

Uso intranasal de nanopartículas lipídicas contendo compostos antioxidantes provenientes de bio-resíduos marinhos e o seu potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas

Intranasal lipid nanoparticles containing antioxidant compounds from marine bio-waste and their potential in the treatment of neurodegenerative diseases

Torres J.¹, Peixoto A.², Silva R.³, Lobo J.M.⁴, Silva A.C.^{4,5}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

Os bio-resíduos derivados de organismos marinhos são compostos com elevado potencial terapêutico, nomeadamente, com notável atividade antioxidante, apresentando capacidade de diminuir o stress oxidativo que intervém na patogénese das doenças neurodegenerativas. Com efeito, tem sido observado um interesse crescente nestes compostos naturais, visto que constituem uma alternativa aos compostos antioxidantes sintéticos, e a sua utilização promove uma maior sustentabilidade e consciência sobre a importância da recuperação e valorização dos resíduos resultantes do processamento dos organismos marinhos. Apesar do seu potencial no tratamento e prevenção destas doenças, os compostos antioxidantes obtidos de bio-resíduos marinhos têm dificuldade em chegar ao cérebro, devido à necessidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), o que dificulta os tratamentos. Nesse sentido, têm sido estudados novos sistemas de entrega de fármacos administrados por vias alternativas, nomeadamente, a entrega direta do nariz ao cérebro através de nanopartículas lipídicas, tais como as nanopartículas de lípidos sólidos (do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e os vetores lipídicos nanoestruturados (do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC), que têm apresentado resultados promissores. A administração intranasal apresenta inúmeras vantagens, entre as quais se destaca o facto de não ser necessário que os fármacos atravessem a BHE para chegar ao cérebro. Os benefícios da utilização de SLN e NLC na entrega de fármacos, via intranasal, para o tratamento de doenças neurodegenerativas têm sido demonstrados em diversos estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, embora sejam necessárias mais investigações para que, mais tarde, seja possível avançar com os ensaios clínicos. Esta revisão teve como objetivo analisar o estado da arte da utilização de nanopartículas lipídicas no transporte de compostos provenientes de bio-resíduos marinhos, bem como o seu potencial de aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: bio-resíduos marinhos, doenças neurodegenerativas, vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), nanopartículas de lípidos sólidos (SLN), transporte nariz-cérebro.

ABSTRACT

Bio-waste derived from marine organisms are compounds with high therapeutic potential, namely with remarkable antioxidant activity, showing the ability to reduce oxidative stress that participates in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Indeed, there has been a growing interest in these natural compounds, as they constitute an alternative to synthetic antioxidant compounds, and their use promotes greater sustainability and awareness of the importance of recovering and valuing waste resulting from the processing of marine organisms. Despite their potential in the treatment and prevention of neurodegenerative diseases, antioxidant compounds obtained from marine bio-waste have difficulty in reaching the brain, due to the need to cross the blood-brain barrier (BHE), which limits the treatment of these diseases. In this sense, new drug delivery systems administered by alternative routes have been developed, namely the direct nose-to-brain delivery of drugs by means of lipid nanoparticles, such as Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC), which have been showing promising results. Intranasal administration of drugs has numerous advantages, including the fact that it is not necessary for drugs to cross the BHE to reach the brain. The benefits of using SLN and NLC for intranasal drug delivery for the treatment of neurodegenerative diseases have been demonstrated by *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments, although more studies in animals are needed to further pass to the clinical trials. This review aimed to analyze the state of the art of using lipid nanoparticles to transport compounds from marine bio-waste, as well as their potential application in the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: marine bio-waste, neurodegenerative diseases, Nanostructured Lipid Carriers (NLC), Solid Lipid Nanoparticles (SLN), nose-to-brain transport.

¹ Laboratory of Pharmaceutical Technology/Centre of Research in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto.

² LAQV/REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto.

³ UCIBIO, REQUIMTE, Laboratory of Toxicology, Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto.

⁴ UCIBIO, REQUIMTE, Laboratory of Pharmaceutical Technology/Centre of Research in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto.

⁵ FP-I3ID (Instituto de Investigação, Inovação e Desenvolvimento), FP-BHS (Biomedical and Health Sciences Research Unit), Faculty of Health Sciences, University Fernando Pessoa.

Autor para correspondência: Ana Catarina Silva; anacatsil@gmail.com; Rua Carlos da Maia, 296; 4200-150 Porto, Portugal.

Submetido/Submitted: 30 e novembro de 2022 | Aceite/Accepted: 06 de fevereiro de 2023

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo médio de peixe, moluscos e crustáceos tem vindo a aumentar significativamente, dado que estes são cada vez mais reconhecidos por integrarem uma dieta saudável, e contribuírem de forma positiva para a saúde e bem-estar dos seus consumidores. No entanto, o aumento do consumo destes organismos só é possível devido ao aumento maciço da sua produção, o que se deve, sobretudo, aos avanços tecnológicos da atividade piscatória, nomeadamente às grandes frotas de pesca equipadas com tecnologia avançada para capturar e congelar uma maior quantidade de peixes, moluscos e crustáceos e com capacidade de suportar longas viagens, mas, também, aos rápidos desenvolvimentos da aquicultura¹⁻³. O impressionante aumento do consumo de organismos marinhos vem acompanhado de vários desafios, sendo um deles a formação de grandes quantidades de resíduos sólidos resultante do processamento que estes organismos recebem antes de serem colocados no mercado, e que inclui mais de 70% do total de peixes, moluscos e crustáceos capturados. Este processamento é um requisito imposto por várias empresas, de forma a reduzir o custo associado ao transporte de partes não comestíveis destes organismos, e a melhorar a estabilidade e qualidade dos produtos, removendo as partes suscetíveis de ter bactérias e enzimas, e que são um risco durante o seu armazenamento. Dependendo das espécies processadas, estes resíduos incluem peixes inteiros de baixa qualidade, esqueletos de peixes e materiais das conchas e cascas, no caso dos moluscos e crustáceos, entre outros resíduos provenientes de animais marinhos^{1,2,4}.

Estes resíduos marinhos, que podem também ser designados de bio-resíduos, são depositados em aterros sanitários ou são utilizados para fabricar rações animais ou fertilizantes. No entanto, a rejeição destes bio-resíduos em aterros sanitários causa inúmeros problemas ambientais, como a formação de maus odores, a poluição do ar e do solo e prejuízos no ecossistema marinho, devido ao elevado conteúdo orgânico e mineral, podendo ainda causar problemas sociais e económicos^{2,5}.

Dada a quantidade resultante destes bio-resíduos, que é da ordem das dezenas de milhões de toneladas por ano, a Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e a Organização para a Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization*, FAO), têm vindo a reconhecer o papel essencial da pesca e da aquicultura, destacando os vários desafios deste setor, que incluem, para além da redução da pesca, a sustentabilidade biológica e a necessidade de melhorar a recuperação e a valorização dos resíduos resultantes do processamento dos organismos marinhos, uma vez que representam um recurso de extraordinária riqueza química que deve ser valorizado^{1,3,6}.

A recuperação e a valorização dos resíduos resultantes do processamento dos organismos marinhos têm sido sugeridas como uma solução inovadora, e com potencial do ponto de vista ambiental, social e económico, dado que estes bio-resíduos são reservatórios ricos em componentes biofuncionais estruturalmente diversos, devido ao ambiente competitivo, exigente e agressivo em que vivem, e que lhes permite produzir com-

postos diferentes dos que são produzidos no ambiente terrestre. Desta forma, estes compostos, que são já reconhecidos pelas suas diversas atividades, tais como anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, imunomoduladora, entre outras, podem ser utilizados no desenvolvimento de produtos de valor acrescentado em várias indústrias, em particular na indústria farmacêutica^{4,5}.

Várias investigações demonstraram o potencial de utilização de diferentes subprodutos provenientes de organismos marinhos, como a pele e, no caso dos crustáceos, as cascas de caranguejo e de camarão, na obtenção de vários compostos bioativos, enzimas e outras proteínas funcionais que podem ser usadas na terapêutica de várias doenças, tais como as doenças neurodegenerativas, cardíacas, diabetes e em certos tipos de cancro^{2-4,7}. Deste modo, têm sido desenvolvidos vários processos de bioconversão com o objetivo de utilizar estes subprodutos na formação de novos produtos com potencial para contribuir para a saúde e bem-estar do ser humano, sendo este propósito cada vez mais abordado, uma vez que o uso convencional destes bio-resíduos, quer em rações animais, quer em fertilizantes tem um custo relativamente baixo².

