

NANOCÁPSULAS CONTENDO PALMITATO DE ASCORBILA REDUZIRAM A SUSCEPTIBILIDADE A CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS¹

NANOCAPSULES CONTAINING ASCORBYL PALMITATE REDUCED THE SUSCEPTIBILITY TO PENTYLENOTETRAZOLE-INDUCED SEIZURES IN MICE

**Francine Rodrigues Ianiski², Carla Fontoura Ferreira², Bibiana Rocha Aldrigui³,
Marta Palma Alves⁴ e Cristiane Luchese^{4,5}**

RESUMO

Neste estudo, verificou-se o efeito anticonvulsivante e antioxidante de nanocápsulas contendo palmitato de ascorbila (NC-PA) em episódios convulsivos induzidos por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos. As suspensões contendo palmitato de ascorbila (livre ou nanoencapsulada, 30 mg/kg, intragástrica) foram pré-administradas 0,5; 24, 48 ou 72 h antes de receberem o PTZ. Após esse processo, os camundongos foram observados durante 60 minutos quanto às alterações comportamentais. Foi avaliada a peroxidação lipídica e os níveis de tióis não proteicos (NPSH) no cérebro dos animais. Os animais pré-tratados com as NC-PA, em todos os tempos, apresentaram um aumento na latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo, uma redução na peroxidação lipídica e uma redução nos níveis de NPSH. O palmitato de ascorbila na forma livre não apresentou efeito em aumentar a latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo em nenhum dos tempos testados, porém reduziu a peroxidação lipídica (0,5 e 48 h) e alterou os níveis de NPSH. As suspensões contendo NC-PA apresentaram efeito anticonvulsivante. Esse efeito está associado, ao menos em parte, ao efeito antioxidante deste composto.

Palavras-chave: anticonvulsivante, palmitato de ascorbila, nanocápsulas, antioxidante.

ABSTRACT

In this study it is investigated the anticonvulsant and antioxidant effects of nanocapsules containing ascorbyl palmitate (NC-AP) in seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) in mice. Suspensions containing ascorbyl palmitate (free or nanocapsulated, 30 mg/kg, intragastric) were pre-administered 0.5; 24, 48 or 72 hours before PTZ. After this procedure, the mice were observed for 60 minutes about behavioral changes. It was evaluated the lipid peroxidation and non-protein thiol (NPSH) levels in their brains. The animals pre-treated with NC-AP, in all times, increased latency to the onset of the first convulsive episode, a reduction in lipid peroxidation and NPSH levels. The ascorbyl palmitate in the free form did not show any effect in increasing the latency to the seizure episode at any time tested, but it reduced the lipid peroxidation (0.5 and 48 h) and changed the NPSH levels. Nanocapsules suspensions containing NC-AP showed an anticonvulsant effect. This effect is associated, at least in part, to the antioxidant effect of this compound.

Keywords: anticonvulsant, ascorbyl palmitate, nanocapsules, antioxidant.

¹Trabalho de Mestrado - Centro Universitário Franciscano.

²Alunos do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

³Acadêmica do Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano.

⁴Docentes do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

⁵Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: cristiane_luchese@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A epilepsia é definida como uma desordem neurológica causada pela predisposição persistente do cérebro em relação a geração de crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição, caracterizadas pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética (FISHER et al., 2005). Essa patologia neurológica afeta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo e apresenta alta mortalidade e comorbidade (GLAUSER et al., 2013). As crises convulsivas podem ser classificadas de acordo com suas características clínicas (crises parciais complexas e crises generalizadas tônico-clônicas) e também de acordo com a presença ou ausência de desenvolvimento neurológico ou anormalidades.

Diversas evidências sugerem que o estresse oxidativo é um fator importante relacionado ao dano tecidual cerebral após os episódios convulsivos, pois gera espécies reativas (ER) que podem ocasionar a morte neuronal (LIANG et al., 2000; ERAKOVIC et al., 2001; KANEKO et al., 2002). Essas ER reduzem os níveis de antioxidantes principalmente no cérebro, que contém uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, afetando a expressão de proteínas de membrana funcionais e receptores (MAES et al., 1999; LIANG et al., 2000). Todavia, o estresse oxidativo induzido pelos processos convulsivos tem seus danos minimizados por um complexo sistema de defesas antioxidantes cerebrais enzimáticas e não enzimáticas, que são capazes de neutralizar as ER (BIELSKI et al., 1983; BONNEFOY et al., 2002).

A deficiência de fármacos empregados na terapia anticonvulsivante, destinados principalmente para o controle das convulsões, que associem uma alta eficácia e baixos efeitos colaterais, tem estimulado a pesquisa por novos agentes que possam representar uma nova alternativa terapêutica. Alguns autores têm proposto o tratamento com moléculas antioxidantes com objetivo de reduzir as convulsões em função de reduzir o estresse oxidativo (BASHKATOVA et al., 2003; SILVA et al., 2009; WILHELM et al., 2009). Dessa forma, a utilização de antioxidantes como o ácido ascórbico (aa) que age sequestrando os radicais livres das células e prevenindo o organismo dos danos causados pelo estresse oxidativo tem sido avaliada (PARLE; DHINGRA, 2003). Alguns autores têm demonstrado que as crises convulsivas são atenuadas pelo uso de aa (FIGHERA et al., 1999).

