the different treatment groups.

2.7. *Intracerebral Hemorrhage induction*

ICH was performed according to the model described by Rosenberg and collaborators, with some modifications (KIM *et al.*, 2007; ROSENBERG *et al.*, 1990). The animals were anesthetized with a ketamine (90 mg/kg⁻¹; Dopalen) and xylazine (13 mg/kg⁻¹; Anasedan) IP injection and placed in the stereotaxic surgery apparatus. ICH was induced by stereotaxic injection of collagenase type VII (Sigma) using a Hamilton syringe in the coordinates corresponding to the left striatum (3 mm medium-lateral; 0 mm anteroposterior and 5 mm ventral from bregma) (PAXINOS; WATSON, 2013). We used 0.23 U of collagenase type VII in 2 µl of the saline solution (AHMAD *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2007; LEKIC *et al.*, 2011). Immediately after the procedure, animals received subcutaneous administration of 5 mg/kg meloxicam for analgesia (ANTUNES, 2013).

2.8. Experimental groups

The animals were randomly assigned to be subjected to four different treatments (Table 1). The formulations were given by an IP injection (30 mg/kg⁻¹ body weight) or IN administration (0,25 mg/Kg⁻¹) 2 h after surgery and following the experimental days (next 3 days). An overview of the experimental groups is represented in table 1.

Table 1. Experimental groups.

GROUPS	
ICH	Hemorrhage
H+B.P	Hemorrhage + nano blank (peritonially)
H+B.N	Hemorrhage + nano blank (nasally)
H+Q.P	Hemorrhage + nano quercetin (peritonially)
H+Q.N	Hemorrhage + nano quercetin (nasally)

2.9. Doses and administrations of quercetin

The QU dose for IP administration was 30 mg/kg⁻¹, once this dose was already shown to exert neuroprotective effects for both occlusive ischemia and ICH (AHMAD *et al.*, 2011; GALHO *et al.*, 2016). The dose for QU IN delivery was 0,25 mg/Kg⁻¹, corresponding to approximately 50 µl, 25 µl in each side (HANSON *et al.*, 2009). The nanoemulsion without the drug (nano "blank") or QU-nanoemulsion were administered to the animals IP or IN once daily for 3 days starting 2 h after injury induction. After euthanasia (3 days after injury), the site of injection/inhalation were macroscopically evaluated for the investigation of possible irritant effects of the administration of QU-N in the peritoneum or in the nasal mucosae.

2.10. Behavioral evaluation of the animals

Analysis the motor behavior was performed through 3 tests:

2.10.1. Open field test:

The open field test was used to evaluate general locomotor activity. The test was performed 24 h after ICH. The apparatus consisted of a wooden box (60 × 45 × 50 cm) with 12 15×15 cm squares drawn on the floor. The total number of crossings (passage of the animal with the four limbs from one square to another) and the number of rearings (standing on hind limbs) within 5 min were counted. The following scores values were used for crossings: 0 (more than 14 crossings), 1 (between 10 and 14 crossings), 2 (between 5 and 9 crossings), 3 (between 0 and 4 crossings). For the rearings, the following scores values were used: 0 (more than 10 rearing), 1

(between 8 and 10 rearing), 2 (between 4 and 7 rearing), 3 (between 0 and 3 rearing) (VIANNA *et al.*, 2001).

2.10.2. Beam walking test:

The beam walking apparatus consisted 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 24 h before ICH to enter a dark box parting from an illuminated 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 h after lesion. The time taken by the animal to cross the bar was counted (with a maximum time of 2 min) 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 2 min without losing balance), 1 (stumbled 1 or 2 times sideways), 2 (stumbled more than three times), 3 (did not move for all the length of the shaft in less than 2 min or fell) (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010).

2.10.3. Foot fault test:

The animals were submitted to the foot fault test 72 h after ICH, 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 cm². The number of failed attempts to place a paw on the grid, letting it go through the openings was counted. The percentages of errors for each side of the body were compared (ROGERS *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2002).

2.11. Measurement of the hematoma size

At the end of the recovering time (3 days) the animals were euthanized by intraperitoneal injection of a lethal dose (100 mg/kg⁻¹) of thiopental sodium (ARTWOHL *et al.*, 2006). After that, the brains were removed, fixed for a period of 12 hours with 10% formaldehyde and then in 30% sucrose for two days (average time for them to submerge). Finally, the brains were coronally sectioned (13 µm) in a cryostat (Leica CM 1860), photographed (Olympus SZX16, Olympus SC30 camera) and quantified using ImageJ *software* (version 1.48).

2.12. Experimental design

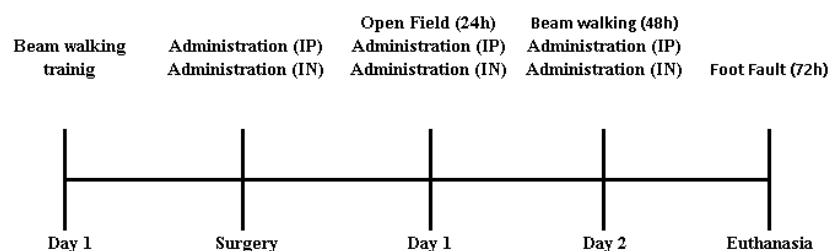


Figure 1. Experimental design: Beam walking training 24 h before ICH (day 1 before surgery). Surgery for induction of ICH and treatments (IP and IN) 2 h after the same. Open field test 24 h after ICH and treatments (IP and IN) (day 1 after surgery). Beam walking test 48 h after ICH and treatments (IP and IN) (day 2 after surgery). Test foot fault, 72 h after ICH followed by euthanasia.

2.13. Statistical Analysis

The results were tested for normality and analyzed by ANOVA followed by Tukey's test using the GraphPad Prism version 5 for Windows (trial version, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In all cases, a significance level of at least 5% was used ($p < 0.05$) (JERROLD, 1999).

3. RESULTS

3.1. Nanoemulsion characterization

A nanoemulsion displaying mean particle size of approximately 20 nm and polydispersed index of 0.20 was obtained by the hot solvent diffusion technique associated with the PIT method, as described in material and methods section. The drug content and the entrapment efficiency were approximately of 1.5 mg ml^{-1} and 99.5%, unloaded nanocarriers were analyzed and the results were similar respectively as shown in Table 2.

Table 2. Physico-chemical characteristics of quercetin loaded nanoemulsion. PDI = polydispersity index, NE = nanoemulsion. Values were expressed by mean \pm SD.

NE	Size (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	QU content (mg ml^{-1})	Recovery (%)
NE	19.32 ± 0.41	0.14 ± 0.011	-5.12 ± 0.60	-	-
QU-N	19.25 ± 0.20	0.20 ± 0.004	-5.34 ± 0.50	1.49 ± 0.02	99.5 ± 0.1

3.2. Ex vivo drug release behavior

Figure 2 shows the *ex vivo* release kinetics of QU-N and free QU in simulated nasal fluid:polyethylene glycol 400 (70:30, v/v) at 37°C . Release experiments were conducted at pH 6.0 in *sink* conditions. This study demonstrated that the QU-N permeated better the porcine mucosae than the free QU. While $16.67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $15.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $16.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of QU were obtained after eight, ten and twelve hours of QU-N permeation, respectively, $1.49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $1.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $5.69 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ was observed for the free QU.

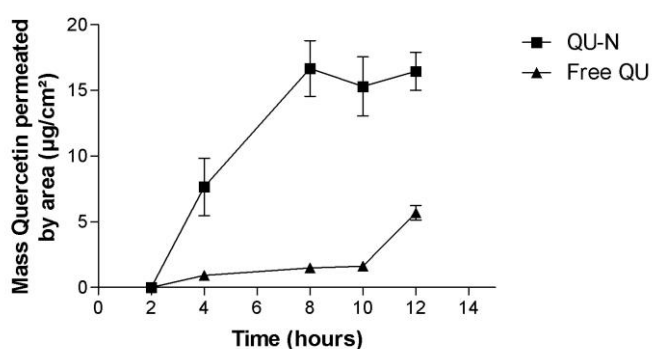


Figure 2. Mass of quercetin permeated by area ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in the Franz cell and quantified by HPLC. Quercetin-loaded nanoemulsion (square) and free quercetin (triangle). Values were expressed by mean \pm SD ($n=3$).

3.3. Influence of administration of QU on behavioral tests

3.3.1 Open Field

The number of crossings (locomotor activity) and rearings (exploratory position) were assessed 24 h after ICH induction (figures 3 (a) and (b) respectively). The results have shown a difference in the number of crossings and rearings in compared to animals which suffered ICH, confirming the impairment in the locomotor and exploratory activities caused by the pathology. It was also observed that animals treated with QU-N (IP and IN) there was a significant score decrement of 36 and 42% (IP and IN) respectively. Regarding the rearings, only animals treated via IP had a significant reduction of around to 42%.