Vários compostos bioativos podem ser isolados a partir dos resíduos de camarão, incluindo os quito-oligosacarídeos derivados da quitina; a astaxantina, um carotenóide vermelho com elevada capacidade antioxidante, o ómega-3, entre outros. A cartilagem nasal do salmão é uma valiosa fonte de proteoglicanos com atividade antiangiogénica que podem ser usados para diminuir o desconforto da dor nas articulações em

pessoas idosas ou na promoção da cicatrização de feridas⁴. A pele do peixe é uma importante fonte de colagénio, que pode ser hidrolisado em péptidos bioativos com atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antidiabéticas, apresentando também potencial para melhorar a memória⁴.

O potencial das macroalgas como fonte de compostos nitrogenados bioativos foi recentemente demonstrado. As algas marinhas contêm uma grande quantidade de fitonutrientes que apresentam atividade antioxidante, anticoagulante, antimicrobiana, antidiabética, anticancerígena e anti-inflamatória. As algas pertencentes ao género Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta, são consideradas ricas em fibras dietéticas, ómega-3, betacaroteno, astaxantina, vitamina C, entre outros compostos benéficos para a saúde do homem⁴.

Muitos compostos bioativos apresentam limitações de utilização relacionadas com a sua baixa solubilidade aquosa, estabilidade, dificuldade em atingir o local alvo de ação, entre outras. Isto fez com que fosse necessário desenvolver novos sistemas capazes de encapsular este tipo de compostos. Neste contexto e, tendo em conta as suas características únicas, o uso de nanossistemas tem apresentado resultados promissores^{5,6}. Entre estes, as nanopartículas lipídicas têm sido utilizadas para encapsular bio-resíduos de forma eficiente, minimizando as suas limitações, melhorando o direcionamento para o local alvo da ação e promovendo a sua atividade^{7,8}.

A utilização de bio-resíduos derivados de organismos marinhos apresenta também múltiplos benefícios dentro do paradigma da economia circular, ao

promover uma maior sustentabilidade da indústria pesqueira e da aquicultura, reduzindo o impacto da exploração antrópica dos recursos marinhos⁵.

Biomoléculas de origem marinha com propriedades antioxidantes

O stress oxidativo induzido por espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS), tais como o ácido nítrico, peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo, é a principal causa de processos inflamatórios que conduzem a diferentes doenças, incluindo o cancro, a diabetes, as neurodegenerativas e as cardiovasculares⁹. Desta forma, a compreensão dos mecanismos de stress oxidativo, bem como a descoberta de novos compostos antioxidantes são importantes fatores de estudo. Várias investigações demonstraram uma forte correlação entre a utilização de compostos com propriedades antioxidantes e o risco reduzido do desenvolvimento de

doenças cardiovasculares e de cancro⁹. A principal preocupação da indústria biotecnológica é encontrar compostos antioxidantes originários de fontes naturais de modo a substituir os antioxidantes artificiais, como o butilhidroxitolueno (BHT) e o butilhidroxianisol (BHA), cujos perfis de segurança são cada vez mais controversos, devido à ocorrência de toxicidade hepática e ao risco de potenciar a carcinogénese⁹. Nos últimos anos, as moléculas antioxidantes naturais, extraídas de bio-recursos, têm vindo a substituir a utilização de antioxidantes sintéticos⁹. Entre as biomoléculas antioxidantes provenientes de organismos marinhos destacam-se as enzimas (catalase e superóxido dismutase), os carotenóides, os péptidos bioativos e os polissacarídeos^{9,10}.

A Tabela 1 apresenta exemplos de biomoléculas antioxidantes provenientes de organismos marinhos e as suas aplicações terapêuticas.

Tabela 1. Exemplos de biomoléculas antioxidantes provenientes de organismos marinhos^{5,9,11-33}.

Biomolécula	Fonte natural	Aplicação terapêutica
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, podendo ser utilizada na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.
Fucoxantina	<i>Laminaria japonica</i>	Propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, podendo ser utilizada na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas.
Betacaroteno	<i>Dunaliella salina</i>	Propriedades antioxidantes, podendo ser utilizada na prevenção da fibrose hepática, nictalopia, síndrome coronária aguda e crónica, na prevenção de doenças neurodegenerativas e na proteção da pele contra a radiação UV.

Tabela 1. Exemplos de biomoléculas antioxidantes provenientes de organismos marinhos^{5,9,11-33} (cont.).

Colagénio	<i>Theragra chalcogramma</i>	Propriedades antioxidantes <i>in vitro</i> , sendo muito utilizado na indústria cosmética como rejuvenescedor. Pode ser incorporado em suplementos nutricionais.
Gelatina	<i>Dosidicus gigas</i>	Propriedades antioxidantes e antiproliferativas, podendo ser utilizada na prevenção do cancro.
	<i>Thunnus spp.</i>	Propriedades antioxidantes <i>in vitro</i> .
Quitina	Crustáceos	Propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas e anticoagulantes; reforço do sistema imunológico, promoção da homeostasia e favorecimento da cicatrização de feridas.
Rifamicina	<i>Pseudoceratina clavata</i>	Propriedades anti-infecciosas e neuroprotetoras, podendo ser utilizada no tratamento e prevenção da doença de Alzheimer.
Undecilprodigiosina	<i>Streptomyces</i>	Propriedades antioxidantes, podendo ser utilizada no tratamento e prevenção da doença de Alzheimer.
Gracilinas	<i>Spongionella gracilis</i>	Propriedades antioxidantes e neuroprotetoras, podendo ser utilizada no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas.

Carotenóides

Os carotenóides têm sido alvo de uma atenção significativa devido às suas aplicações relevantes no domínio da indústria farmacêutica e biotecnológica, relacionadas com os seus efeitos antioxidantes. Estes são compostos lipofílicos que podem apresentar diferentes cores, como amarelo, laranja e vermelho. Os carotenóides são tetraterpenóides cons-

tituídos por 40 átomos de carbono unidos por unidades opostas no centro da molécula, e são categorizados em dois grupos: carotenos e xantofilas. Os carotenos são apenas hidrocarbonetos e as xantofilas são subprodutos oxigenados dos carotenos. As xantofilas são compostos bastante hidrofílicos devido aos grupos hidroxilo e ceto que contêm nos anéis finais⁹.

Astaxantina

A astaxantina é um carotenóide xantofílico de cor vermelha que é isolado maioritariamente a partir da microalga *Haematococcus pluvialis*, que acumula níveis muito elevados deste composto em condições de stress, como por exemplo, elevada salinidade, elevada temperatura e deficiência de nitrogénio. No entanto, a astaxantina também pode ser extraída de organismos marinhos, incluindo o salmão e o camarão, nos quais é responsável pela coloração³⁴⁻³⁶.

A astaxantina é quimicamente conhecida por 3,3'-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona, sendo uma molécula altamente lipofílica^{35,37}. A sua estrutura química apresenta 2 anéis com um grupo hidroxilo e um grupo carbonilo, um em cada extremidade, que apresentam ligeira solubilidade em água, separados por ligações duplas carbono-carbono. Esta configuração específica, nomeadamente, a cadeia de polieno, confere à astaxantina uma poderosa atividade antioxidante na eliminação de radicais livres, sendo 40 a 100 vezes mais eficaz como antioxidante do que o betacaroteno e a vitamina E ou tocoferol, respetivamente^{34,35,38}.

Por ser o carotenóide com maior atividade antioxidante, a astaxantina tem vindo a ganhar destaque devido às suas características neuroprotetoras³⁹. Desta forma, a astaxantina tem demonstrado em várias investigações o seu valioso impacto para a saúde humana, na prevenção do cancro, na diminuição do risco das doenças cardiovasculares e das doenças neurodegenerativas, resultantes da sua forte atividade antioxidante⁹.

Betacaroteno

O betacaroteno é um carotenóide extraído de uma microalga halotolerante

denominada de *Dunaliella salina*. Este composto e os seus derivados são muito conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, uma vez que na sua estrutura apresentam ligações duplas conjugadas, o que lhes permite aceitar eletrões de espécies reativas e neutralizar os radicais livres, sendo considerados excelentes eliminadores de ROS^{9, 40}.

Várias investigações demonstraram que, para além das suas propriedades antioxidantes, o betacaroteno tem muitos outros benefícios para a saúde humana, tais como a prevenção da fibrose hepática, a atividade de pró-vitamina A, a prevenção da nictalopia e da síndrome coronária (aguda e crónica), as propriedades anti-neurodegenerativas e o potencial na fotoproteção da pele contra os raios UV⁹.