Entretanto, o aa apresenta limitações que podem reduzir sua eficácia como a baixa meia-vida (BENHEGYI et al., 1997) e baixa estabilidade físico-química, sendo facilmente oxidado sobre condições aeróbicas (KLESZCZEWSKA, 2000) e altamente sensível ao calor, a luz e alguns metais (MULLER et al., 2001; DALCIN et al., 2003), dificultando a sua utilização em produtos farmacêuticos. Nesse sentido, com intuito de otimizar as preparações farmacêuticas do aa, o L-ascorbil-6-palmitato (PA), derivado lipossolúvel do aa, tem sido comumente utilizado (KRISTL et al., 2003). O PA apresenta ausência de toxicidade, sendo uma molécula estável em pH neutro e mantém as mesmas propriedades antioxidantes do aa (ROSS et al., 1999). Além disso, devido a sua estrutura lipofílica, o PA é capaz de atravessar as barreiras

biológicas (SNOW; FRIGG, 1990; DEATON et al., 2003; POKORSKI et al., 2003), servindo como um carreador de ascorbato no organismo (POKORSKI et al., 2003). No entanto, embora o PA apresente maior estabilidade que a vitamina C em formulações, a esterificação com ácido palmítico na posição 6 reduz a hidrólise do aa, mas não garante resultados satisfatórios em relação a estabilidade em produtos acabados, pois as propriedades de estabilização do PA são também influenciadas pelas propriedades estruturais das formulações (AUSTRIA; SEMENZATO; BETTERO 1997). Assim, a utilização de sistemas carreadores de fármacos, como lipossomas e nanopartículas, têm sido investigadas com intenção de promover maior estabilidade do ativo (TERJARLA, 1999; SPICLIN et al., 2001; KRISTL et al., 2003).

O uso de sistemas nanoparticulados pode representar uma nova e importante ferramenta farmacológica para o tratamento da epilepsia. As nanopartículas poliméricas promovem uma liberação controlada do fármaco, protegem as substâncias de degradação e modificam sua distribuição, aumentando sua atividade farmacológica e reduzindo os efeitos colaterais (SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, devido a sua estrutura e propriedades como ausência de toxicidade, biodegradável e biocompatível (CHEN; LIU, 2012), as nanopartículas têm grande potencial para facilitar a circulação de fármacos através da barreira sangue-cérebro, fornecendo medicamentos específicos a regiões do cérebro que, normalmente, seriam inacessíveis pelos métodos tradicionais (SIMKÓ et al., 2010).

Nos últimos anos, avanços importantes têm sido feitos no diagnóstico e tratamento de distúrbios convulsivos; no entanto estudos em animais mostram que muitos fármacos antiepilépticos não conseguem ultrapassar a barreira sangue-cérebro, apesar da sua alta potência e seletividade. Além disso, estes fármacos apresentam elevada incidência de efeitos colaterais que variam desde distúrbios gastrintestinais até hepatotoxicidade, depressão e perturbações cognitivas (OBY; JANIGRO, 2006). Portanto, há uma clara necessidade de continuar a identificar novos ativos antiepilépticos que efetivamente possam controlar as crises convulsivas com o mínimo ou nenhum efeito adverso.

Com base nas evidências que as convulsões podem causar danos cerebrais, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito anticonvulsivante e antioxidante de nanocápsulas contendo PA (NC-PA) em episódios convulsivos induzidos por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos. O PTZ é um conhecido antagonista do receptor do ácido gama-aminobutírico e com isso causado de convulsão (FISHER, 1989). Além disso, os resultados obtidos com as NC-PA serão comparados com o PA na forma livre (PA-L).

MATERIAIS E MÉTODOS

QUÍMICOS

O PTZ foi obtido da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros químicos foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

As suspensões contendo NC-PA foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1988) a uma concentração de 3,0 mg/ml. A fase orgânica foi composta por palmitato de ascorbila (0,3 %), poli- ϵ -caprolactona (1,0 %), monoestearato de sorbitano (0,766 %), óleo de açaí (3,102 %), butil-hidroxitolueno (0,1 %) e acetona (0,267 %). A fase aquosa era composta por água (0,533 %), propilenoglicol (1,0 %) e polisorbato 80 (0,766 %). A fase orgânica foi adicionada sobre a fase aquosa, sob agitação magnética em banho-maria a temperatura aproximada de 35°C. As suspensões contendo nanocápsulas brancas (NC-B) (sem o fármaco) foram preparadas utilizando o mesmo protocolo das suspensões de NC-PA.

O diâmetro das partículas era cerca de 306 e 248 nm para o NC-PA e NC-B, respectivamente. O potencial zeta foi cerca de -33,2 mV para NC-PA e -16,2 mV para NC-B. O teor de palmitato de ascorbila nanoencapsulada foi de 97,51%.