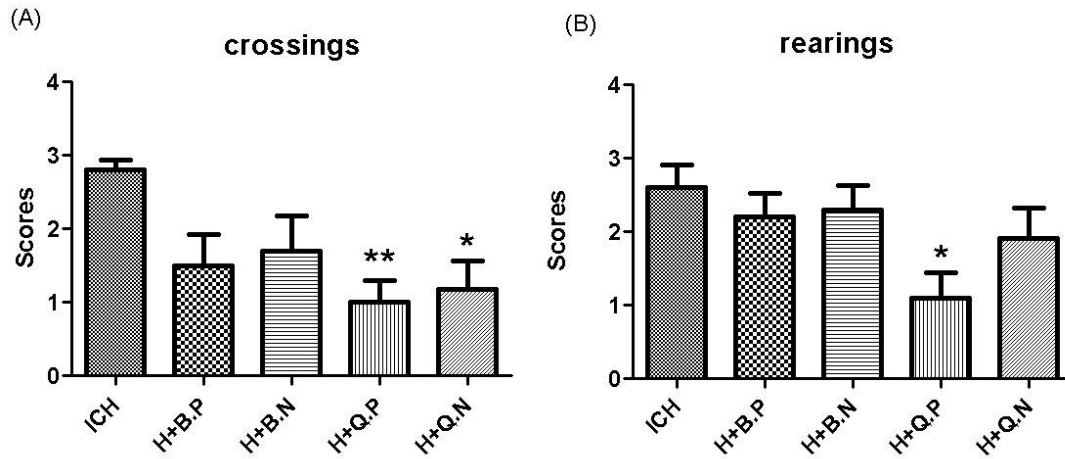


Figure 3. Open field test performed 24 h after ICH. The number of crossings (a) and of rearings (b) were counted for 5 minutes. The groups: ICH; H+B.P; H+B.N; H+Q.P; H+Q.N, respectively, Hemorrhage; Hemorrhage + nano blank (peritoneally); Hemorrhage + nano blank (nasally); Hemorrhage + nano quercetin (peritoneally); Hemorrhage + nano quercetin (nasally). (ANOVA followed by Tukey' test, n=10–11, * p<0.05; ** p<0.01).

3.3.2. Beam walking

In the beam walking test (locomotor activity, balance, and motor skill evaluation), carried out 48 h after ICH (figures 4), we observed a significantly higher score in the animals subjected to ICH without treatment, which indicates more severe neurologic damage. However, among the treated animals, there was a significant score decrement only on those treated with QU-N IP, around to 58%.

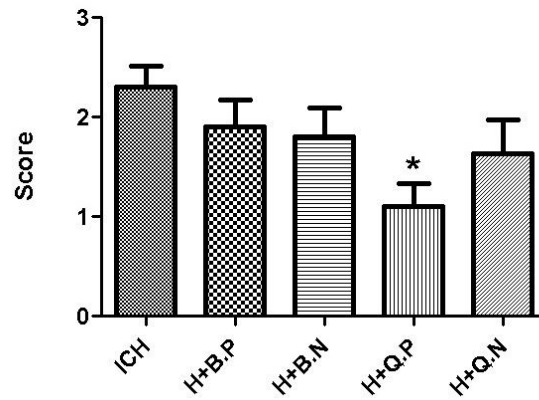


Figure 4. Beam walking test performed 48 h after ICH. The locomotor capacity and the balance of the animals were scored as described in the methods section at 48 h after the stereotaxic surgery. The groups: ICH; H+B.P; H+B.N; H+Q.P; H+Q.N, respectively, Hemorrhage; Hemorrhage + nano blank (peritoneally); Hemorrhage + nano blank (nasally); Hemorrhage + nano quercetin (peritoneally); Hemorrhage + nano quercetin (nasally) (ANOVA followed by Tukey’ test, n=10–11, * p<0.05).

3.3.3. Foot Fault

In the motor skill test on grids (fine motor skill), carried out 72 h after ICH, the percentage of motor errors occurred in all ICH groups, always higher on the right side (contralateral to the lesion), which indicates severe neurologic damage (Figure 5(a)). When the percentage of falls with the right (contralateral) limbs minus the percentage of falls with the left (ipsilateral) limbs was calculated, a statistical difference was observed in QU-N IN group, around 33% (figure 5 (b)).

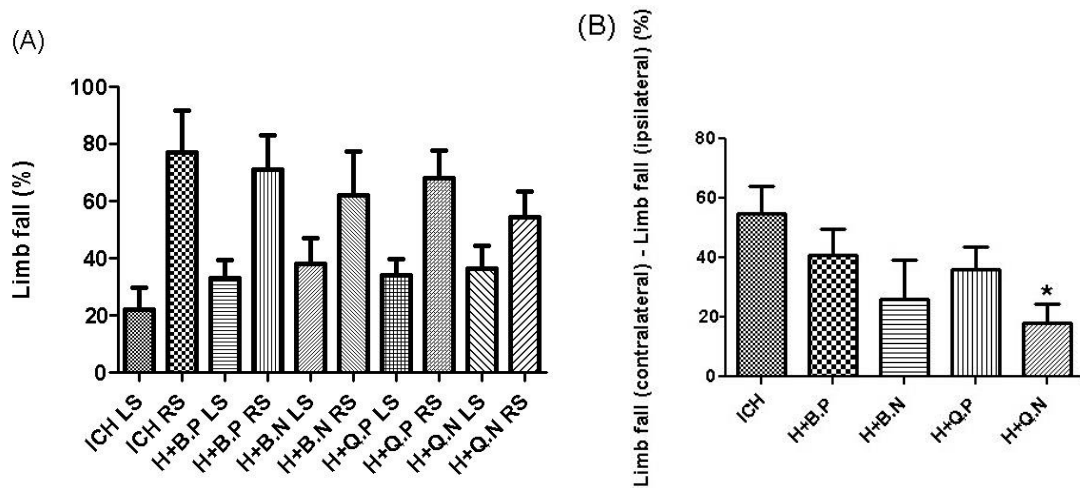


Figure 5. Foot fault test performed 72 h after ICH. (a) The percentage of motor errors with the contralateral (right limbs—RS) and ipsilateral (left limbs—LS) is shown 72 h after ICH and in all ICH, groups the foot slips were mainly made by the lesion contralateral side. (b). The percentage of falls with the right (contralateral) limbs minus the percentage of falls with the left limbs (ipsilateral) was calculated, statistical difference was observed in H+Q.N groups. The groups: ICH; H+B.P; H+B.N; H+Q.P; H+Q.N, respectively, Hemorrhage; Hemorrhage + nano blank (peritoneally); Hemorrhage + nano blank (nasally); Hemorrhage + nano quercetin (peritoneally); Hemorrhage + nano quercetin (nasally). (ANOVA followed by Tukey’ test, n=10–11, * p<0.05).

3.4. Assessment of hematoma size

In an attempt to understand how QU-N could influence in one of the most important ICH consequences, the hematoma area was measured in all groups (Figure 6). We observed that the QU-N IP was able to significantly reduce the hematoma area around to 52% when compared to the control group. This decrease in hematoma size was not observed in the other treatments.

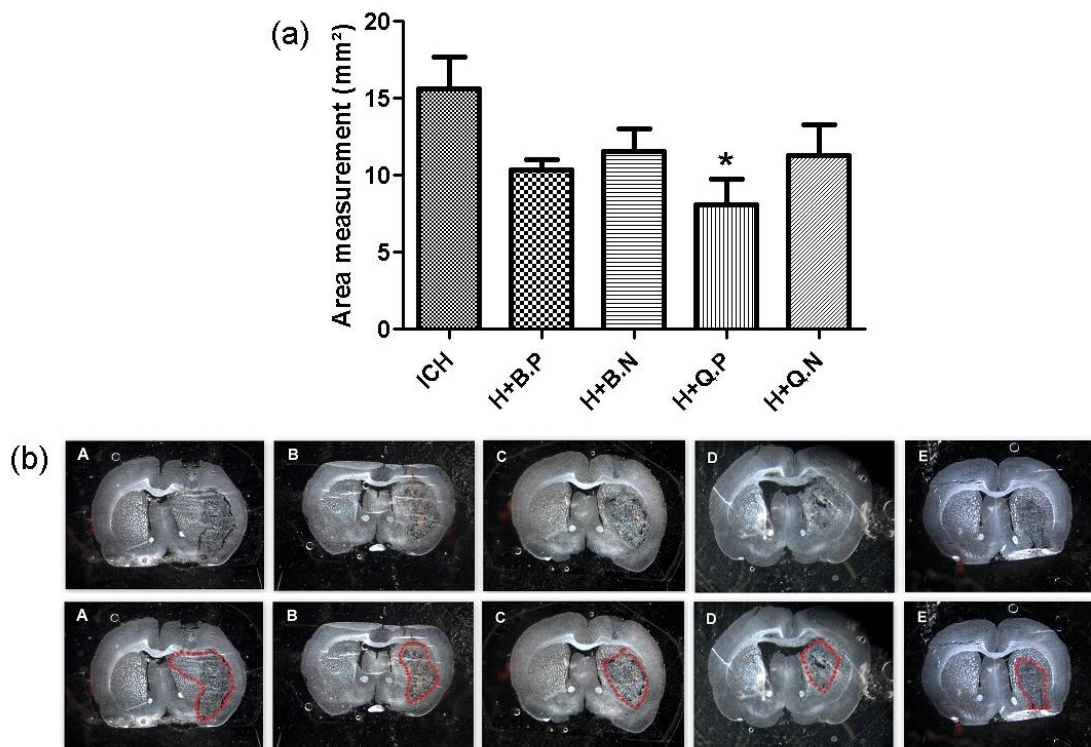


Figure 6. Hematoma size 72 h after ICH. (a) The area of the hematoma was measured by tracing the perimeter of the infarct. (b) Representative images of the brains from the groups: ICH; H+B.P; H+B.N; H+Q.P; H+Q.N, respectively, A; B; C; D; E. (ANOVA followed by Tukey' test, n = 5; * p <0.05).