Péptidos bioativos

Recentemente, vários péptidos bioativos foram obtidos a partir da hidrólise de proteínas extraídas de animais marinhos. Os péptidos bioativos são, então, fragmentos específicos de proteínas que apresentam diversas atividades, entre as quais se destaca a atividade antioxidante^{18,41}. Estes péptidos antioxidantes têm entre 2 e 20 resíduos de aminoácidos e apresentam uma conhecida capacidade de eliminação de radicais livres, de quelatação de iões metálicos e de inibição da peroxidação lipídica. Embora a relação exata da estrutura-atividade antioxidante dos péptidos bioativos ainda não tenha sido completamente estabelecida, acredita-se que o tipo, a posição e a hidrofobicidade dos aminoácidos presentes desempenhem um papel essencial³.

Nos últimos anos, vários estudos científicos demonstraram que os péptidos

bioativos obtidos da hidrólise enzimática de vários subprodutos marinhos podem promover a saúde humana, além de auxiliar na prevenção de doenças crônicas. Em particular, há um grande número de estudos sobre a hidrólise enzimática de colagénio utilizado para a produção de péptidos bioativos. O colagénio é uma proteína estrutural muito importante, encontrada em quantidades consideráveis em resíduos marinhos, principalmente, na pele, ossos e escamas dos peixes. Esta proteína e a sua forma parcialmente hidrolisada, a gelatina, são ricas em aminoácidos hidrofóbicos que parecem desempenhar uma potente eliminação de radicais livres. De facto, foi demonstrado que os péptidos derivados da gelatina da pele de animais marinhos, como a lula voadora e o atum, possuem atividade antioxidante associada à presença de aminoácidos hidrofóbicos, quando comparada com o potente antioxidante natural α -tocoferol^{3,18}.

O colagénio é muito utilizado na indústria cosmética, como um ingrediente chave para o rejuvenescimento da pele, sendo maioritariamente incorporado em cremes, mas também em suplementos nutricionais, com o objetivo de promover a regeneração dos ossos e das cartilagens¹⁹. Com efeito, os péptidos bioativos de origem marinha com propriedades antioxidantes podem ter um grande potencial de utilização na indústria farmacêutica.

Polissacarídeos

Vários estudos revelaram que muitos polissacarídeos derivados de organismos marinhos exibem atividade antioxidante, sugerindo que estes compostos podem ser utilizados na prevenção de

doenças relacionadas com o stress oxidativo, como é o caso das doenças neurodegenerativas e alguns tipos de cancro¹⁰.

Entre os diferentes polissacarídeos que podem ser extraídos de organismos marinhos, destaca-se a quitina que pode ser facilmente obtida a partir de exosqueletos de artrópodes marinhos, como crustáceos (caranguejo, camarão, lagosta, entre outros), chocos e lulas. No entanto, a utilização de quitina apresenta algumas limitações, pelo que tem sido usado em alternativa o quitosano, um composto obtido a partir da quitina que permite ultrapassar as suas limitações, ao mesmo tempo que mantém as suas propriedades únicas que podem ser exploradas pela indústria farmacêutica.

A quitina e o quitosano apresentam diversas propriedades biológicas, tais como as propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, anticoagulantes, imunológicas, homeostasia e promoção da cicatrização de feridas^{20,24}.

É ainda importante referir que a hidrólise do quitosano permite obter oligossacarídeos designados por quito-oligosacarídeos (COS), que apresentam, também, a vantagem de serem muitos solúveis em água, e várias atividades com interesse terapêutico, que incluem a atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral^{21,22}.

Recentemente, foi reportado que estes compostos possuem boas propriedades neuroprotetoras, com atividades de anti-neuroinflamação e anti-apoptose, o que sugere que os COS podem ser alvo de uma maior investigação para avaliar o seu potencial de utilização como agentes neuroprotetores^{22,23}.

Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela destruição progressiva e irreversível dos neurónios, que conduzem ao comprometimento da função motora e cognitiva dos indivíduos com esta patologia⁴².

O envelhecimento é considerado o principal fator de desenvolvimento dos processos neurodegenerativos, uma vez que a incidência destas doenças se torna mais comum na população com o avançar da idade. No entanto, o envelhecimento é um processo inevitável e contínuo e, por isso, é essencial a compreensão, a prevenção e o tratamento destas doenças, de modo a que o aumento da longevidade humana não implique a necessidade de lidar com doenças neurodegenerativas debilitantes e difíceis de tratar^{11,43,44}. Nesse sentido, a identificação dos fatores que contribuem para o desenvolvimento dos processos neurodegenerativos é um dos principais objetivos da medicina moderna^{45,46}. Apesar das várias investigações existentes nesta área, na atualidade, estas doenças representam um problema de saúde primário, estimando-se que em 2040 sejam a principal causa de morte. Entre estas doenças, destacam-se a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP), a doença de Huntington (DH) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA)^{42,44,47}.

A DA é a doença neurodegenerativa mais comum, estimando-se que cerca de 10% da população mundial com idade superior a 60 anos seja afetada por esta condição, em que os sintomas principais da doença incluem a perda de memória, distúrbios comportamentais e declínio de capacidades cognitivas, prejudican-

do significativamente a vida diária dos doentes⁴⁷⁻⁴⁹.

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, estimando-se que cerca de 2% da população com idade superior a 60 anos seja afetada por esta condição. Os doentes apresentam como principais sintomas a rigidez muscular, a lentificação dos movimentos e o agravamento progressivo da capacidade motora, nomeadamente, a perda de equilíbrio⁴⁸.

A DH é uma doença neurodegenerativa progressiva hereditária, autossómica dominante, caracterizada por afetar a coordenação motora do doente, e, em simultâneo, a sua função cognitiva e comportamental^{6,50}.

Os pacientes portadores de ELA apresentam paralisia progressiva e insuficiência respiratória, uma vez que a doença é caracterizada pela perda progressiva e irreversível dos neurónios motores localizados no córtex cerebral, tronco cerebral e medula espinal. Esta doença grave resulta em um aumento involuntário da contração muscular e na perda de massa muscular, levando a que o doente apresente dificuldades em comunicar, engolir e respirar^{12,42,44,46}.

A complexa patogénese das doenças neurodegenerativas ainda não é totalmente conhecida. As evidências sugerem que fenómenos complexos como o stress oxidativo, consequente da disfunção mitocondrial e de processos de neuroinflamação, pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento destas doenças, uma vez que têm como consequência direta a perturbação da homeostasia do sistema nervoso central (SNC)^{11,42,51}.

Mecanismos de neurodegeneração

Stress oxidativo e disfunção mitocondrial

O stress oxidativo tem sido identificado como um fator que desempenha um papel potencial na patogênese das doenças neurodegenerativas, ocorrendo quando há uma elevada formação de moléculas reativas que não é contrabalançada pelas defesas antioxidantes do organismo, ou seja, é uma condição provocada pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes^{6,10}.

As moléculas reativas são as ROS e as espécies reativas de nitrogénio (do inglês *Reactive Nitrogen Species*, RNS). Entre estas moléculas, as que estão envolvidas no processo da neurodegeneração são, essencialmente, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), os radicais hidroxilo (OH^{\bullet}), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e os aniões peroxinitrito ($ONOO^-$)^{46,48}.

Em condições fisiológicas normais, as moléculas potencialmente instáveis e citotóxicas (ROS e RNS) desempenham funções regulatórias e mediadoras importantes nos processos fisiológicos, nomeadamente, na defesa do hospedeiro, na transcrição de genes, na regulação sináptica e na morte celular programada. Deste modo, pequenas quantidades de espécies reativas não causam danos e coordenam-se com o sistema antioxidante do organismo de forma a manter a sua homeostasia. No entanto, um aumento descontrolado nas concentrações de espécies reativas supera a atividade antioxidante celular, isto é, origina um défice das reservas antioxidantes do organismo, induzindo o stress oxidativo, e provocando uma cadeia de reações que aumenta o risco de dano de algumas

moléculas biológicas, podendo provocar modificações translacionais e a oxidação de proteínas, oxidação de hidratos de carbono, danos nos ácidos nucleicos e peroxidação lipídica^{6,47,50,52-54}.