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos adultos machos, da linhagem *Swiss* (25-35g), obtidos a partir de uma colônia de reprodução local. Os animais foram mantidos em uma sala de animais com um ciclo de claro-escuro 12/12 h. Os animais receberam uma dieta comercial (Guabi, RS, Brasil) e água *ad libitum*. Foram aplicados rigorosos critérios éticos em nosso estudo para minimizar a dor e o sofrimento dos animais. Os animais foram utilizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Cuidados e Uso de Animais Experimentais, do Centro Universitário Franciscano.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Os camundongos foram divididos em quatro grupos (Tabela 1) com 6 animais cada. Os camundongos pertencentes aos grupos I e II foram pré-tratados com as suspensões contendo NC-B. Os animais do grupo III foram pré-tratados com as suspensões contendo NC-PA (30 mg/kg) enquanto os animais pertencentes ao grupo IV foram pré-tratados com o PA-L (30 mg/kg). Os pré-tratamentos foram realizados pela via intragástrica por gavagem em diferentes tempos (0,5; 24; 48 e 72 h) antes da administração do agente convulsivante, neste caso do PTZ (80 mg/kg, i.p.) (UZUM et al., 2006). Os camundongos dos grupos II, III e IV receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de PTZ, enquanto os animais do grupo I receberam i.p. água filtrada (Tabela 1).

Tabela 1 - Protocolo Experimental *In vivo*.

Grupos	Tratamentos
I – Controle	NC-B (i.g.) + água filtrada (i.p.)
II – PTZ	NC-B (i.g.) + PTZ (i.p.)
III – Nano + PTZ	NC-PA (i.g.) + PTZ (i.p.)
IV – Livre + PTZ	PA-L (i.g.) + PTZ (i.p.)

Todos os animais foram tratados por via intragástrica (i.g.) com auxílio de sonda de gavagem 0,5; 24; 48 ou 72 h antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de pentilenotetrazol (PTZ) ou água filtrada. Foram utilizados 6 animais por grupo. Suspensões contendo nanocápsulas brancas (sem o ativo) (NC-B); suspensões contendo nanocápsulas de palmitato de ascorbila (NC-PA); suspensões contendo o palmitato de ascorbila na forma livre (PA-L).

Os animais foram observados durante 1 h, em caixas de acrílico, imediatamente após a injeção i.p. de PTZ, para o aparecimento de crises tônico-clônicas com duração superior a 5 s. A latência para o início do primeiro episódio convulsivo também foi registrada. Posteriormente ao episódio da convulsão, os camundongos foram decapitados. Os animais que não exibiram convulsões foram considerados protegidos e mortos 1 h após a administração de PTZ. Os cérebros dos animais foram removidos e utilizados em ensaios *ex vivo*.

ENSAIOS *EX VIVO*

Para avaliar as alterações das convulsões induzidas por PTZ na peroxidação lipídica e nos níveis de NPSH, as amostras de cérebro dos camundongos foram homogeneizadas em Tris-Hcl 50 mM pH 7,5 (1/5, v/v) e centrifugadas a 900 x g durante 15 min para a obtenção do sobrenadante (S1).

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada através da reação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Ohkawa et al. (1979). Foi utilizada uma alíquota de S1 (200 µl), misturada de com ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,8 %), ácido acético e dodecil sulfato de sódio (SDS) (8,1 %). Essa mistura foi incubada a 95°C durante 2 h. Os níveis de peroxidação lipídica foram expressos como nmol MDA/mg de proteína.

NÍVEIS DE NPSH

Os níveis de NPSH foram determinados pelo método de Ellman (1959). O S1 foi homogeneizado (1:1) com 10% de ácido tricloroacético e posteriormente foi centrifugado. Após a centrifugação, o sedimento foi descartado e as proteínas livres dos grupos-SH foram determinadas no sobrenadante límpido. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada em tampão fosfato de potássio 1 M pH 7,4 e foi adicionado 10 mM DTNB. A reação de cor foi verificada em 412 nm. Os níveis de NPSH foram expressos como nmol NPSH/mg de proteína.

PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi avaliada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro-padrão (E.P.) Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Duncan. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Na tabela 2, demonstra-se a latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo dos grupos I e II. Nesse teste, a ANOVA de uma via verificou uma diferença significativa entre os grupos I e II na latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo ($p < 0,00001$). Todos os animais do grupo I e II foram pré-tratados por via i.g. com as suspensões contendo nanocápsulas brancas (sem o ativo), entretanto os animais do grupo I receberam injeção i.p. de água filtrada e não apresentaram nenhuma alteração comportamental durante 1 h em que foram observados. Todavia, os animais do grupo II receberam injeção i.p. de PTZ (80 mg/kg) e foram observados durante 1 h. Foi verificado que todos os animais do grupo II convulsionaram e que a latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo foi de 66 ± 5 s. Esse era um resultado esperado já que o PTZ é um antagonista de receptor ácido gama-aminobutírico e amplamente utilizado como modelo para estudar novas drogas com efeito anticonvulsivante (FISHER, 1989).

Tabela 2 - Latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo dos grupos I e II.

Grupos	Convulsões	
	n ^o /n	Latência (s)
I – Controle	0*/6	nc*
II – PTZ	6 [#] /6	66 \pm 5 [#]

Dados expressos como média \pm erro-padrão. Todos os animais foram tratados por via intragástrica (i.g.) com auxílio de sonda de gavagem 0,5; 24; 48 ou 72 h antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de pentilenotetrazol (PTZ) ou água filtrada. Foram utilizados de 6 animais por grupo. Grupo I: NC-B (i.g.) + água filtrada (i.p.) e grupo II: NC-B (i.g.) + PTZ (i.p.). Suspensões contendo nanocápsulas brancas (sem o ativo) (NC-B). [#] $p < 0,00001$ em relação ao grupo I; * $p < 0,00001$ em relação ao grupo II. “nc” indica que os animais não convulsionaram durante o período de observação.