4. DISCUSSION

In this work, we compared the protective effects of QU-N using two routes of administration (IP and IN) after the induction of ICH in *Wistar* rats.

Firstly, we performed *ex vivo* permeation using the Franz-type diffusion cell technique to evaluate the permeation profile of free QU and QU-N by the porcine nasal mucosae. It is considered that, in order to reach the CNS using the IN route satisfactorily, the drug must first be able to penetrate and permeate through these mucosae (RICHTER, 2015). QU started to be detected from the fourth hour, but can only be quantified in the receiving fluid from the eighth hour of the experiment, both from QU-N and QU in its free form. Our results showed that the QU-N presented better permeation pattern when crossing the porcine nasal mucosae compared to free QU (Figure 2). The permeation of the drug by the nasal epithelium is a very important factor to evaluate, once the clinical efficacy of a drug depends not only on its pharmacological properties

but also on its bioavailability. *Ex vivo* permeation studies using a porcine nasal mucosae offer advantages over *in vivo* studies as they can be performed more quickly and following more simplified analytical procedures (BARBI, 2011). Also, the *ex vivo* test performed in this study has an ethical advantage, once the mucosae was obtained from slaughter pigs, avoiding the sacrifice of animals exclusively for this end. The *ex vivo* technique is efficient, economical and can be used in the preliminary stages of the development of new release systems, helping in the choice of the best input and the best pharmaceutical form for IN administration (CARVALHO, 2012). Our results indicate that QU-N administrated IN promoted drug absorption, primarily because of the ability of the formulation to cross the mucosae (Figure 2). This is due to the fact that polyphenols, when nanoencapsulated, have benefits compared to their free form, once this compound is protected from degradation and its solubility is increased (GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014).

ICH is the most severe type of stroke, and hematoma volume is a major determinant of this outcome. The hematoma expansion occurs mainly in the first 24 h after the onset of the disease and leads to secondary neurological deterioration, such as compression of the neural tissue and formation of edema (CHANG *et al.*, 2017; SHERREFA; JIPING; JOHN, 2017). Subsequently, secondary damage activates cytotoxic and inflammatory cascades (ZHOU *et al.*, 2014), which contribute substantially to neurological deterioration in ICH patients (CHANG *et al.*, 2017; WANG, 2010). Clinical evidence shows that hematoma size and expansion are the main determinants of ICH results, both in humans (BRODERICK *et al.*, 1993) and in rodents (CHANG *et al.*, 2017; MACLELLAN *et al.*, 2009).

Our results showed a reduction in the size of the hematoma in the animals treated with QU-N via IP administration, a result that was not observed following IN treatment (Figure 6). Galho *et al.* (2016) compared the effects of QU-N with its free form on an ICH model in rats induced by collagenase. These animals were treated with a single IP dose of the drug (free or nanoemulsion) and had a reduction in hematoma size in the two treated groups, but when evaluated the antioxidant effect, the group that had the incorporation in nanoemulsion (NE) had an increase in this effect, thus reflecting the behavioral outcomes. Our results were similar to those of the author with respect to the IP route, once hematoma size and behavioral impairments had significant reductions (Figures 3, 4 and 6); however, for the IN route, the same results were not observed when compared to the control group. So, we conclude that using the dose and administration protocol performed in this work, QU-N was not sufficient to alter this parameter.

With the method used to nanoemulsifying QU, we were able to nanoencapsulated large amount of the flavonoid ($1,5 \text{ mg/ml}^{-1}$), however, the routes of administration differed greatly with respect to the amount of QU administered to the animal. In our experiment, a daily application of the formulation (IP or IN) was carried out, summing up to 3 applications. In a rat of approximately 300 g, about 9 mg of QU was injected using the IP route, whereas using the IN route, the amount of QU was reduced to only 0,075 mg, this is less than 1% of what was injected into the IP route. This shows a very large difference in the amount of QU administered by the two routes. In spite of having almost a hundred less QU after IN administration, we observed important behavioral alterations in open field and foot fault tests, suggesting this route to be promising to future ICH treatment.

The behavioral tests performed in our study were used to evaluate the exploratory behavior, balance, asymmetry and fine motor coordination, revealing motor deficits in animals after ICH (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010; MESTRINER, 2013; SONG *et al.*, 2016). Our results show that QU-N, administered both via IP and IN, significantly reduced motor deficits in the animals when compared to the control group (Figures 3-5), confirming the data presented by GALHO *et al.* (2016) and MANDAL *et al.* (2016).

The open field test was used to measure motor coordination and exploratory behavior in rats after ICH (MEHTA; PARASHAR; UDAYABANU, 2017; MESTRINER, 2013). The test was performed 24 h after injury, and our results showed significant improvement in the number of crossings of the animals from the QU-N treated groups by both the IP and IN pathway when compared to the control group (Figure 3 (a)). Still, with respect to the exploratory behavior, verified through the number of rearings, it was observed that only the IP route obtained significant improvements (Figure 3 (b)). The beam walking test was performed to assess asymmetric balance and coordination in the animals and was performed 48 h after ICH. In order for the animals to perform the test correctly, 24 h before the surgery they were trained twice so that they could learn how to behave in the device on the day of the test. In our study, all animals in the ICH group had difficulty in crossing the course, losing balance and coordination. However, animals receiving QU-N via IP had statistically less difficulty in comparison to the control group, a result that was not observed in the IN group (Figure 4). The foot fault test, which measures the motor and fine motor coordination of the animals, was performed 72 h after induction of ICH. The animals were submitted to the test for 5 min and the errors made in paw placement (ipsi and contralateral) were quantified. In all groups, the contralateral paw made more errors than the ipsilateral. We did not find statistical differences in the animals treated with QU-N in both the IP and IN pathways compared to the controls (Figure 5 (a)), however, when we decreased the number of falls on the contralateral side with the ipsilateral side we found statistical difference in the QU-N via IN (H + QN) (Figure 5 (b)).

The IN pathway, in turn, is shown to be a non-invasive method of circumventing BBB and take the drug to the CNS (BENEDICT *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2013; LOCHHEAD; THORNE, 2012). The nasal cavity presents special histological and physiological characteristics such as the extensive vascularization, the high permeability of its mucosae and the presence of epithelial microvilli that increase the surface available for absorption. This route of administration also escapes the first-pass effect which allows a rapid onset of therapeutic action and the use of a lower dose of the drug (BRAR; KAUR, 2014). Even in these low amounts, the IN pathway showed a positive behavioral outcome (Figures 3 (a) and 5 (b)) which led us to hypothesize that if more than one daily administration of QU-N was performed via IN and/or for a longer period of days, the results with this route would probably be more expressive. In addition, one of the restrictions with regard to IN administration to the brain is the natural defense mechanism - nasal mucociliary clearance (AHMAD *et al.*, 2017). Thus, in addition to administering a very small amount of the drug in the animals, mucociliary cleaning is probably removing the nanocarriers effectively. We saw in the permeation test that the QU-N absorption occurred very slowly (quantifiable only after 8 h exposure of the mucosae), which leads us to believe that much of what was administered is being purified by the mucus.

From our findings, we can conclude that QU-N reduced the behavioral deficits in both routes of administration. In the *ex vivo* permeation test, the QU-N presented a better permeation pattern when crossing the nasal mucosae in relation to the free QU, indicating the good applicability of the formulation to the IN route. Although the IP route responded better to the size of the hematoma than the IN route, the limitations on the amount of QU administered are an aspect that should be taken into account in later studies. So, we conclude that the QU-N presents a promising treatment for ICH. However, for possible future uses through the administration of IN, further studies are required using larger doses and more frequent administrations.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from PROCAD/CNPq (grant no. 552457/2011-6) and UNIVERSAL/CNPq (grant n° 447828/2014-2). Magno da Silva Marques, Marcelo Augusto Germani Marinho and Marcos Freitas Cordeiro were fellows from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors declare that they have no conflicts of interest.