Atualmente, acredita-se que as mitocôndrias são a fonte mais significativa da produção de ROS dentro das células. No entanto, em circunstâncias normais, as mitocôndrias desempenham um papel fundamental no fornecimento de trifosfato de adenosina (do inglês *Adenosine Triphosphate*, ATP) às células por meio de uma fosforilação oxidativa, transferindo os eletrões entre 5 complexos (I,II,III,IV,V), no qual o oxigénio desempenha um papel substancial. Nesse sentido, as mitocôndrias são consideradas responsáveis pela produção de ROS, por serem as maiores consumidoras de oxigénio intracelular. Em condições metabólicas normais, os complexos III e I são os principais locais de produção de ROS, sendo apenas 1 a 5% do oxigénio convertido em ROS. Esta é a percentagem ideal destas espécies no organismo, de forma a que desempenhem as suas funções regulatórias, sem comprometer a homeostasia^{48,50,52}. Contudo, durante o processo de transferência de eletrões entre os complexos da mitocôndria, aproximadamente 0,2 a 2% dos eletrões são perdidos e não seguem a ordem de transferência usual, sendo absorvidos por moléculas de O_2 presentes no local, formando-se o radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ ⁵¹. Níveis elevados deste radical superóxido são responsáveis por provocar o aumento do stress oxidativo, danos no DNA mitocondrial, lesão celular e instabilidade genómica. O DNA mitocondrial, por si, e uma vez danificado, também amplifica o stress oxidativo, aumentan-

do a produção de ROS que danificam proteínas importantes no transporte dos eletrões entre os 5 complexos. Deficiências no processo de transferência de eletrões entre os complexos geram ineficiência da função mitocondrial, isto é, na produção de ATP, gerando ainda mais espécies reativas de oxigénio, criando-se um ciclo vicioso da produção de ROS^{48,50}. Desta forma, a disfunção mitocondrial também tem sido considerada como uma das principais causas do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, uma vez que defeitos na atividade da mitocôndria fazem com que a sua função seja comprometida e que esta deixe de fornecer ATP às células, comprometendo a atividade do SNC^{48,55}.

O cérebro é particularmente suscetível aos efeitos prejudiciais das ROS, devido ao seu elevado consumo de oxigénio e ao grande conteúdo em lípidos que desempenham um papel fundamental na função neuronal. Embora o cérebro seja metabolicamente muito ativo, este apresenta menor capacidade de regeneração celular, quando comparado com outros órgãos. Assim, os efeitos das espécies reativas no cérebro são muito notáveis, em particular nas células neuronais, uma vez que estas apresentam um elevado conteúdo de ácidos gordos polinsaturados nas membranas e níveis relativamente baixos de defesas antioxidantes. Deste modo, a produção excessiva de espécies reativas leva imediatamente ao seu dano, e, em última instância, à sua morte^{47,48,50,52}.

A disfunção progressiva e a morte das células neuronais amplificam a disfunção neuronal e desencadeiam processos de neurodegeneração, contribuindo para o desenvolvimento das doenças neurode-

generativas. Desta forma, o stress oxidativo e a disfunção mitocondrial são dois fatores que demonstram um papel preponderante no desenvolvimento destas doenças^{11,48,55}. No entanto, a teoria de que é o envelhecimento a principal causa destas doenças não pode ser rejeitada na sua totalidade, uma vez que durante o processo de envelhecimento há um aumento da formação de ROS, derivadas da disfunção mitocondrial, e da diminuição das defesas antioxidantes do organismo, o que permite concluir que o envelhecimento também contribui para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas^{6,13,43,48}.

Neuroinflamação

A neuroinflamação também tem demonstrado um papel significativo no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, sendo provocada por uma ampla gama de mediadores inflamatórios neurotóxicos e respostas imunológicas originadas no cérebro ou na sua periferia^{45,51,56}.

Em condições normais, o SNC é capaz de reagir rapidamente a situações patológicas através de uma complexa cascata de respostas que envolve a atividade de mediadores inflamatórios, como as células gliais e os mastócitos. No entanto, uma alteração no ambiente do SNC causada, por exemplo, por uma infeção ou lesão neuronal, ativa as células microgliais e os astrócitos. Em condições normais, as células microgliais do SNC desempenham um papel imunoprotetor, através da eliminação de neurónios danificados, agentes infecciosos e outras substâncias potencialmente prejudiciais, e promovem a neuroplasticidade e a libertação de fatores neuro-

tróficos específicos, de forma a manter a função cerebral normal. No entanto, em caso de dano neuronal prolongado que comprometa a homeostasia do SNC, dependendo da extensão e do grau da situação patológica, as células microgliais existentes no SNC podem tornar-se pró-inflamatórias, isto é, deixam de realizar as suas funções habituais para promover processos inflamatórios. Por isso, embora a ativação microglial seja um componente essencial de um sistema imunológico saudável, uma ativação microglial anormal ou prolongada prejudica a função neuronal, uma vez que estas células libertam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas citotóxicas, ROS, resultando no dano das células neuronais e, simultaneamente, na promoção do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas^{44,45}.

Também no contexto do processo da neuroinflamação, a teoria de que o envelhecimento potencia o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas não pode ser desconsiderada, uma vez que se observa que em indivíduos mais jovens a ativação das células microgliais é resolvida rapidamente, de modo a que a homeostasia do cérebro seja rapidamente restaurada. Por outro lado, em indivíduos mais velhos observa-se uma resposta mais poderosa e prolongada das células microgliais, resultando na produção de maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, durante um longo período de tempo, que irão danificar o tecido cerebral e prejudicar a função neuronal¹⁴⁴.

Mecanismos de desenvolvimento das doenças neurodegenerativas

Vários estudos apresentaram resultados positivos na relação entre o stress oxidativo, a disfunção mitocondrial e os processos de neuroinflamação no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, uma vez que estes fatores contribuem de uma forma significativa para a deterioração neurológica^{14,42,52}. A figura 1 representa a relação entre o stress oxidativo e a disfunção mitocondrial no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas.

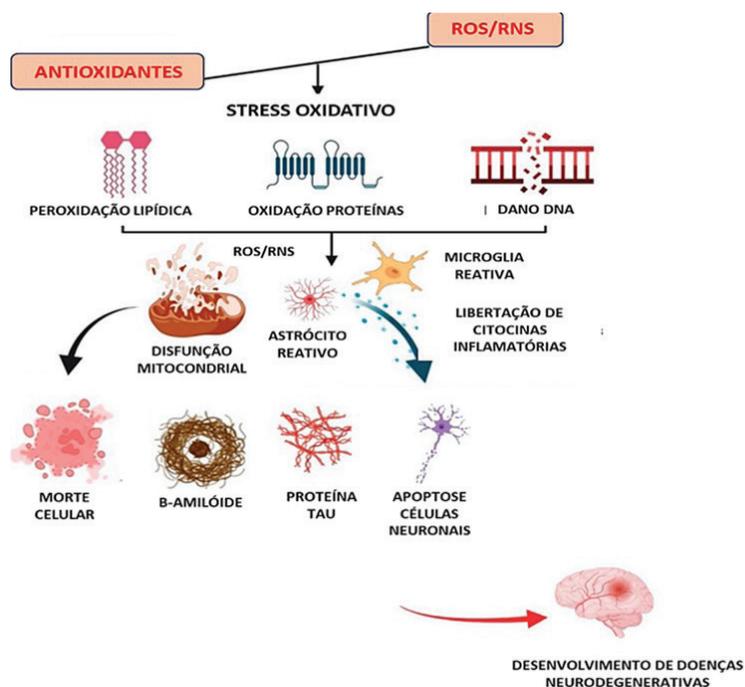


Figura 1. Impacto do stress oxidativo e da disfunção mitocondrial no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Adaptado com permissão⁵⁷.

A fisiopatologia da DA está principalmente associada à deposição de placas no cérebro que contêm depósitos do peptídeo β -amilóide e emaranhados neurofibrilares da proteína tau hiperfosforilada nos neurónios. Diferentes estudos evidenciam que o stress oxidativo é um fator importante no desenvolvimento desta doença, uma vez que as investigações sugerem que as ROS apresentam um efeito nocivo sobre as biomoléculas. Neste caso, as ROS têm demonstrado efeitos negativos sobre o peptídeo β -amilóide, promovendo a sua acumulação no cérebro, bem como a polimerização e hiperfosforilação da proteína tau^{26,35,50,56}.

A disfunção mitocondrial e os processos de neuroinflamação também contribuem para o desenvolvimento da DA, uma vez que têm um papel significativo na superprodução de ROS, sendo um fator de agravamento do desenvolvimento das principais patologias associadas a esta doença^{6,43,48,50}.

A DP é caracterizada pela degeneração de uma pequena parte do cérebro denominada substância negra na qual se situam os neurónios dopaminérgicos. A perda desses neurónios faz com que o cérebro fique desprovido de dopamina, que é a substância que permite que as células cerebrais envolvidas no controlo do movimento comuniquem^{43,54}. Alguns estudos demonstraram que a perda dos neurónios responsáveis pela síntese de dopamina é de cerca de 80% a 90% na substância negra dos doentes com DP⁴⁸. Os mecanismos patológicos subjacentes à degeneração dos neurónios dopaminérgicos foram relacionados com o excesso de produção de ROS causado pelo processo de disfunção mitocondrial. Está

descrito em vários artigos científicos que a substância negra dos doentes com DP apresenta níveis elevados de lípidos e proteínas oxidados resultantes da presença de ROS. No entanto, para além das ROS, as RNS são encontradas em grande quantidade nas células, bem como no espaço extracelular em torno dos neurónios dopaminérgicos em doentes com DP^{6,54}. Estes neurónios são particularmente suscetíveis ao stress oxidativo e, por isso, a elevada quantidade de ROS resultante de disfunções da mitocôndria e de processos de neuroinflamação pode induzir a apoptose das células neuronais promovendo a progressão da doença⁴³.