A ANOVA de uma via expressou uma significativa diferença entre os animais pré-tratados com as suspensões contendo NC-PA e que receberam a injeção i.p. de PTZ (grupo III) e os animais pré-tratados com as suspensões contendo NC-B (sem o ativo) e que receberam a injeção i.p. de PTZ (grupo II) (Figura

1). Assim, pode-se observar que o pré-tratamento, em todos os tempos, com as NC-PA aumentou a latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo quando comparados com o grupo PTZ (Figura 1).

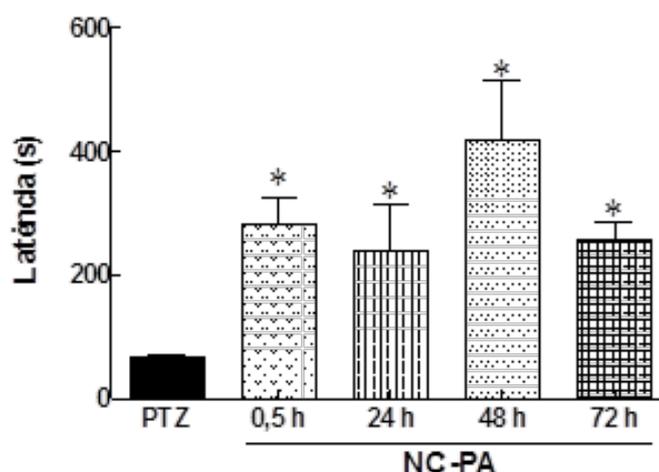


Figura 1 - Latência (s) para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo dos animais pré-tratados com as suspensões contendo nanocápsulas de palmitato de ascorbila (NC-PA), nos diferentes tempos analisados (0,5; 24; 48 e 72 h). Dados expressos como média \pm erro-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PTZ.

Já os animais pré-tratados com o PA-L não apresentaram alterações na latência para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo quando comparados com o grupo PTZ (Figura 2). Dessa forma, pode-se analisar que as suspensões contendo NC-PA apresentaram um efeito anticonvulsivante em camundongos induzidos com PTZ, enquanto o PA-L não apresentou efeito.

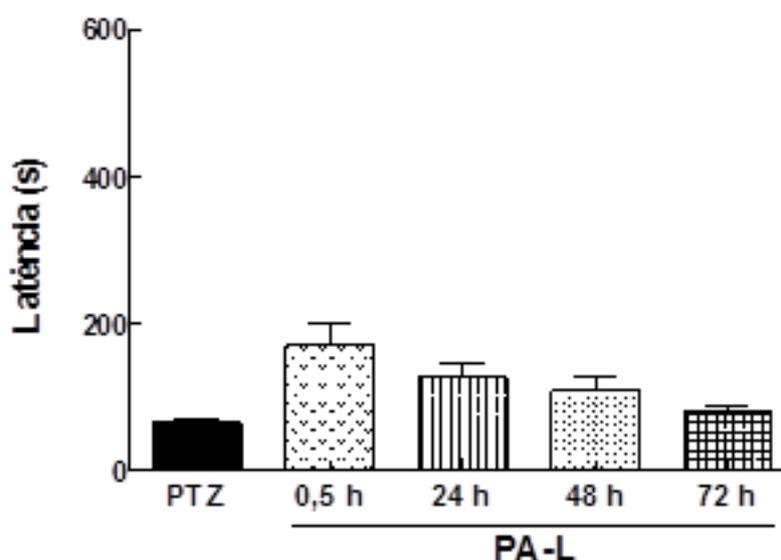


Figura 2 - Latência (s) para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo dos animais pré-tratados com o palmitato de ascorbila na forma livre (PA-L), nos diferentes tempos analisados (0,5; 24; 48 e 72 h). Dados expressos como média \pm erro-padrão.

Portanto, este estudo demonstra, pela primeira vez, o efeito anticonvulsivante de NC-PA. O PA, um derivado sintético lipofílico do ascorbato, é amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (CORT, 1974; JOHNSTON et al., 1994) e mantém as mesmas propriedades antioxidantes do ácido ascórbico

(ROSS et al., 1999). Uma característica importante do PA é que serve como um carreador de ascorbato no organismo (POKORSKI et al., 2003), promovendo um aumento dos níveis desse antioxidante.

Outros estudos têm demonstrado os benefícios de ativos antioxidantes em desordens cerebrais (FREITAS; TOME, 2010; CALABRESE et al., 2003). Nesse contexto, Freitas e Tome (2010) investigaram o efeito neuroprotetor do ácido ascórbico em alterações histopatológicas observadas em ratos convulsivos e concluíram que os fármacos antioxidantes, em especial o ácido ascórbico, podem influenciar a epileptogênese, protegendo pacientes epiléticos contra as lesões cerebrais por meio da remoção de radicais livres, promovendo ações neuroprotetoras durante as convulsões.