6. REFERENCES

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

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.

AHMAD, E. *et al.* Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles. **Nanoscale**, 2017. v. 9, n. 3, p. 1174–1183.

ALVAREZ-ROMÁN, R. *et al.* Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, France, 2001. p. 191–195.

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, S. *et al.* Dominance of the Unaffected Hemisphere Motor Network and Its Role in the Behavior of Chronic Stroke Survivors. **Frontiers in Human Neuroscience**, 27 dez. 2016. v. 10. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2016.00650/full>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

BARBI, M. **Desenvolvimento de Nanopartículas de Quitosana para Administração de Zidovudina**. Araraguara-Brasil: Universidade Estadual Paulista, 2011. Trabalho de Conclusão de Curso.

BENEDICT, C. *et al.* Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. **Experimental Gerontology**, fev. 2011. v. 46, n. 2–3, p. 112–115.

BERAY-BERTHAT, V. *et al.* Long-term histological and behavioural characterisation of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, ago. 2010. v. 191, n. 2, p. 180–190.

BODE, G. H. *et al.* An in vitro and in vivo study of peptide-functionalized nanoparticles for brain targeting: The importance of selective blood–brain barrier uptake. **Nanomedicine**:

Nanotechnology, Biology and Medicine, nov. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963416302015>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

BRAR, V.; KAUR, G. Biopolymers as Carriers for Nasal Drug Delivery. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, 8 out. 2014. v. 53, n. 14, p. 1518–1531.

BRODERICK, J. *et al.* Volume of Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, 1993. v. 24, n. 7, p. 987–993.

CARVALHO, F. C. Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina. 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/102463>>. Acesso em: 2 maio 2017.

CHABANE, N. *et al.* Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Pharmacological**, 2009. v. 11, n. 61, p. 1473–83.

CHAMORRO, V. *et al.* Effects of Quercetin in a Rat Model of Hemorrhagic Traumatic Shock and Reperfusion. **Molecules**, 2016. v. 21, n. 12, p. 1739.

CHANG, C.-F. *et al.* Alternative activation-skewed microglia/macrophages promote hematoma resolution in experimental intracerebral hemorrhage. **Neurobiology of Disease**, jul. 2017. v. 103, p. 54–69.

CHOI, J.-S.; PIAO, Y.-J.; KANG, K. W. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: Role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. **Archives of Pharmacal Research**, abr. 2011. v. 34, n. 4, p. 607–613.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles : current possibilities and future trend. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, 1995. v. 41, n. 1, p. 2–13.

DAJAS, F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of Ethnopharmacology**, set. 2012. v. 143, n. 2, p. 383–396.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, 2016. v. 10, n. 20, p. 84.

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.

FATTAL, E.; VAUTHIER, C. Polymers for Nanoparticle and Nanocrystal Formulations for Drug Delivery. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 30. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2006, p. 1864–1882.

FERNANDES, N. M. T.; CAVALCANTE, L. E. S.; MESTRINER, R. G. **Tarefa de habilidade do alcance e preensão como estratégia de reabilitação na hemorragia intracerebral experimental: revisão sistemática e metanálise**. **Revista da Graduação**, 2014. v. 7, n. 2. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/19341/0>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

FREESE, C. *et al.* Identification of neuronal and angiogenic growth factors in an in vitro blood-brain barrier model system: Relevance in barrier integrity and tight junction formation and complexity. **Microvascular Research**, maio. 2017. v. 111, p. 1–11.

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.

GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A. M.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014, p. 1–23.

GOLDSTEIN, B. L. *et al.* Ventral Striatum Encodes Past and Predicted Value Independent of Motor Contingencies. **Journal of Neuroscience**, 8 fev. 2012. v. 32, n. 6, p. 2027–2036.

HÄDRICH, G.; VAZ, G. R.; *et al.* Anti-inflammatory Effect and Toxicology Analysis of Oral Delivery Quercetin Nanosized Emulsion in Rats. **Pharmaceutical Research**, abr. 2016. v. 33, n. 4, p. 983–993.

_____; MONTEIRO, S. O.; *et al.* Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2 jul. 2016. v. 42, n. 7, p. 1165–1173.

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.

HANSON, L. R. *et al.* Intranasal delivery of deferoxamine reduces spatial memory loss in APP/PS1 mice. **Drug Delivery and Translational Research**, jun. 2012. v. 2, n. 3, p. 160–168.

_____ *et al.* Intranasal Administration of CNS Therapeutics to Awake Mice. **Journal of Visualized Experiments**, 8 abr. 2013. n. 74. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/4440/intranasal-administration-of-cns-therapeutics-to-awake-mice>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. In: Q2B(R1): Guideline on validation of analytical procedure-methodology. [S.l.]: [s.n.], 2005.

ILLUM, L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2000. v. 11, n. 1, p. 1–18.

JERROLD, Z. **Biostatistical Analysis (4th Edition)**. 4. ed. NJ, USA: Prentice Hall, 1999.

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.

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.

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.

KUMAR, M. *et al.* Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. **International Journal of Pharmaceutics**, jun. 2008. v. 358, n. 1–2, p. 285–291.

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.

_____; _____. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, maio. 2012b. v. 64, n. 7, p. 614–628.

MA, Q. *et al.* History of Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage. *In*: ZHANG, J.; COLOHAN, A. (Org.). **Intracerebral Hemorrhage Research**. Vienna: Springer Vienna, 2011, V. 111, p. 3–8. DOI: 10.1007/978-3-7091-0693-8_1.

MACLELLAN, C. L. *et al.* Assessing cognitive function after intracerebral hemorrhage in rats. **Behavioural Brain Research**, mar. 2009. v. 198, n. 2, p. 321–328.

MAGLIARO, F. C. L.; MATAS, S. L. De A.; MATAS, C. G. Cognitive Potential-P300 in patients with right hemisphere ischemic lesion. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, 2009. v. 21, n. 4, p. 285–290.

MANDAL, S. *et al.* Design and evaluation of mucoadhesive microemulsion for neuroprotective effect of ibuprofen following intranasal route in the MPTP mice model. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2 ago. 2016. v. 42, n. 8, p. 1340–1350.

MEHTA, V.; PARASHAR, A.; UDAYABANU, M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. **Physiology & Behavior**, mar. 2017. v. 171, p. 69–78.

MESTRINER, R. G. **Análise do Desempenho Sensório-Motor e da Reatividade Astroglial em Modelos Experimentais de Acidente Vascular Encefálico Isquêmico e Hemorrágico**. POA-Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2013. Tese de Doutorado.

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.

PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of cerebral blood flow & metabolism**, 2012. v. 32, n. 11, p. 1959–1972.

PATEL, A. R. *et al.* Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, jul. 2012. v. 133, n. 2, p. 423–429.

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.

- RICHTER, G. **Desenvolvimento de nanocarreadores contendo curcumina tendo como alvo o sistema nervoso central**. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 2015. Dissertação de Mestrado.
- ROGERS, D. *et al.* Correlation Between Motor Impairment and Infarct Volume After Permanent and Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. **Stroke**, 1997. v. 28, p. 2060–2066.
- ROSENBERG, G. A. *et al.* Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, 1990. v. 21, n. 5, p. 801–807.
- 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.
- SHERREFA, B.; JIPING, T.; JOHN, Z. Hematoma Expansion following Intracerebral Hemorrhage: Mechanisms Targeting the Coagulation Cascade and Platelet Activation. **Current Drug Targets**, 2017. v. 18, n. 16.
- SOARES, S. **Indução de plasticidade cerebral por remoção da matriz extracelular após lesão isquêmica no cortex sensório-motor de ratos**. Belém - PA: Universidade Federal do Pará, 2012. Dissertação de Mestrado.
- SONG, H. *et al.* Capsular stroke modeling based on somatotopic mapping of motor fibers. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, jan. 2016. p. 0271678X1667942.
- SUGANTHY, N. *et al.* Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, dez. 2016. v. 84, p. 892–908.
- VIANNA, M. R. M. *et al.* Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2001. v. 34, n. 2, p. 233–240.
- VYAS, T. K. *et al.* Intranasal drug delivery for brain targeting. **Current drug delivery**, 2005. v. 2, n. 2, p. 165–175.
- 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.
- XI, G.; KEEP, R. F.; HOFF, J. T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. **The Lancet Neurology**, 2006. v. 5, n. 1, p. 53–63.
- ZHANG, L. *et al.* A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**, 2002. v. 117, n. 2, p. 207–214.
- 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.
- ZHOU, Y. *et al.* Inflammation in intracerebral hemorrhage: From mechanisms to clinical translation. **Progress in Neurobiology**, abr. 2014. v. 115, p. 25–44.