A disfunção mitocondrial é, assim, uma das causas associada à patogénese da DP, uma vez que desencadeia o aumento da quantidade de ROS e, conseqüentemente leva à peroxidação de lípidos mitocondriais, causando a apoptose deste organelo. Sendo os neurónios metabolicamente muito ativos e dependentes do ATP produzido pelas mitocôndrias, a sua atividade fica também comprometida, o que promove o desenvolvimento da DP^{42,48,56}.

No que diz respeito à DH, tem sido demonstrado que a sua principal causa é a mutação do gene huntingtina que resulta na expressão de uma proteína suscetível à agregação. No entanto, vários estudos indicam outros fatores e processos associados ao desenvolvimento desta doença, tais como o stress oxidativo e a disfunção mitocondrial. Tal como nas outras doenças neurodegenerativas, são evidentes, em doentes com DH, biomoléculas danificadas devido à presença de ROS, sendo possível observar-se a oxidação de lípidos, carbonilação de proteínas e danos no DNA. Deste modo,

o stress oxidativo demonstra estar, também, envolvido na principal causa do desenvolvimento da DH^{6,42,50}.

Na ELA, aproximadamente 10% dos casos são resultantes de causas genéticas hereditárias que têm origem na mutação do gene responsável pela expressão da superóxido dismutase 1 (SOD1). Esta enzima constitui um sistema antioxidante do organismo que tem várias funções, entre elas a eliminação do radical superóxido, quando este se encontra em excesso, a modulação da respiração celular e o metabolismo energético. A espécie mutante da SOD1 aumenta a produção de ROS, uma vez que potencia a atividade das células microglias, amplificando o stress oxidativo. Este aumento do stress oxidativo derivado do processo de neuroinflamação tem vindo a ser considerado um possível fator para a causa da morte dos neurónios motores observada em pacientes com ELA^{6,42,44}.

Por outro lado, 90% dos casos de ELA são esporádicos, e, por isso, a identificação dos fatores que levam ao seu desenvolvimento permanece indefinida. No entanto, várias investigações indicam uma possível relação entre o stress oxidativo, o processo de neuroinflamação e a disfunção mitocondrial no desenvolvimento desta doença^{6,42}.

Administração de fármacos e compostos bioativos no tratamento de doenças neurodegenerativas

O conhecimento dos mecanismos que conduzem ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas é cada vez maior, embora o desenvolvimento de fármacos eficazes que inibam ou retardem a progressão destas doenças é ainda reduzido, apesar dos grandes avanços da área^{58,59}.

Os tratamentos atualmente existentes para o tratamento das doenças neurodegenerativas requerem a administração de doses elevadas de fármaco para atingirem níveis terapêuticos eficazes no cérebro, o que origina efeitos secundários indesejáveis⁵⁹⁻⁶¹.

A principal barreira ao direcionamento de fármacos para o cérebro é a BHE, que é fundamental na manutenção da homeostasia do SNC, dado que permite a troca eficiente de nutrientes entre o sangue e o cérebro e, ao mesmo tempo, impede a entrada de agentes patogênicos e xenobióticos responsáveis por danificar as funções neurológicas normais. Em particular, a BHE evita a entrada no cérebro de moléculas hidrofílicas, ionizadas e de elevado peso molecular, dado que é constituída por células endoteliais, sem fenestras e com junções intercelulares extremamente apertadas, o que a torna uma barreira eficaz^{59,62-64}. Com efeito, estima-se que a BHE impeça a passagem de cerca de 98% destas moléculas, quando administradas por via intravenosa. De acordo com os dados da FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), mais de 90% dos novos fármacos desenvolvidos para tratar doenças do SNC não foram aprovados devido à dificuldade que apresentavam em atravessar a BHE^{56,62,63,65,66}. Por este motivo, verifica-se um crescente número de estudos que têm como principal objetivo de investigação a procura de novas estratégias eficazes de transporte de fármacos para o SNC^{58,67}. Neste contexto, a via intranasal surge como uma alternativa promissora para o acesso direto dos fármacos do nariz para o cérebro, no tratamento de diferentes doenças neurodegenerativas^{63,68,69}.

Via intranasal

Algumas investigações recentes sugerem a via intranasal como uma abordagem promissora para melhorar o transporte de fármacos para o SNC, uma vez que esta via apresenta a possibilidade de transportar as moléculas diretamente do nariz para o cérebro, evitando a necessidade de atravessarem a BHE⁷⁰. Além desta importante vantagem, esta via tem demonstrado benefícios, em compara-

ção com outras vias, como as parentéricas ou a oral, devido ao seu caráter não invasivo, facilidade de administração, possibilidade de evitar a degradação gastrointestinal e o efeito de primeira passagem de alguns fármacos orais, e a elevada área e vascularização da mucosa nasal^{58,63}. As principais vantagens e limitações da via intranasal estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e limitações da via intranasal.

VANTAGENS	LIMITAÇÕES
<ul style="list-style-type: none"> • Fácil acessibilidade ao cérebro e caráter não invasivo. • Possibilidade de transporte de fármacos diretamente para o SNC, evitando a necessidade de atravessarem a BHE. • Evita a degradação dos fármacos no trato gastrointestinal. • Evita o rápido metabolismo hepático resultante do efeito de primeira passagem. • Absorção rápida dos fármacos para a corrente sanguínea. • Maior biodisponibilidade dos fármacos, permitindo a administração de doses mais baixas. • Reduzido risco de sobredosagem. • Possibilidade de autoadministração e facilidade de ajuste da dose. 	<ul style="list-style-type: none"> • O volume máximo a administrar deve ser até 200 μL. • Eliminação rápida dos fármacos na cavidade nasal devido ao mecanismo fisiológico de depuração mucociliar. • Degradação enzimática dos fármacos relacionada com a presença de carboxipeptidases, endopeptidases e da glicoproteína-P na cavidade nasal. • Pequena área de superfície de absorção quando comparada com a área do trato gastrointestinal. • Possibilidade de irritação nasal e interferência na absorção dos fármacos em situações de congestão nasal. • Baixa permeabilidade para fármacos com peso molecular superior a 1kDa. • Variabilidade interindividual pode afetar a absorção dos fármacos.

Adaptado⁷¹

4.1.1. Anatomia e fisiologia da cavidade nasal

O conhecimento da anatomia e fisiologia da cavidade nasal é fundamental para entender os mecanismos de libertação e absorção dos fármacos através da mucosa nasal e facilitar o desenvolvimento de formulações novas, com maior eficácia terapêutica no tratamento das doenças neurodegenerativas^{59,68}.

A cavidade nasal (figura 2) possui uma superfície total com cerca de 160 cm², aproximadamente 13 ml de volume e um comprimento de 12-14 cm, desde as narinas até à nasofaringe⁶³. O interior desta cavidade divide-se, pelo septo nasal, em duas cavidades idênticas, sendo cada uma delas composta por três regiões distintas: vestibular, respiratória e olfatória^{59,63}.

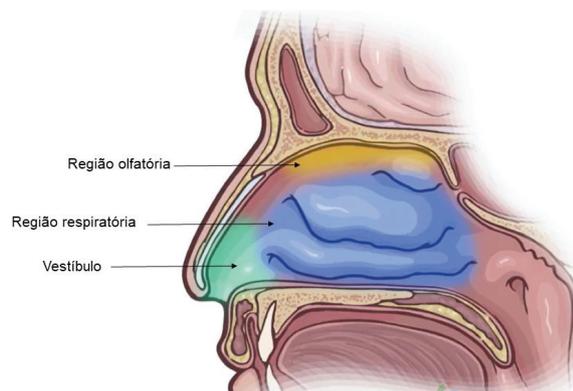


Figura 2. Esquema representativo da cavidade nasal.

A região vestibular compreende uma área de 0,6 cm² e representa a região frontal da cavidade nasal, que é revestida por epitélio estratificado e escamoso e contém glândulas sebáceas e sudoríparas, e cílios responsáveis pela filtração do ar inalado. Por este motivo, esta região constitui uma barreira contra a entrada de agentes patogénicos no organismo, sendo também uma barrei-

ra à administração de fármacos^{63,72}. Em contraste, a região respiratória é a região mais vascularizada e permeável da cavidade nasal, sendo constituída por um elevado número de vasos sanguíneos que facilitam a absorção dos fármacos para a corrente sanguínea. É ainda constituída pelos neurónios sensoriais trigémeos que permitem o transporte de fármacos desde a cavidade nasal até ao cérebro. É importante referir que esta é a maior região da cavidade nasal, com uma área aproximada de 130 cm², coberta por um epitélio pseudoestratificado constituído por 4 tipos de células: basais, calciformes, e células do epitélio colunar ciliadas e não ciliadas^{63,72,73}.