Todavia, os estudos relatados acima utilizaram metodologia diferente e o fármaco é administrado na forma livre em doses muito elevadas. Dessa forma, pode-se observar que a administração do ativo nanoencapsulado promove uma importante redução na dose administrada, além da manutenção do efeito do fármaco por tempo prolongado. Assim, nota-se que a utilização do PA em sistemas carreadores de fármacos pode representar uma nova e importante ferramenta farmacológica para o tratamento da epilepsia. No presente estudo, observou-se que quando o PA nanoencapsulado foi administrado, o aumento do tempo para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo foi estatisticamente significativo. Acredita-se que esse resultado se deve ao fato de que carreadores submicrométricos de fármacos possibilitam a otimização da capacidade do ativo em atingir o sítio de ação específico, além de possibilitar a liberação do fármaco seletivamente no local alvo. Vários autores citam as vantagens da utilização de nanopartículas, entre elas está a incorporação de fármacos com baixa estabilidade, liberação do ativo diretamente no sítio de ação, promovendo maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco (CHAVEZ et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; DURAN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

Na tentativa de tentar explicar o melhor efeito farmacológico das NC-PA quando comparado com o PA-L, pode-se sugerir a maior biodisponibilidade das NC-PA em relação a forma livre, as propriedades físico-químicas e o diâmetro de partículas reduzido (306 nm) (EL-SHABOURI, 2002; HU et al., 2004). As nanopartículas poliméricas protegem o fármaco da degradação pelo trato intestinal, promovendo assim uma maior absorção, prolongando o tempo de permanência no estômago por muco adesão e consequente absorção pelas células intestinais e por translocação de partículas através da barreira intestinal, favorecendo a absorção oral (DES RIEUX et al., 2006; YAMANAKA; LEONG, 2008).

Outra hipótese para o melhor efeito anticonvulsivante das NC-PA é a inibição do processo de reconhecimento molecular e a captura desses sistemas pelas células do sistema fagocítico mononuclear no sangue (DES RIEUX et al., 2006), prolongando o tempo de permanência do fármaco na circulação (ARBOS et al., 2004). Dessa forma, pode-se afirmar que as NC-PA apresentam maior eficácia terapêutica, pois promovem uma liberação progressiva e controlada do fármaco em relação ao PA-L.

Além disso, os sistemas nanoencapsulados, devido a sua constituição, têm grande potencial para facilitar a circulação de fármacos através da (BHE), fornecendo medicamentos específicos a

regiões do cérebro que normalmente seriam inacessíveis pelos métodos tradicionais (SIMKÓ et al., 2010). A BHE é o fator limitante mais importante no desenvolvimento de novos medicamentos que atuem no SNC, razão pelo qual muitos fármacos não chegam ao cérebro (RINGE et al., 2004). Neste sentido, as nanopartículas têm atraído um interesse considerável na condução de ativos para o cérebro, pois apresentam grande potencial para facilitar a circulação de fármacos através da BHE, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, pois podem ser administrados por via não-invasiva, tais como a via oral (GARCIA-GARCIA et al., 2005).

EXPERIMENTOS *EX VIVO*

Peroxidação Lipídica

Tem sido demonstrado que um desequilíbrio entre a produção e a remoção das ER pode levar a efeitos neurotóxicos no sistema nervoso central (TAKUMA et al., 2004). Assim, destaca-se que o estresse oxidativo tem uma importante participação na neurogênese das convulsões. O ascorbato, por ser um agente antioxidante, participa do sistema da defesa celular contra lesões induzidas por radicais livres e produz alterações benéficas nos parâmetros comportamentais induzidos pelas convulsões (FREITAS; TOME, 2010).

Neste sentido, este estudo buscou investigar se o efeito antioxidante das NC-PA estaria envolvido no efeito anticonvulsivante destes sistemas. Através da dosagem dos níveis de TBARS, como medida de peroxidação lipídica, nos cérebros dos camundongos após o episódio convulsivo, verificou-se que o PTZ causou um aumento nos níveis de TBARS, quando comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Vários estudos foram desenvolvidos com o propósito de relacionar o envolvimento do estresse oxidativo ao processo convulsivo. O aumento em diversos marcadores de formação de ER, como TBARS e proteína carbonila (PATSOUKIS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004), assim como uma redução na atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (OLIVEIRA et al., 2004), em modelos de convulsão induzidos por PTZ, tem sido demonstrado, o que sugere que a geração de ER de oxigênio e nitrogênio estariam relacionadas aos efeitos convulsivantes e neurotóxicos do PTZ (BASHKATOVA et al., 2003).

Tabela 3 - Níveis de peroxidação lipídica dos grupos I e II.

Grupos	TBARS (nmol MDA/mg proteína)
I – Controle	6,6 ± 1,2*
II – PTZ	18,4 ± 0,2 [#]

Dados expressos como média ± erro-padrão. Níveis da peroxidação lipídica em nmol de TBA/ mg de proteína. Grupo I: NC-B (i.g.) + água filtrada (i.p.) e grupo II: NC-B (i.g.) + PTZ (i.p.). Suspensões contendo nanocápsulas brancas (sem o ativo) (NC-B). Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [#]p < 0,0002 em relação ao grupo I; *p < 0,0002 em relação ao grupo II.

Na figura 3, pode-se observar que os animais pré-tratados com as NC-PA, em todos os tempos de pre-tratamento, reduziram a peroxidação lipídica no cérebro dos animais, quando comparado com o grupo PTZ (Figura 3).