3. DISCUSSÃO

Nesse trabalho comparamos os efeitos protetores da QU-N utilizando duas vias de administração (IP e IN) após a indução da hemorragia intracerebral em ratos *Wistar*. O modelo de HI utilizado no presente estudo consiste em uma injeção, no estriado cerebral, de colagenase bacteriana (*Clostridium histoliticum*), uma metaloproteinase que rompe a lâmina basal dos vasos sanguíneos cerebrais, causando sangramento intraparenquimatoso (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010; ROSENBERG *et al.*, 1990). Além de fácil execução, uma das características deste modelo é que a HI é de natureza espontânea, o que se torna mais próximo do que acontece com os humanos, ao contrário do outro modelo de HI, que consiste em injeção de sangue autólogo (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010; MACLELLAN *et al.*, 2009; XI *et al.*, 2006).

MacLellan e colaboradores mostraram que o modelo de colagenase resultou em maior colapso da BHE e dano ao estriado e córtex em relação ao modelo autólogo (MACLELLAN *et al.*, 2009). Além disso, o modelo de sangue autólogo demonstrou uma menor perda de tecido (entre 1 a 6 semanas) em comparação com o modelo de colagenase (MACLELLAN *et al.*, 2009; NEVES, 2015). Assim, o modelo de colagenase se aproxima mais da HI vista em humanos, permanecendo os pacientes muitas vezes com graves déficits ao longo da vida. É importante ressaltar que a colagenase não é tóxica para os neurônios, não influenciando nas alterações decorrentes da lesão secundária após HI (NEVES, 2015). Por esses motivos escolhemos esse modelo para ser utilizado em nosso trabalho.

Num primeiro momento, realizamos teste de permeação *ex vivo* utilizando a técnica envolvendo células de difusão do tipo Franz, a fim de avaliar o perfil de permeação (passagem) da QU e da QU-N pela mucosa nasal suína. Considera-se que, para atingir o SNC utilizando a via IN de forma satisfatória, primeiramente o fármaco deve ser capaz de penetrar e permear através dessa mucosa (RICHTER, 2015). QU começou a ser detectada a partir da quarta hora, mas só pode ser quantificada no fluido receptor a partir da oitava hora do experimento, ambos de QU-N e QU na sua forma livre. Nossos resultados mostraram que o QU-N apresentou melhor padrão de permeação ao cruzar a mucosa nasal porcina em comparação com QU livre (Figura 2). Estes resultados mostram que a formulação de QU-N, utilizada na via IN, promove a absorção do fármaco, principalmente por causa da capacidade da formulação em atravessar a mucosa. Isso se deve ao fato de que os polifenóis, quando nanoencapsulados, possuem benefícios em comparação com a sua forma livre, uma vez que estes compostos são protegidos da

degradação e sua solubilidade é aumentada (GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014).

A permeação do fármaco pelo epitélio nasal é um fator muito importante para se avaliar, uma vez que a eficácia clínica de um fármaco não depende apenas das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua biodisponibilidade. Os estudos de permeação *ex vivo*, utilizando mucosa nasal suína, oferecem vantagens sobre os estudos *in vivo*, uma vez que podem ser executados mais rapidamente e seguindo procedimentos analíticos mais simplificados (BARBI, 2011). A técnica *ex vivo* é eficiente, econômica e pode ser usada nos estágios preliminares do desenvolvimento de novos sistemas de liberação, auxiliando na escolha do melhor insumo e da melhor forma farmacêutica para administração IN (CARVALHO, 2012). Além disso, o teste *ex vivo* realizado neste trabalho possui uma vantagem ética, pois a mucosa foi obtida de porcos de abatedouro, evitando a morte de animais especificamente para esse teste.

Devido a capacidade de solubilização superior, estabilidade termodinâmica e preparação relativamente fácil, as NEs têm sido amplamente exploradas para aumentar a administração IN, com objetivo de facilitar a distribuição do fármaco ao cérebro. Contudo, a regeneração rápida do muco remove eficazmente as NEs aderidas da mucosa nasal, criando assim obstáculos para a sua livre circulação (AHMAD *et al.*, 2017). No presente estudo, nanoencapsulamos a QU em NEs utilizando o método de difusão do solvente a quente, resultando ao término do processo, gotículas extremamente pequenas, em torno de 20 nm, sendo o tamanho diminuto relevante no que se refere a passagem nariz-cérebro (DORA; TAGLIARI, 2010; GALHO *et al.*, 2016).

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).

A HI é o tipo de AVC mais grave e o volume do hematoma é um dos principais determinantes deste desfecho. A expansão do hematoma ocorre principalmente nas primeiras 24 h após o início da patologia e leva à deterioração neurológica secundária, como a compressão do tecido neural e formação de edema (CHANG *et al.*, 2017; GALHO *et al.*, 2016; SHERREFA; JIPING; JOHN, 2017). Subsequentemente, os danos

secundários ativam cascatas citotóxicas e inflamatórias (ZHOU *et al.*, 2014), que contribuem substancialmente para a deterioração neurológica em pacientes com HI (CHANG *et al.*, 2017; WANG, 2010). Evidências clínicas tem mostrado que o tamanho e expansão do hematoma são as principais determinantes dos resultados da HI (CHANG *et al.*, 2017; LOPRESTI *et al.*, 2014), tanto em seres humanos (BRODERICK *et al.*, 1993) como também em roedores (CHANG *et al.*, 2017; MACLELLAN *et al.*, 2006).

Nossos resultados mostraram redução no tamanho do hematoma nos animais que foram tratados com QU-N pela via IP, resultado não observado quando utilizada a via IN (Figura 6).

Galho e colaboradores 2016 compararam os efeitos da QU-N com a sua forma livre em um modelo de HI em ratos induzido por colagenase. Estes foram tratados com uma única dose IP do fármaco (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 NEs, mas quando avaliado o efeito antioxidante, o grupo QU-N obteve aumento nesse efeito, refletindo assim, em resultados de testes comportamentais realizados. Nossos resultados foram semelhantes ao do autor no que tange a via IP, uma vez que, o tamanho do hematoma e os comportamentos tiveram reduções significativas (Figuras 3, 4 e 6), no entanto, quanto à via IN, somente os testes comportamentais mostraram melhoras significativas em comparação ao grupo controle (Figuras 3(a) e 5(b)).

Muitos sobreviventes de AVC apresentam algum grau de comprometimento motor que limita o estado funcional após o AVC (BAJAJ *et al.*, 2016). Indivíduos com lesão no hemisfério direito, por exemplo, podem apresentar heminegligência a estímulos sensoriais contralaterais ao hemisfério lesado (Figura B) (MAGLIARO; MATAS, 2009; MESTRINER, 2013; SOARES, 2012) Os testes comportamentais realizados em nosso estudo serviram para avaliar o comportamento exploratório, equilíbrio, assimetria e a coordenação motora fina e revelam déficits motores em animais após HI (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2010; MESTRINER, 2013; SONG *et al.*, 2016). Nossos resultados mostram que a QU-N, reduziu significativamente os déficits motores nos animais em comparação ao grupo controle HI (Figuras 3, 4 e 5), confirmando os dados apresentados por GALHO *et al.* 2016.

Um dos testes comportamentais realizados foi o campo aberto, que é utilizado para mensurar a coordenação motora e o comportamento exploratório em ratos após HI

(MEHTA; PARASHAR; UDAYABANU, 2017; MESTRINER, 2013). Vinte e quatro horas após a lesão, foi realizado o teste e por um período de 5 min quantificados os cruzamentos “crossings” (quando o animal passa com as 4 patas sobre todo o quadrante) e os levantamentos “rearings” (quando o animal se apoia unicamente sobre as patas traseiras explorando o ambiente com as patas dianteiras). Nossos resultados mostraram melhora significativa nos cruzamentos dos animais dos grupos tratados com QU-N tanto pela via IP quanto IN em comparação com os do grupo controle HI (Figura 3 (a)). Ainda, com relação ao comportamento exploratório, verificado através dos levantamentos, observou-se que somente a via IP obteve melhoras significativas (Figura 3 (b)).

O teste de deslocamento em haste elevada avalia equilíbrio e coordenação assimétrica nos animais, sendo este realizado 48 h após HI. Com o intuito dos animais realizarem corretamente o teste, 24 h antes da cirurgia eles foram treinados duas vezes para que pudessem aprender como deveriam se comportar no aparelho no dia do teste. Quarenta e oito horas após a cirurgia, os déficits de equilíbrio e coordenação foram perceptíveis nos animais quando colocados no aparelho, uma vez que o lado contralateral à lesão fica comprometido em decorrência da HI (MAGLIARO; MATAS, 2009; SOARES, 2012). Em nosso estudo, todos os animais do grupo HI tiveram dificuldade em atravessar o percurso, perdendo o equilíbrio e a coordenação. No entanto, os animais que receberam QU-N por via IP tiveram estatisticamente menos dificuldade em comparação com o grupo controle, resultado que não se manteve no grupo IN (Figura 4).