A região olfatória situa-se na parte superior da cavidade nasal e compreende cerca de 10% da sua área total. Esta região tem uma área aproximada de 2,5 cm² e é constituída por células de suporte, basais e neurónios recetores olfatórios. A região olfatória está situada abaixo da placa cribiforme, uma estrutura óssea composta por pequenos poros com feixes neuronais, que permite a passagem de compostos do epitélio olfatório para o SNC. Deste modo, esta região liga diretamente a mucosa nasal ao cérebro, representando um acesso direto a este órgão^{63,72}.

Numa perspetiva fisiológica, a cavidade nasal desempenha uma função protetora, atuando como um filtro de partículas e microrganismos que ficam aprisionados na região vestibular e/ou na camada de muco que reveste o interior da cavidade nasal. O muco nasal é constituído por cerca de 95% de água, 3% de mucina e 2% de eletrólitos, lípidos e enzimas proteolíticas. Os compostos que ficam aprisionados no muco são arrastados

até à nasofaringe, com o auxílio do movimento dos cílios, e são eliminados no trato gastrointestinal. Este mecanismo designado por depuração mucociliar ou clearance mucociliar é um mecanismo fisiológico da cavidade nasal, que ocorre a cada 15-30 minutos e é responsável pela função protetora que a cavidade nasal desempenha no organismo^{63,69,74}.

Transporte direto do nariz para o cérebro

Os mecanismos de transporte direto de compostos do nariz para o cérebro têm sido extensivamente estudados através do desenvolvimento de novas formulações que facilitem o tratamento das doenças do SNC^{59,63}.

Embora exista um elevado número de estudos nesta área, não há ainda consenso relativo ao mecanismo exato de transporte direto de compostos do nariz para o cérebro. As várias investigações realizadas descrevem que as moléculas administradas por via intranasal são inicialmente sujeitas ao mecanismo de depuração mucociliar, que ocorre na região vestibular. Posteriormente, as moléculas que não foram eliminadas passam para a região posterior da cavidade nasal, onde entram em contacto com as regiões respiratória e olfatória. A partir destes locais, as moléculas podem ser transportadas para o cérebro por duas vias diferentes (figura 3): direta, por meio dos nervos olfatórios e trigêmeos; e indireta, passando para a corrente sanguínea e com consequente passagem através da BHE^{63,68,72,73,75}.

De modo geral, o processo de transferência de um determinado composto

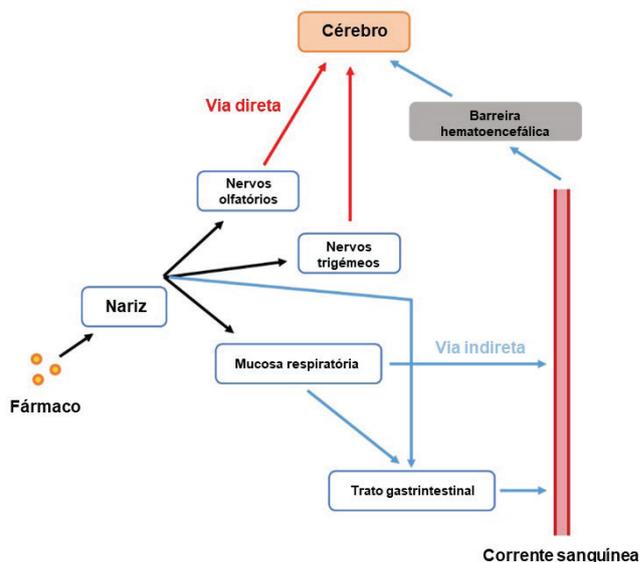


Figura 3. Esquema representativo das diferentes vias de transporte de fármacos do nariz para o cérebro. Adaptado com permissão⁷⁶.

da cavidade nasal para o cérebro precisa de um tempo de residência suficiente na cavidade nasal para facilitar a sua absorção. As vias direta e indireta diferem no local de absorção do fármaco e no tempo necessário para que esta absorção ocorra. Por isso, o predomínio de uma determinada via sobre a outra depende, sobretudo, das características moleculares do fármaco e da formulação, das condições fisiológicas do indivíduo e do dispositivo de administração nasal utilizado. Desta forma, os investigadores sugerem que o transporte dos fármacos do nariz para o cérebro pode ocorrer por uma única via ou pela combinação das duas vias. No entanto, o cálculo da quantidade exata de fármaco que alcança o cérebro por uma determinada via é difícil, sendo apenas possível comparar os resultados da concentração de fármaco que atinge o cérebro após a sua administração intranasal e intravenosa^{59,69,72,73}.

Via direta

A via direta constitui a principal via de transporte de moléculas do nariz para o cérebro. Dentro desta via, o transporte dos compostos pode ser feito através da região olfatória e através da região trigeminal (figura 4). O transporte pela via olfatória demonstra ser mais rápido (aproximadamente 0,33 horas), quando comparado com a via trigeminal (aproximadamente 1,7 horas). Em suma, este transporte inicia-se com a passagem do composto ao longo dos nervos olfatórios, que são formados a partir de um conjunto de axónios dos neurónios recetores olfatórios. De seguida, atinge o bulbo olfatório, onde é distribuído pelas diferentes regiões cerebrais. No entanto, o ambiente dinâmico criado pelos neurónios recetores olfatórios leva a que a passagem do composto por estas células seja dividida em 2 tipos de transporte: intraneuronal e extraneuronal. O transporte intraneuronal demora algumas

horas ou dias e consiste na internalização do composto pelos neurónios olfatórios através de mecanismos de endocitose ou pinocitose. Posteriormente, o composto atinge o bulbo olfatório, onde é liberado por exocitose e distribuído para as diferentes regiões cerebrais. Por outro lado, no transporte extraneuronal o composto atravessa os espaços livres entre as células olfatórias, atinge a lâmina própria e é de seguida transportado para o espaço subaracnóideo. Este processo dura até 30 minutos, parecendo ser o mais determinante para o transporte direto do fármaco do nariz para o cérebro. Ainda dentro do transporte extraneuronal, pode considerar-se que o composto atravessa a mucosa olfatória através das células de suporte (transcelular) ou juntamente (paracelular) com as células de suporte^{63,68,73}.

A via trigeminal (figura 4) inclui o transporte de compostos do nariz para o cérebro através do nervo trigêmeo, o

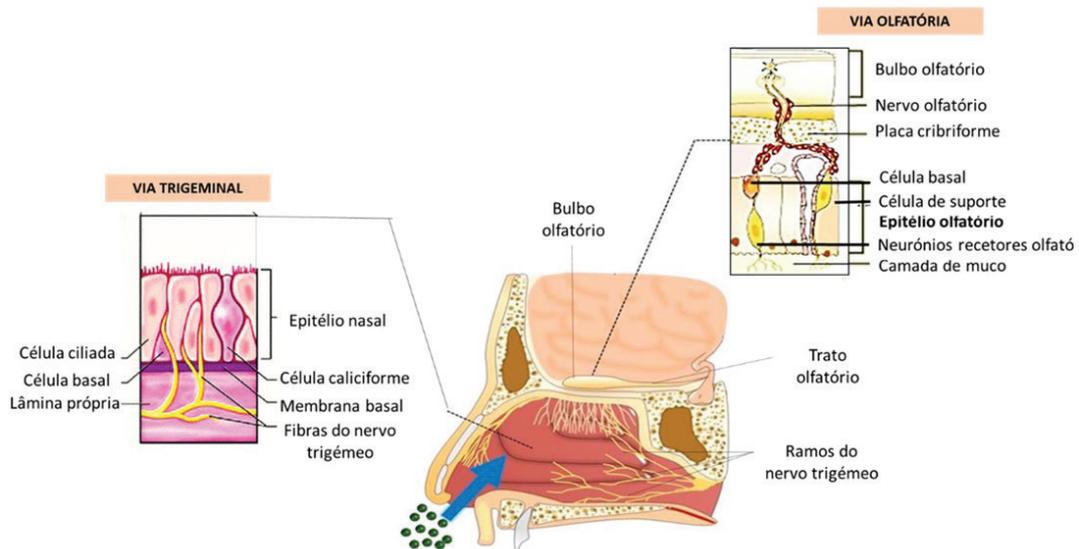


Figura 4. Esquema das principais estruturas anatómicas envolvidas no transporte direto de compostos do nariz para o cérebro. Adaptado com permissão^{59,77}.

maior nervo craniano que inerva o epitélio olfatório e respiratório e se divide em três ramos diferentes: mandibular, oftalmológico e maxilar⁶³. Os ramos maxilar e oftálmico do nervo trigêmeo são muito importantes no transporte de compostos do nariz para o cérebro, uma vez que ligam a cavidade nasal ao SNC. No entanto, o nervo trigêmeo, além de apresentar funções importantes no transporte da informação sensorial da cavidade nasal para o cérebro, permite ainda a passagem da informação sensorial entre a cavidade nasal e outros sistemas, tais como a córnea, as pálpebras e a cavidade oral⁶³. Contudo, o transporte de compostos através do nervo trigêmeo constitui uma via menos significativa e menos explorada no transporte direto do nariz para o cérebro⁷³.