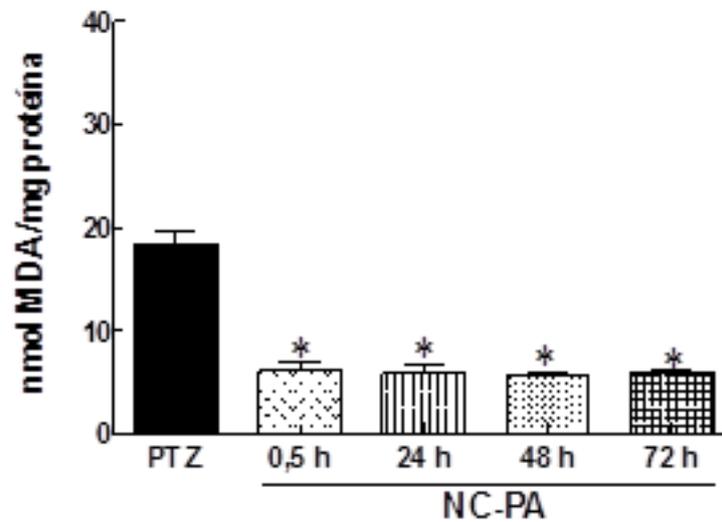


Figura 3 - Níveis de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg de proteína) dos animais pré-tratados com as suspensões contendo nanocápsulas de palmitato de ascorbila (NC-PA) nos diferentes tempos analisados (0,5; 24; 48 e 72 h). Dados expressos como média \pm erro-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PTZ.

Todavia, os animais pré-tratados com PA-L demonstraram uma redução significativa na peroxidação lipídica somente nos tempos de 0,5 e 48 h no cérebro dos animais (Figura 4). Além disso, no tempo de 72 h de pré-tratamento ocorreu um aumento significativo na peroxidação lipídica, quando comparado com os animais do grupo PTZ (Figura 4).

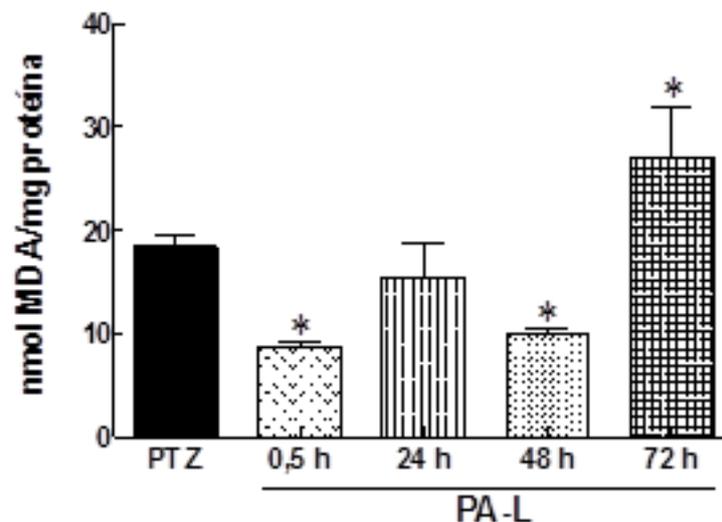


Figura 4 - Níveis de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg de proteína) dos animais pré-tratados com as suspensões contendo palmitato de ascorbila na forma livre (PA-L) nos diferentes tempos analisados (0,5; 24; 48 e 72 h). Dados expressos como média \pm erro-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PTZ.

Neste sentido, estudos têm demonstrado que o tratamento com antioxidantes foi capaz de atenuar as convulsões induzidas pelo PTZ e/ou o dano induzido pelas espécies reativas (KABUTO et al., 1998; BASHKATOVA et al., 2003). Além disso, Xavier et al. (2007) e Santos et al. (2008) sugerem que o ácido ascórbico apresenta efeito anticonvulsivante através da redução do teor de

peroxidação lipídica e do aumento da atividade da catalase cerebral, reduzindo assim a formação de radicais livres durante a crise convulsiva. Tal achado aponta que o uso de fármacos antioxidantes pode apresentar uma ação neuroprotetora durante o tratamento das convulsões em humanos.

Níveis de NPSH

Em relação aos níveis de NPSH, pode-se observar que os animais do grupo PTZ apresentaram uma redução nos níveis de NPSH no cérebro dos camundongos (Tabela 4).

Tabela 4 - Níveis de NPSH no cérebro dos grupos I e II.

Grupos	NPSH (nmol NPSH/mg proteína)
I – Controle	4,45 ± 0,08*
II – PTZ	3,46 ± 0,15#

Dados expressos como média ± erro-padrão. Níveis de tiois não proteicos em nmol de NPSH/ mg de proteína. Grupo I: NC-B (i.g.) + água filtrada (i.p.) e grupo II: NC-B (i.g.) + PTZ (i.p.). Suspensões contendo nanocápsulas brancas (sem o ativo) (NC-B). #p < 0,001 em relação ao grupo I; *p < 0,001 em relação ao grupo II.

Os animais pré-tratados com as NC-PA reduziram nos níveis de NPSH nos tempos de 0,5; 24 e 48 h, quando comparados com os animais do grupo PTZ (Figura 5).