O teste de motricidade em grade, que mensura a motricidade e a coordenação motora fina dos animais, foi realizado 72 h após indução da HI. Os animais foram submetidos ao teste durante 5 min e os erros cometidos pelas patas (ipsi e contralaterais) foram quantificados. Em todos os grupos, o lado contralateral cometeu mais erros do que o ipsilateral (Figura 5 (a)), o que mostra a eficiência do modelo de HI com collagenase VII utilizado, tendo em vista que os animais acometidos pela HI no lado esquerdo do cérebro tendem a possuir problemas motores no lado contralateral à lesão. Não encontramos diferenças estatísticas nos animais tratados com QU-N tanto na via IP quanto na IN em comparação com os controles HI (Figura 5 (a)), no entanto, quando diminuimos a quantidade de quedas do lado contralateral com as do ipsilateral encontramos diferença estatística no grupo QU-N tratados via IN (H+Q.N) (Figura 5 (b)).

A via IN utilizada em nosso trabalho mostrou melhora na avaliação motora dos animais em dois testes comportamentais, o que não se confirmou na avaliação do tamanho do hematoma nos animais. Já a via IP mostrou diferenças significativas em dois testes

comportamentais, bem como no tamanho do hematoma (Figuras 3-6). Essa correlação entre tamanho do hematoma e respostas comportamentais é esperada, já que a expansão do hematoma leva a mecanismos de lesão secundária, o que acentua a destruição tecidual resultando em danos motores diretos (BARBI, 2011). Nossos resultados confirmaram melhoras dos animais que foram tratados com QU-N contra danos decorrentes da HI. No entanto, quanto às duas vias utilizadas (IP e IN), a que possuiu melhor resposta foi a IP, uma vez que respondeu melhor tanto nos danos motores quanto na avaliação do tamanho do hematoma cerebral.

Com o método usado para nanoemulsionar a QU, conseguimos nanoemulsificar grande quantidade do flavonoide ($1,5 \text{ mg/ml}^{-1}$), no entanto, as vias de administração se diferenciaram bastante no que diz respeito a quantidade de QU administrada ao animal. Em nosso experimento, foi realizada uma aplicação diária da formulação (IP ou IN), totalizando 3 aplicações. Em um rato com aproximadamente 300 g, foi injetado em torno de 9 mg de QU-N utilizando a via IP, enquanto que utilizando a via IN, a quantidade de QU é reduzida para apenas 0,075 mg, isto é menos de 1% do que foi injetado na via IP. Mesmo nessas quantidades tão baixas, a via IN mostrou resultado comportamental positivo (Figuras 3 (a) e 5 (b)), o que nos leva a crer que, caso fossem realizadas mais de uma administração diária de QU-N via IN e/ou por período maior de dias, provavelmente os resultados com relação a esta via seriam mais expressivos.

Quando analisamos as vias de administração, temos como a maior vantagem da via IP o fornecimento, relativamente, de altas concentrações do fármaco (BAJAJ; YEO, 2010), contudo, a maior desvantagem é que as drogas são absorvidas pelos capilares peritoneais e chegam rapidamente a circulação sistêmica, onde passam primeiro pela circulação portal, fígado e posteriormente alcançando outros órgãos (MARCON, 2011). Além disso, a BHE garante a homeostase do tecido cerebral por meio de um transporte altamente regulado de substratos e impede que as substâncias xenobióticas entrem no cérebro usando transportadores de efluxo eficientes (FREESE *et al.*, 2017), dificultando, assim, a entrada de fármacos no SNC. No entanto, sabe-se que a HI é sempre seguida por rompimento da BHE, o que contribui para o aumento da permeabilidade de fármaco ao cérebro (KEEP *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011), o que nesse caso aumentaria a biodisponibilidade vinda da corrente sanguínea para o meio intracerebral.

A via IN, por sua vez, mostra-se um método não invasivo de contornar a BHE (BENEDICT *et al.*, 2011; HANSON *et al.*, 2013; LOCHHEAD, 2012) e levar o fármaco até o SNC. A região olfativa das vias nasais possui atributos anatômicos e fisiológicos

únicos, que fornecem vias extracelulares e intracelulares para o SNC que contornam a BHE. Os neurônios sensoriais olfativos são os únicos neurônios de primeira ordem cujos corpos celulares estão localizados em um epitélio distal. Seus processos dendríticos são diretamente expostos ao ambiente externo na passagem nasal superior enquanto seus axônios projetam através de perfurações na placa cribriiforme do osso etmóide para glomérulos sinápticos no bulbo olfatório (AHMAD *et al.*, 2017; DHURIA *et al.*, 2009; SERRALHEIRO *et al.*, 2015; SHINDE; BHARKAD; DEVARAJAN, 2015; THORNE *et al.*, 2004). Uma das restrições no que se refere à administração IN para o cérebro é o mecanismo de defesa natural - depuração mucociliar nasal (AHMAD *et al.*, 2017). Assim, além de estarmos administrando uma quantidade muito pequena do fármaco nos animais, a limpeza mucociliar provavelmente está removendo a formulação de forma eficaz. Vimos no teste de permeação que a absorção da quercetina se deu de forma bastante lenta (quantificável apenas após 8 h de exposição da mucosa), o que nos leva a crer que muito do que foi administrado está sendo depurado pelo muco.

A partir dos nossos achados, podemos concluir que a QU-N via IP apresentaram melhora significativa nos testes comportamentais bem como no tamanho do hematoma, já a via IN somente nos testes comportamentais foram observadas diferenças. Além disso, a quantidade de QU administrada via IN foi menos de 1% da administrada pela via IP e mesmo nessa quantidade tão baixa os animais responderam de forma positiva aos testes comportamentais, sugerindo, assim, que caso fossem realizadas mais administrações possivelmente além dos comportamentos também refletiria nos resultados do tamanho do hematoma. Estes resultados sugerem que o QU-N utilizada neste estudo pode ser promissora para futuros estudos sobre tratamentos da HI.

Ainda, no teste de permeação *ex vivo*, a QU-N apresentou melhor padrão de permeação ao atravessar a mucosa nasal suína em comparação com QU livre, fornecendo evidências de que a nanoemulsão poderia melhorar a passagem nariz-cérebro.

Com isso, a QU-N apresenta ser um tratamento promissor para HI. Contudo, mais estudos são necessários utilizando doses maiores e administrações mais frequentes, tendo em vista não haver ainda um tratamento seguro para essa agressiva patologia.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação teve por objetivo estudar o tratamento com QU-N por duas vias de administração (IP e IN) após HI, analisando-se respostas comportamentais e o tamanho do hematoma. A principal motivação para o desenvolvimento desta dissertação baseou-se em estudos anteriores do nosso próprio grupo de pesquisa, que mostraram melhoras significativas dos animais tratados com QU-N em comparação com a QU livre após HI, utilizando-se uma única administração da droga e uma única via de administração, a IP (GALHO *et al.*, 2016). Acreditamos que a via IP, mesmo com a vantagem de fornecer altas concentrações do fármaco, (BAJAJ; YEO, 2010) seja altamente metabolizada antes mesmo da chegada ao cérebro, por entrar na circulação sistêmica (MARCON, 2011). Com isso, utilizamos uma nova via de administração (IN) por ser um método não invasivo de contornar a BHE e levar o fármaco até o SNC (HANSON *et al.*, 2012; LOCHHEAD, 2012). Ainda, comparamos as duas vias, a fim de identificar qual seria a melhor no que se refere a respostas comportamentais e tamanho do hematoma cerebral.

Identificamos que ao administrar QU-N, os animais tratados tanto pela via IP quanto IN responderam significativamente aos testes comportamentais, contudo, somente a via IP reduziu o tamanho do hematoma. Utilizamos uma dose diária de QU-N, totalizando 3 aplicações e, ao comparamos a quantidade de QU-N inserida nos animais, separando por via de administração, observamos que os animais tratados via IP receberam quantidades muito superiores de QU-N. Mesmo com esses valores tão baixo, o grupo IN mostrou melhora em comparação com o grupo controle (sem tratamento). Isso mostra que a quantidade de QU-N e a via de administração são dois fatores importantes quando aplicados ao tratamento das doenças como o AVC, sendo necessários mais estudos para confirmar a melhor via como candidata a uma futura utilização para essa patologia.

Desta forma, a presente dissertação permitiu a confirmação dos efeitos neuroprotetores da QU-N nas duas vias de administração, o que será salutar para uma abordagem mais profunda e para um melhor entendimento do AVC experimental, que poderá auxiliar no processo de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta impactante condição clínica.

5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, a partir dos resultados da presente dissertação, pretende-se realizar outras avaliações com o mesmo modelo de HI, utilizando-se a mesma formulação QU-N como tratamento. Dentre as propostas, podemos destacar:

- Avaliar a quantidade de QU que chega no cérebro dos animais através de HPLC e verificar qual das vias de administração possui maior biodisponibilidade no parênquima cerebral em diferentes tempos.
- Administrar QU-N por período maior de dose e tempo (3x ao dia e por 12 dias consecutivos).
- Realizar imunohistoquímica no cérebro utilizando marcadores específicos para astrogliose e microgliose, comparando as duas vias de administração e investigando se a via intranasal altera de forma diferente esses parâmetros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J. *et al.* Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease**, jan. 2010. v. 37, n. 1, p. 13–25.