Via indireta

A via indireta refere-se à passagem dos compostos para a corrente sanguínea, após a absorção através do epitélio nasal, sendo necessário atravessar a BHE para alcançar o cérebro (figura 3). Deste modo, apesar do transporte ocorrer rapidamente quando as moléculas são muito lipofílicas e têm baixo peso molecular, ou quando apresentam elevada permeabilidade através da BHE, vários estudos apontam limitações nesta via para as moléculas hidrófilas e de elevado peso molecular. Desta forma, o contributo da via indireta para o transporte direto de compostos do nariz ao cérebro é bastante limitado, dado que a maioria dos fármacos apresenta dificuldades em atravessar a BHE^{63,73}.

Existe ainda o mecanismo de contracorrente que constitui também uma via indireta alternativa do transporte de

compostos para o cérebro. Neste tipo de transporte o composto ao invés de entrar na corrente sanguínea, pode ser retido no transporte venoso nasal e transferido, posteriormente, para o SNC, através da artéria carótida que irriga o cérebro e a medula espinal^{72,73}.

Fatores que afetam a absorção nasal de compostos

Após a administração intranasal, o transporte direto de compostos do nariz para o cérebro é desafiante. Algumas das limitações desta via levantam várias questões que permanecem sem resposta, tais como: “Podemos efetivamente direcionar os fármacos do nariz para o cérebro?” e “Como sabemos qual a via seguida pelos fármacos do nariz ao cérebro? Será a via direta, a via indireta ou ambas?”⁶³.

O sucesso do transporte direto de compostos do nariz para o cérebro apresenta várias particularidades, devido a diversos fatores relacionados com as propriedades físico-químicas das moléculas, com as características fisiológicas e anatómicas da cavidade nasal e com as particularidades da formulação⁶¹.

Em relação às propriedades físico-químicas das moléculas, o peso, o carácter lipofílico/hidrofílico, o grau de ionização e a capacidade de solubilização no muco nasal são os fatores mais importantes e determinantes para a absorção na mucosa nasal e, conseqüentemente, no transporte nariz-cérebro^{61,73}. As moléculas com um peso molecular acima de 1kDa têm maior dificuldade em ser absorvidas no epitélio nasal, comparativamente às moléculas com um peso molecular abaixo dos 300 Da^{68,69,73}. No entanto, no caso das moléculas com peso molecular

entre 300 Da e 1 kDa, um dos fatores que determina a sua absorção é o seu carácter lipofílico/hidrofílico, podendo as moléculas com características lipofílicas atravessar facilmente o epitélio nasal pela via transcelular, ou seja, atravessam a bicamada lipídica das células por difusão passiva. Por outro lado, as moléculas com características hidrofílicas seguem pela via paracelular, atravessando as junções celulares^{68,72,73}. Contudo, os compostos com peso molecular menor de 300 Da atravessam facilmente a mucosa nasal e são rapidamente absorvidos, independentemente das suas características hidrofílicas/lipofílicas⁷³.

Em relação às características fisiológicas e anatómicas da cavidade nasal, o mecanismo fisiológico de depuração mucociliar é responsável por parte da ineficácia do transporte de compostos do nariz para o cérebro, uma vez que limita o seu tempo de residência na mucosa nasal pois promove a sua eliminação entre 15 a 30 minutos após a administração, ficando comprometida a absorção na cavidade nasal. No momento em que o composto é administrado na cavidade nasal, este pode depositar-se na região vestibular sendo rapidamente eliminado, uma vez que este é o local onde o mecanismo de depuração mucociliar ocorre^{61,68,73}. As propriedades físico-químicas das moléculas são também bastante determinantes no contorno deste mecanismo, uma vez que as moléculas lipofílicas têm menor probabilidade de se dissolver no muco e, desta forma, permanecem mais tempo na cavidade nasal, o que promove a sua absorção^{59,69,73}.

Outro fator inerente às características da cavidade nasal, e que compromete a administração nasal de fármacos, é a

presença de enzimas, como a epóxido hidrolase, a aldeído hidrogenase, a estearase e a glutatona-S-transferase, que promovem a degradação dos compostos. Além disso, a existência de carboxipeptidases e endopeptidases no epitélio nasal diminui a absorção de vários péptidos e proteínas, e o transporte deste tipo de moléculas para o cérebro fica comprometido^{69,73}.

Existem outros mecanismos de eliminação que interferem na absorção de compostos na cavidade nasal, tais como a expressão da glicoproteína-P⁵⁵. Esta proteína funciona como um sistema de transporte transmembranar dependente de ATP, estando presente em diferentes locais, nomeadamente na BHE e nas células olfatórias ciliadas⁵³. Vários estudos demonstraram que a glicoproteína-P restringe a captação de alguns fármacos, impedindo a sua absorção, o que pode afetar a biodisponibilidade dos fármacos administrados pela via intranasal^{53,62}.

Algumas particularidades da formulação podem afetar a absorção nasal de compostos, tais como o facto de estas serem capazes de evitar a depuração mucociliar e a degradação enzimática⁷³. Além disso, as formulações intranasais devem ter tonicidade fisiológica, viscosidade adequada e pH compatível com a mucosa nasal, devendo ser constituídas por excipientes biocompatíveis e inodoros⁶³. A viscosidade das formulações deve ser adequada de modo a não comprometer a atividade regular dos cílios e o pH deve ser semelhante ao da mucosa nasal (6,4 a 6,8), de forma a evitar irritações^{73,78}.

A osmolaridade das formulações nasais é um fator importante, dado que tanto as formulações hipertónicas como as hipotónicas interferem no movimento

normal dos cílios. Nesse sentido, as formulações nasais devem ser isotónicas, o que é conseguido através da utilização de excipientes isotonizantes, como a glicerina, o cloreto de sódio, a glucose ou a dextrose^{73,79}.

O volume de formulação que deve ser administrado deve ser um fator a considerar, uma vez que vários estudos demonstraram que este não deve ser superior a 200 μL , porque a área da mucosa nasal é pequena e não permite a administração de volumes maiores, pois seriam eliminados pelo mecanismo de depuração mucociliar^{69,73}.

Um elevado fluxo sanguíneo na cavidade nasal é fundamental para a absorção dos compostos. De forma a aumentar a absorção e o tempo de residência dos compostos na cavidade nasal, podem ser utilizados promotores de penetração e absorção, inibidores enzimáticos e agentes mucoadesivos nas formulações intranasais. Além disso, a utilização de nanossistemas baseados em lípidos demonstrou já eficácia na promoção da permeabilidade e absorção dos fármacos e a sua proteção contra a degradação enzimática^{63,73}.

Por último, é importante mencionar que a inclusão de formulações intranasais em dispositivos específicos que direcionem a formulação para a região adequada da cavidade nasal, especificamente para a região olfatória, é, também, um fator essencial na eficácia do direcionamento do nariz para o cérebro, nomeadamente devem ser privilegiados dispositivos que permitam melhorar e aumentar o tempo de residência das formulações na cavidade nasal. Existem vários dispositivos comercializados para direcionar fármacos do nariz para o cérebro, tais

como OptiMist™, ViaNasa™, Optinose®, Breath Powered™, SipNose and Precision Olfactory Delivery (POD®)⁶³.

As formulações nasais são administradas habitualmente através de gotas e de pulverizações. No caso das gotas, apesar de mais simples, a sua utilização apresenta a desvantagem da dificuldade em quantificar o fármaco presente em cada gota, podendo a sua utilização ser sinónimo de uma administração excessiva. Assim, as pulverizações nasais são utilizadas preferencialmente devido à segurança e à facilidade de administração. No entanto, as pulverizações nasais têm o inconveniente de promoverem a deposição de pequenas partículas nos pulmões e nos brônquios, pelo que a sua utilização requer que o diâmetro das gotículas libertadas pelos dispositivos de pulverização seja superior ou igual a 10 μm ⁷³.