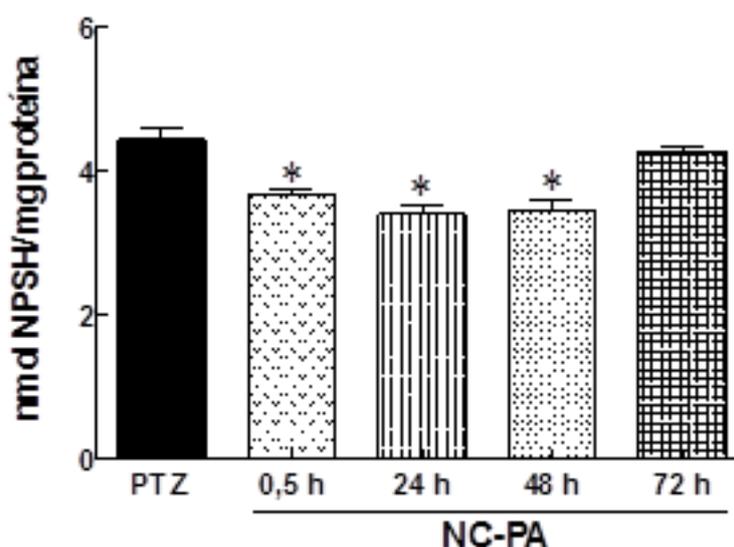


Figura 5 - Níveis de tiois não proteicos (NPSH) (nmol de NPSH/mg de proteína) dos animais pré-tratados com as suspensões contendo nanocápsulas de palmitato de ascorbila (NC-PA) nos diferentes tempos analisados (0,5; 24; 48 e 72 h). Dados expressos como média ± erro-padrão. *p < 0,05 em relação ao grupo PTZ.

Da mesma forma, os animais pré-tratados com PA-L demonstraram redução significativa nos níveis de NPSH nos tempos (0,5; 24 e 48 h) em relação ao grupo PTZ (Figura 6). Entretanto, no tempo de 72h, a ANOVA de uma via demonstrou um aumento significativo nos níveis de NPSH no cérebro dos camundongos (Figura 6).

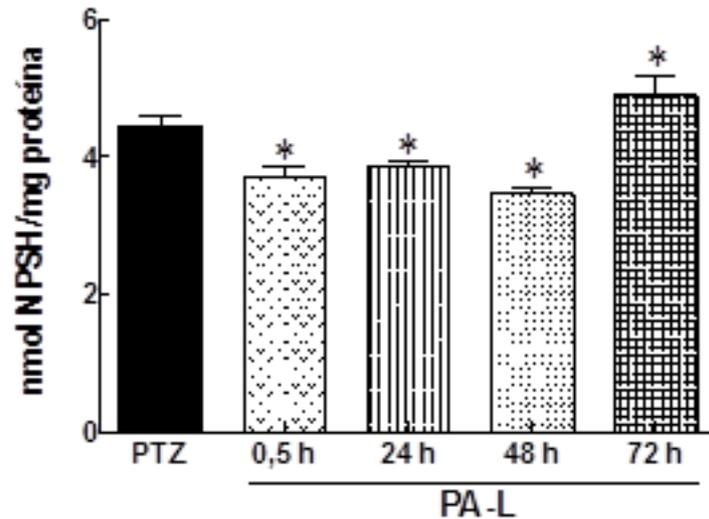


Figura 6 - Níveis de tiois não proteicos (NPSH) (nmol de NPSH/mg de proteína) dos animais pré-tratados com as suspensões contendo palmitato de ascorbila na forma livre (PA-L) nos diferentes tempos analisados (0,5; 24; 48 e 72 h). Dados expressos como média \pm erro-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PTZ.

Em concordância com o presente estudo, Tome et al. (2010) demonstraram que compostos antioxidantes como o ácido ascórbico podem exercer efeitos neuroprotetores, e esses resultados podem estar associados à inibição da produção de radicais livres, sugerindo que o ácido ascórbico como um tratamento promissor de doenças.

CONCLUSÕES

Atualmente há um grande interesse na liberação seletiva e modificada de fármacos, em vista disso, sistemas carreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e eficácia das substâncias. Neste contexto, pode-se inferir que o palmitato de ascorbila nanoencapsulado demonstrou efeito anticonvulsivante quando administrado pela via intragástrica em camundongos, pois aumentou o tempo para o aparecimento do primeiro episódio convulsivo, provavelmente por liberar seletivamente o ativo no cérebro dos animais e aumentar a meia-vida desta vitamina. Além disso, o estresse oxidativo parece estar envolvido, ao menos em parte, no efeito anticonvulsivante. Ademais, cabe ressaltar a importância de novos estudos sobre a utilização de PA nanoencapsulado no intuito de fortalecer os mecanismos de ação que justifiquem seu uso no tratamento clínico de pacientes epiléticos.

AGRADECIMENTOS

À UNIFRA, FAPERGS e CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ARBOS, P. et al. Nanoparticles with specific bioadhesive properties to circumvent the pre-systemic degradation of fluorinated pyrimidines. **J. Control Release** v. 96, p. 55-65, 2004.
- AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of Vitamin C Derivatives in Solution and Topical Formulations. **J. Pharm. Biomed Anal.**, v. 15, p. 795-801, 1997.
- BASHKATOVA, V. et al. The influence of anticonvulsivant drugs on nitric oxide levels and lipid peroxidation in the rat brain during pentylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 487-492, 2003.
- BENHEGYI, G. et al. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, p. 793-803, 1997.
- BIELSKI, B. H.; ARUDI, R. L.; SUTHERLAND, M. W. A study of the reactivity of HO₂-/O⁻ with unsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 25, n. 258, p. 4759-4761, 1983.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Med.**, v. 27, n. 31, p. 1174-1184, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.
- CALABRESE, V.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. **Italian J. Biochem.**, v. 52, n. 4, p. 177-181, 2003.
- CHAVEZ, F. et al. Liberación de substancias liofilicas a partir de nanocápsulas poliméricas. **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 46, p. 349-356, maio 2002.
- CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 640-665, 2012.
- CORT, W. M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. **J. Am. Oil Chem. Sci.**, v. 51, p. 321-325, 1974.
- DALCIN, K. B.; SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. vitamina c e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações e estabilidade. **Cad. Farm.**, v. 19, n. 2, p. 69-79, 2003.
- DEATON, C. M. et al. Pulmonary bioavailability of ascorbic acid in an ascorbate-synthesising species, the horse. **Free Radic.**, v. 37, p. 461-467, 2003.

- DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **J. Control Release**, v. 116, p. 1–27, 2006.
- DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P.C. “Nanotecnologia”. São Paulo, **Art. Liber**. p. 1-201, 2006.
- ELLMAN, G. D. Arch. **Biochem. Biophys.** v. 82, p. 70 ,1959.
- EL-SHABOURI, M. H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. **Int. J. Pharm.**, v. 249, p. 101-108, 2002.
- ERAKOVIC, V. et al. Altered activities of rat brain metabolic enzymes by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res.**, v. 43, n. 2, p. 165-173, 2001.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.
- FIGHERA, M. R. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **Neuroreport.**, v. 10, p. 2039-2043, 1999.
- FISHER, R.S. Animal-models of the epilepsies. **Brain Res. Rev.**, v. 14, p. 245 - 278, 1989.
- FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia** v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.
- FREITAS, R. M.; TOMÉ, A. R. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Rev. Psiqu. Clín.** v. 37 n. 3, p. 105-108, 2010.
- GARCÍA-GARCÍA, M. L. et al. Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. **Glia**, v. 50, p. 32-47, 2005.
- GLAUSER, T. et al. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. **Epilepsia**, v. 1, p. 13, 2013.
- HU, L.; TANG, X.; CUI, F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, p. 1527-1535, 2004.
- JOHNSTON, C.A. et al. Comparison of L-Ascorbic Acid and L-Ascorbyl 6-Palmitate utilization in Guinea Pigs and Humans. **Nutrition Res.**, v. 14, n. 10, p. 1465-1471, 1994.
- KABUTO, H.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**, v. 39, p. 237-243, 1998.
- KANEKO, K. et al. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. **Magn. Redon. Med.**, v. 48, n. 6, p. 1051-1056, 2002.

KLESZCZEWSKA, E. Ascorbic acid—clinical use, toxicity, properties, methods of determination and application in chemical analysis. **Pharmazie**. v. 55, p. 640-644, 2000.

KRISTL, J. et al. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 19, n. 4, p. 181–189, 2003.

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PANTEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 563-570, 2000.

MAES, M. et al. Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. **Psychiatry Res.**, v. 85, n. 32, p. 75-91, 1999.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled delivery - a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 50, p. 161–177, 2001.

OBY, E.; JANIGRO, D. The blood-brain barrier and epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 1, p. 1761-1774, 2006.

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

OLIVEIRA, M.S. et al. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v. 128, p. 721-728, 2004.

PARLE, M.; DHINGRA, D. Ascorbic Acid: a Promising Memory-Enhancer in Mice. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 93, p. 129 – 135, 2003.

PATSOUKIS, N. et al. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. **Neurosci. Lett.**, v. 357, p. 83-86, 2004.

POKORSKI, M.; RAMADAN, A.; MARCZAK, M. Ascorbyl Palmitate Augments Hypoxic Respiratory Response in the Cat. **J. Biomed. Sci.**, v. 11, p. 465-471, 2003.

RINGE, K.; WALZ, C. M.; SABEL, B. A. Nanoparticle drug delivery to the brain. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 91-104, 2004.

ROSS, D. et al. Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 81-89, 1999.

SANTOS, L. F. et al. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 89, n. 1, p. 1-5, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 56, p. 501-505, 2003.

SILVA, M. I. et al. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

SIMKÓ, M. et al. How nanoparticles enter the human body and their effects there. **Nano Trust dossiers**. v. 3, p. 1-3, 2010.

SNOW, D. H.; FRIGG, M. Bioavailability of ascorbic acid in horses. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 13, p. 393-403, 1990.

SPICLIN, P.; GASPERLIN, M.; KMETEC, V. Stability of Ascorbyl Palmitate in Topical Microemulsions. **Int. J. Pharm.** v. 222, p. 271-279, 2001.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Progress Neurobiol.**, v. 72, p. 111-127, 2004.

TERJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical application. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier. Syst.**, v. 16, p. 461-521, 1999.

TOME, A. R.; FERREIRA, P. M. P.; FREITAS, R. M. Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or α -tocopherol) on seizures and brain damage induced by pilocarpine in rats. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 68, n. 3, p. 355-361, 2010.

UZUM, G. et al. Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylenetetrazol induced seizures. **Life Sci.**, v. 78, n. 22, p. 2571-2576, 2006.

WILHELM, E. A. Anticonvulsant and antioxidant effects of 3-alkynyl selenophene in 21-day-old rats on pilocarpine model of seizures. **Brain Res. Bull.**, v. 79, n. 5, p. 281-287, 2009.

YAMANAKA, Y.J.; LEONG, K.W. Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. **J. Biomater. Sci. Polym.**, v. 19, p. 1549-1570, 2008.

XAVIER, S. M. L.; SALDANHA, G. B.; FREITAS, R. M. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharm. Biochemd. Behav.**, v. 89, p. 1-5, 2008.