ABBOTT, N. J. *et al.* . Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, maio. 2013. v. 36, n. 3, p. 437–449.

ADAMS, F.; BALTIMORE, W. **The Genuine Works of Hippocrates**. [S.l.]: [s.n.], 1939.

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

AHMAD, E. *et al.* Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles. **Nanoscale**, 2017. v. 9, n. 3, p. 1174–1183.

AKKAR, A.; MÜLLER, R. H. Formulation of intravenous Carbamazepine emulsions by SolEmuls® technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, maio. 2003. v. 55, n. 3, p. 305–312.

ALVAREZ-ROMÁN, R. *et al.* Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2001. n. 52, p. 191–195.

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.

BAGAD, M.; KHAN, Z. A. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles for oral delivery of quercetin: preparation, characterization, and pharmacokinetics and biodistribution studies in Wistar rats. **International Journal of Nanomedicine**, 2015. v. 10, n. 10, p. 3921–35.

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

BAJAJ, S. *et al.* Dominance of the Unaffected Hemisphere Motor Network and Its Role in the Behavior of Chronic Stroke Survivors. **Frontiers in Human Neuroscience**, 27 dez. 2016. v. 10. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2016.00650/full>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood–brain barrier: an overview. **Neurobiology of Disease**, jun. 2004. v. 16, n. 1, p. 1–13.

BARBI, M. **Desenvolvimento de Nanopartículas de Quitosana para Administração de Zidovudina**. Araraguara-Brasil: Universidade Estadual Paulista, 2011. Trabalho de Conclusão de Curso.

- BENEDICT, C. *et al.* Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. **Experimental Gerontology**, fev. 2011. v. 46, n. 2–3, p. 112–115.
- BERAY-BERTHAT, V. *et al.* Long-term histological and behavioural characterisation of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, ago. 2010a. v. 191, n. 2, p. 180–190.
- BERAY-BERTHAT, V. *et al.* Long-term histological and behavioural characterisation of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, ago. 2010b. v. 191, n. 2, p. 180–190.
- BIRHANU, G. *et al.* Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, abr. 2017. v. 88, p. 635–643.
- BODE, G. H. *et al.* An in vitro and in vivo study of peptide-functionalized nanoparticles for brain targeting: The importance of selective blood–brain barrier uptake. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, nov. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963416302015>>. Acesso em: 13 jan. 2017.
- BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, maio. 2008. v. 585, n. 2–3, p. 325–337.
- BRODERICK, J. *et al.* Volume of Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, 1993. v. 24, n. 7, p. 987–993.
- CARVALHO, F. C. Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina. 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/102463>>. Acesso em: 2 maio 2017.
- CHABANE, N. *et al.* Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Pharmacological**, 2009. v. 11, n. 61, p. 1473–83.
- CHAMORRO, V. *et al.* Effects of Quercetin in a Rat Model of Hemorrhagic Traumatic Shock and Reperfusion. **Molecules**, 2016. v. 21, n. 12, p. 1739.
- CHANG, C.-F. *et al.* Alternative activation-skewed microglia/macrophages promote hematoma resolution in experimental intracerebral hemorrhage. **Neurobiology of Disease**, jul. 2017. v. 103, p. 54–69.
- CHAUDHARY, K. *et al.* Intraperitoneal Drug Therapy: An Advantage. **Current Clinical Pharmacology**, 1 maio. 2010. v. 5, n. 2, p. 82–88.
- CHOI, J.-S.; PIAO, Y.-J.; KANG, K. W. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: Role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. **Archives of Pharmacal Research**, abr. 2011. v. 34, n. 4, p. 607–613.
- COLE, W. **A physico-medical essay concerning the late frequency of apoplexies together with a general method of their prevention and cure: in a letter to a physician.** United Kingdom- UK: Oxford, 1689.

DAJAS, F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of Ethnopharmacology**, set. 2012. v. 143, n. 2, p. 383–396.

DALZOTTO, L. Primeiro bloqueador solar a base de nanotecnologia é desenvolvido pela Ufrgs. **Revista Adverso**, 2010. n. 179, p. 14–15.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, 2016. v. 10, n. 20, p. 84.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2009. p. n/a-n/a.

DORA, C. *et al.* Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2012. v. 23, n. 11, p. 1972–1981.

DORA, C.; SILVA, C.; TAGLIARI, M. Formulation study of Quercetin loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. **Latin American Journal of Pharmacy**, Brasil, 2010. p. 289–296.

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.

FATTAL, E.; VAUTHIER, C. Polymers for Nanoparticle and Nanocrystal Formulations for Drug Delivery. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 30. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2006, p. 1864–1882.

FERNANDES, N. M. T.; CAVALCANTE, L. E. S.; MESTRINER, R. G. **Tarefa de habilidade do alcance e apreensão como estratégia de reabilitação na hemorragia intracerebral experimental: revisão sistemática e metanálise**. **Revista da Graduação**, 2014. v. 7, n. 2. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/19341/0>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

FREESE, C. *et al.* Identification of neuronal and angiogenic growth factors in an in vitro blood-brain barrier model system: Relevance in barrier integrity and tight junction formation and complexity. **Microvascular Research**, maio. 2017. v. 111, p. 1–11.

GAGLIARDI, R.; RAFFIN, C.; CABETTE, S. Primeiro consenso brasileiro do tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral / Brazilian guideline for the management of acute stroke. *In*: Iº CONSENSO BRASILEIRO DO TRATAMENTO DA FASE AGUDA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC)., 4. , 2001, São Paulo-Brasil. **Anais...** São Paulo-Brasil: [s.n.], 2001. V. 59, p. 972–980.

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.

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.

GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A. M.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014, p. 1–23.

GHOSH, A. *et al.* Neuroprotective Role of Nanoencapsulated Quercetin in Combating Ischemia-Reperfusion Induced Neuronal Damage in Young and Aged Rats. **PLoS ONE**, 19 abr. 2013. v. 8, n. 4, p. e57735.

GOLDSTEIN, B. L. *et al.* Ventral Striatum Encodes Past and Predicted Value Independent of Motor Contingencies. **Journal of Neuroscience**, 8 fev. 2012. v. 32, n. 6, p. 2027–2036.

GUO, Y.; BRUNO, R. S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, mar. 2015. v. 26, n. 3, p. 201–210.

HÄDRICH, G. *et al.* Anti-inflammatory Effect and Toxicology Analysis of Oral Delivery Quercetin Nanosized Emulsion in Rats. **Pharmaceutical Research**, abr. 2016. v. 33, n. 4, p. 983–993.

HALL, J. *et al.* Characterization of nanoparticles for therapeutics. **Nanomedicine**, 2007. v. 2, n. 6, p. 789–803.

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.

HANSON, L. R. *et al.* Intranasal delivery of deferoxamine reduces spatial memory loss in APP/PS1 mice. **Drug Delivery and Translational Research**, jun. 2012. v. 2, n. 3, p. 160–168.

HANSON, L. R. *et al.* Intranasal Administration of CNS Therapeutics to Awake Mice. **Journal of Visualized Experiments**, 8 abr. 2013. n. 74. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/4440/intranasal-administration-of-cns-therapeutics-to-awake-mice>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

HEURTAULT, B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, out. 2003. v. 24, n. 23, p. 4283–4300.

JAIN, A.; MEHRA, N.; SWARNAKAR, N. Role of Antioxidants for the Treatment of Cardiovascular Diseases: Challenges and Opportunities. **Current Pharmaceutical Design**, 2015. v. 21, n. 30, p. 4441–55.

JOHN, T.; DAVID, T. **Comprehensive Medicinal Chemistry II.: Strategy and drug research**. USA: Elsevier Science, 2006. V. 2.

KATARE, O. *et al.* Novel drug delivery systems in topical treatment of psoriasis: Rigors and vigors. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, 2010. v. 76, n. 6, p. 612.

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.

KAWABATA, K.; MUKAI, R.; ISHISAKA, A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. **Food Funct.**, 2015. v. 6, n. 5, p. 1399–1417.

KEEP, R. *et al.* Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. **Acta Neurochirurgica Supplement**, 2008. n. 105, p. 73–7.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. **Overseas Publishers Association**, 1998.

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.

KUMAR, P. *et al.* Promises of a biocompatible nanocarrier in improved brain delivery of quercetin: Biochemical, pharmacokinetic and biodistribution evidences. **International Journal of Pharmaceutics**, dez. 2016. v. 515, n. 1–2, p. 307–314.

LEWIS, P.; TIMOTHY, P. **Merritt - Tratado de Neurologia**. [S.l.]: Editora Guanabara Koogan, 2011.

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.

LOPRESTI, M. A. *et al.* Hematoma volume as the major determinant of outcomes after intracerebral hemorrhage. **Journal of the Neurological Sciences**, out. 2014. v. 345, n. 1–2, p. 3–7.

MA, Q. *et al.* History of Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage. *In*: ZHANG, J.; COLOHAN, A. (Org.). **Intracerebral Hemorrhage Research**. Vienna: Springer Vienna, 2011, V. 111, p. 3–8. DOI: 10.1007/978-3-7091-0693-8_1.

MACLELLAN, C. L. *et al.* Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 2006. v. 26, n. 8, p. 1031–1042.

MACLELLAN, C. L. *et al.* Assessing cognitive function after intracerebral hemorrhage in rats. **Behavioural Brain Research**, mar. 2009. v. 198, n. 2, p. 321–328.

MAGLIARO, F. C. L.; MATAS, S. L. De A.; MATAS, C. G. Cognitive Potential-P300 in patients with right hemisphere ischemic lesion. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, 2009. v. 21, n. 4, p. 285–290.

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.

MEHTA, V.; PARASHAR, A.; UDAYABANU, M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. **Physiology & Behavior**, mar. 2017. v. 171, p. 69–78.

MENDIS, S. *et al.* **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.** Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, 2011.

MESTRINER, R. G. *et al.* Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. **Experimental Neurology**, jan. 2011. v. 227, n. 1, p. 53–61. . Acesso em: 16 maio 2014.

MESTRINER, R. G. **Análise do Desempenho Sensório-Motor e da Reatividade Astroglial em Modelos Experimentais de Acidente Vascular Encefálico Isquêmico e Hemorrágico.** POA-Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2013. Tese de Doutorado.

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://bvsmms.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.

NAZARI-VANANI, R.; MOEZI, L.; HELI, H. In vivo evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system for curcumin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, abr. 2017. v. 88, p. 715–720.

NEVES, J. D. **Efeitos celulares, histológicos e comportamentais da hemorragia intracerebral experimental em ratos.** Porto alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2015. Tese de Doutorado.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Sustained Cytoplasmic Delivery of Drugs with Intracellular Receptors Using Biodegradable Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, jan. 2004. v. 1, n. 1, p. 77–84.

PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of cerebral blood flow & metabolism**, 2012. v. 32, n. 11, p. 1959–1972.

PATEL, A. R. *et al.* Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, jul. 2012. v. 133, n. 2, p. 423–429.

- PAWLOWSKI, J. *et al.* Avaliação da Memória de Pacientes com Lesão em Núcleos da Base e Tálamo Pós-AVC. **Psicologia em Pesquisa**, 31 jun. 2013. v. 7, n. 1, p. 79–88.
- PINTO, M. P. *et al.* Targeted brain delivery nanoparticles for malignant gliomas. **Nanomedicine**, jan. 2017. v. 12, n. 1, p. 59–72.
- 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.
- PRAVEEN KUMAR, G. Nanoemulsion Based Targeting in Cancer Therapeutics. **Medicinal Chemistry**, 2015. v. 5, n. 6. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/nanoemulsion-based-targeting-in-cancer-therapeutics-2161-0444-1000275.php?aid=54834>>. Acesso em: 31 maio 2017.
- PREETZ, C. *et al.* Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, jan. 2010. v. 39, n. 1–3, p. 141–151.
- QURESHI, A. I.; MENDELOW, A. D.; HANLEY, D. F. Intracerebral haemorrhage. **The Lancet**, maio. 2009. v. 373, n. 9675, p. 1632–1644.
- RAVISHANKAR, D. *et al.* Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, dez. 2013. v. 45, n. 12, p. 2821–2831.
- RAZA, K. *et al.* Topical Delivery of Aceclofenac: Challenges and Promises of Novel Drug Delivery Systems. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014, p. 1–11.
- RICHTER, G. **Desenvolvimento de nanocarreadores contendo curcumina tendo como alvo o sistema nervoso central**. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 2015. Dissertação de Mestrado.
- RODRIGUES, T. A. *et al.* Estudo comparativo entre propofol em nanoemulsão não lipídica com solutol e em emulsão com lecitina. **Rev Bras Anestesiologia**, 2012. v. 62, n. 3, p. 330–334.
- ROGERS, D. *et al.* Correlation Between Motor Impairment and Infarct Volume After Permanent and Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. **Stroke**, 1997. v. 28, p. 2060–2066.
- ROSENBERG, G. A. *et al.* Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, 1990. v. 21, n. 5, p. 801–807.
- RUSSO, M. *et al.* The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. **Biochemical Pharmacology**, jan. 2012. v. 83, n. 1, p. 6–15.
- 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.

SEJU *et al.* Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. **Acta Biomaterialia**, dez. 2011b. v. 7, n. 12, p. 4169–4176.

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.

SHERREFA, B.; JIPING, T.; JOHN, Z. Hematoma Expansion following Intracerebral Hemorrhage: Mechanisms Targeting the Coagulation Cascade and Platelet Activation. **Current Drug Targets**, 2017. v. 18, n. 16.

SHINDE, R. L.; BHARKAD, G. P.; DEVARAJAN, P. V. Intranasal microemulsion for targeted nose to brain delivery in neurocysticercosis: Role of docosahexaenoic acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, out. 2015. v. 96, p. 363–379.

SOARES, S. **Indução de plasticidade cerebral por remoção da matriz extracelular após lesão isquêmica no cortex sensório-motor de ratos.** Belém - PA: Universidade Federal do Pará, 2012. Dissertação de Mestrado.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, out. 2005. v. 10, n. 3–4, p. 102–110.

SONG, H. *et al.* Capsular stroke modeling based on somatotopic mapping of motor fibers. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, jan. 2016. p. 0271678X1667942.

SOOD, S.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN, K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, jan. 2014. v. 113, p. 330–337.

SUZUKI, Y. Role of tissue-type plasminogen activator in ischemic stroke. **Journal of Pharmaceutical Science**, 2010. v. 113, n. 3, p. 203–7.

SWEETMAN, S. **Martindale: The Complete Drug Reference.** 35. ed. [S.l.]: Pharmaceutical Press, 2006.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, maio. 2004. v. 108–109, p. 303–318.

THORNE, R. G. *et al.* Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. **Neuroscience**, jan. 2004. v. 127, n. 2, p. 481–496.

WABEL, C. T. **Influence of lecithin on structure and stability of parenteral fat emulsions.** Nurnberg: Erlangen University, 1998. Ph.D. Thesis.

WANG, J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. **Progress in Neurobiology**, dez. 2010. v. 92, n. 4, p. 463–477.

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.

WU, G. *et al.* Minimally Invasive Procedures for Evacuation of Intracerebral Hemorrhage Reduces Perihematomal Glutamate Content, Blood–Brain Barrier Permeability and Brain Edema in Rabbits. **Neurocritical Care**, fev. 2011. v. 14, n. 1, p. 118–126.

XI, G.; KEEP, R. F.; HOFF, J. T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. **The Lancet Neurology**, 2006. v. 5, n. 1, p. 53–63.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Scope of nanotechnology in ovarian cancer therapeutics. **Journal of ovarian research**, 2010. v. 3, n. 1, p. 19.

YAMAGUCHI, T. *et al.* Rate of release and retentivity of prostaglandin in lipid emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1995. n. 1256, p. 381–386.

ZHAI, S.; XIA, X.; HE, Z. Carotenoids in Staple Cereals: Metabolism, Regulation, and Genetic Manipulation. **Frontiers in Plant Science**, 2016. n. 7, p. 1197.

ZHANG, P.; HÖLSCHER, C.; MA, X. Therapeutic potential of flavonoids in spinal cord injury. **Reviews in the Neurosciences**, 1 jan. 2017. v. 28, n. 1. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2017.28.issue-1/revneuro-2016-0053/revneuro-2016-0053.xml>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

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.

ZHOU, Y. *et al.* Inflammation in intracerebral hemorrhage: From mechanisms to clinical translation. **Progress in Neurobiology**, abr. 2014. v. 115, p. 25–44.

7. ANEXOS

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br



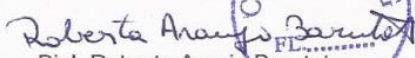
CERTIFICADO Nº P066/2015

Certificamos que o projeto intitulado "**Comparação dos efeitos protetores da administração intranasal e intraperitoneal de quercetina nanoencapsulada em ratos Wistar submetidos à hemorragia intracerebral**", protocolo nº 23116.006417/2015-79, sob a responsabilidade de Ana Paula Horn- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 18/11/2015 (Ata 015/2015).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq031/2015
VIGÊNCIA DO PROJETO	30/06/2017
ESPÉCIE/ LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
NÚMERO DE ANIMAIS	96
PESO/ IDADE	250 – 300 g/ 60 – 80 dias
SEXO	macho
ORIGEM	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) - UFRGS
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Julho de 2017

Rio Grande, 27 de novembro de 2015.


Biol. Roberta Araujo Barutot
Coordenadora Adjunta da CEUA-FURG