Uso de nanopartículas lipídicas no transporte direto do nariz para o cérebro

As nanopartículas lipídicas, nomeadamente as nanopartículas de lípidos sólidos (do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e os vetores lipídicos nanoestruturados (do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC), foram propostas na década de 90 por Gasco e Müller, e têm sido extensivamente estudadas devido à sua elevada capacidade de encapsulação e proteção de compostos lipofílicos, libertação prolongada das moléculas, baixa toxicidade e facilidade de produção em grande escala. As SLN constituem a primeira geração deste tipo de nanopartículas e são formadas por uma matriz constituída por um lípido sólido, enquanto as NLC constituem a segunda geração e são formadas por uma matriz constituída pela mistura de um lípido

sólido e de um lípido líquido (em menor quantidade)^{35,56,58,61,69}.

Tem sido reportado em diversos estudos que a administração de formulações de nanopartículas lipídicas, por via intranasal, permite o transporte direto dos fármacos do nariz para o cérebro, sem necessidade de estes passarem para a corrente sanguínea e, conseqüentemente atravessarem a BHE para atingir o cérebro⁶⁹. Além das vantagens descritas, a utilização de SLN e NLC para administração intranasal de fármacos, tem ainda como benefícios^{61,73}: o aumento da adesão ao epitélio olfatório, o que promove um maior tempo de contacto e evita a rápida eliminação pelo mecanismo de depuração mucociliar; uma maior absorção através da mucosa nasal; aumento da proteção contra a degradação enzimática; e diminuição

de mecanismos de eliminação mediados pela glicoproteína-P. Em termos de segurança, é importante que as formulações de nanopartículas lipídicas não causem irritação nem danos na mucosa nasal, devendo ser utilizadas concentrações não tóxicas e adequadas de excipientes reconhecidos como seguros (do inglês *Generally Recognized As Safe*, GRAS). Por fim, deve ser assegurada a sua estabilidade durante o período de armazenamento⁶¹.

A Tabela 3 apresenta, resumidamente, as características e especificidades que as SLN e os NLC devem apresentar de forma a tornar eficaz o transporte direto de compostos do nariz para o cérebro.

Geralmente, as SLN e as NLC apresentam tamanhos médios entre 100 e 300 nm, embora possam existir tamanhos

Tabela 3. Características e especificidades que permitem às nanopartículas lipídicas (SN e NLC) promover o transporte direto de moléculas do nariz para o cérebro^{61,63,68,73,80,81}.

Nanopartículas lipídicas (SLN e NLC)	Característica gerais que permitem melhorar o transporte de moléculas	Características específicas que permitem melhorar o transporte nariz-cérebro
	<ul style="list-style-type: none"> • Dispersões coloidais de partículas sólidas com 0,1 a 30% p/p de lípido (s), estabilizadas por um ou dois agentes emulsivos cuja concentração deve variar entre 0,5% a 5% m/m; • Capacidade de encapsular fármacos pouco solúveis em água; • Facilidade de produção à escala industrial a baixo custo; • Boa estabilidade físico-química; 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamanhos entre 100 e 200 nm para permitir o transporte direto para o cérebro através dos nervos trigêmeos e olfatórios; • Melhorar a biodisponibilidade de fármacos no cérebro; • Uso de lipídios fisiológicos e excipientes GRAS, proporcionando alta biocompatibilidade com a mucosa nasal e baixa ou nenhuma toxicidade; • Aderir ao epitélio olfatório; • Prolongar o tempo de contato da formulação na mucosa nasal, evitando a rápida depuração mucociliar;

Tabela 3. Características e especificidades que permitem às nanopartículas lipídicas (SN e NLC) promover o transporte direto de moléculas do nariz para o cérebro^{61,63,68,73,80,81} (cont.).

Nanopartículas lipídicas (SLN e NLC)	Característica gerais que permitem melhorar o transporte de moléculas	Características específicas que permitem melhorar o transporte nariz-cérebro
	<ul style="list-style-type: none"> • Boa estabilidade físico-química; • Aumento da biodisponibilidade dos fármacos; • Capacidade de direcionamento dos fármacos para os locais alvo da ação; • Proteção dos fármacos; • Libertação prolongada do fármaco; • Uso de excipientes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS); • Baixa ou nenhuma toxicidade das formulações. 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteção de fármacos contra degradação enzimática nasal; • Libertação prolongada dos fármacos.

inferiores a 100 nm ou entre 300 e 1000 nm. Estas formulações são constituídas por 0,1 a 30% de matriz lipídica que é estabilizada com 0,5 a 5% de agente(s) emulsivo(s)^{69,82-85}.

No desenvolvimento de formulações de SLN e NLC é importante fazer uma seleção adequada de lípidos e de agentes emulsivos, uma vez que estes afetam as suas características de tamanho, índice de polidispersão (do inglês *Polydispersity Index*, PDI), carga à superfície, eficácia de encapsulação, estabilidade durante o armazenamento e o perfil de libertação dos compostos encapsulados⁸⁵. Como exemplos de lípidos sólidos usados, temos: os ésteres de ácidos gordos, como o monoestearato de glicerilo, o behenato de glicerol e o palmitoestearato de

glicerol; as ceras, como o palmitato de cetilo; os ácidos gordos, como o ácido esteárico e o ácido palmítico; e os triglicerídeos como a triestearina, a trimiristina, a tripalmitina e a trilaurina. Os lípidos líquidos mais utilizados são o oleato de decilo, os óleos de amêndoa, milho e amendoim, o Mygliol® 812 e o ácido oleico. Geralmente, este tipo de formulações contém dois tipos de agentes emulsivos, tais como o polissorbato 80, os poloxâmeros 188 e 407, o tyloxapol, sais biliares e fosfolípidos, como a lecitina de ovo e a fosfatidilcolina^{69,85}. As formulações de nanopartículas lipídicas apresentam algumas limitações, tais como: capacidade limitada de transportar moléculas hidrófilas; instabilidade *in vivo*; baixa estabilidade durante

o armazenamento devido às transições polimórficas dos lípidos, que originam a libertação das moléculas encapsuladas, agregação das nanopartículas e separação de fases⁶³. Estas limitações têm contribuído para a falta de aprovação das formulações de SLN e NLC para uso clínico. Nesse sentido, têm sido investigadas estratégias para ultrapassar estes obstáculos e permitir avançar com estudos mais complexos. Por exemplo, de forma a evitar a agregação das nanopartículas durante o armazenamento, podem usar-se agentes emulsivos aniónicos ou catiónicos que aumentem o potencial zeta (do inglês *Zeta Potential*, ZP) e promovam a repulsão eletrostática das nanopartículas. O revestimento de nanopartículas com polietilenoglicol (PEG) prolonga o tempo de circulação destes nanossistemas na corrente sanguínea, permitindo que o fármaco atinja o local de ação antes de serem eliminados pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário⁵⁹.

A avaliação da toxicidade das formulações de SLN e NLC é também muito importante, bem como a análise do perfil de libertação dos compostos encapsulados para prever o seu desempenho *in vivo*⁶³. Muitas formulações de nanopartículas lipídicas descritas em artigos científicos não demonstraram ser tóxicas para as células. No entanto, a biocompatibilidade entre as células humanas e estes nanossistemas deve ser

sempre avaliada devido à composição variável das formulações. Desta forma, deve proceder-se à avaliação da citotoxicidade das SLN e NLC produzidas, primeiramente, *in vitro*, sendo também importante, posteriormente, realizar testes *ex vivo* e *in vivo*^{86,87}. Diferentes métodos *in vitro* em culturas celulares têm sido usados para analisar a citotoxicidade destes nanossistemas, tais como o ensaio da redução do (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e o ensaio da incorporação do vermelho neutro (do inglês *Neutral Red*, NR), que fornecem informações sobre a citotoxicidade e refletem a capacidade de alguns compostos provocarem morte celular como consequência de danos ou alterações nas funções celulares básicas⁸⁶.

Vários estudos da administração intranasal de fármacos e de compostos naturais bioativos encapsulados em SLN e NLC, para o tratamento de doenças neurodegenerativas, têm demonstrado efeitos relevantes que estão relacionados, sobretudo, com o aumento da quantidade de composto que chega ao cérebro, o que leva a uma redução da dose e frequência de administração, e diminuição dos efeitos adversos⁶³.

A Tabela 4 resume os resultados mais relevantes desses estudos.

Bhatt *et al.* encapsularam astaxantina em SLN com o objetivo de promover uma entrega direta do composto ao cérebro,

Tabela 4. Exemplos de estudos com fármacos e compostos naturais bioativos encapsulados em SLN ou NLC, sugeridos para o tratamento de doenças neurodegenerativas pela via intranasal^{70,88-93}.

Tipo de nanopartícula lipídica	Fármaco ou composto bioativo natural	Resultados relevantes
SLN	Astaxantina	<p><i>In vivo</i>, os estudos de biodistribuição demonstraram uma maior acumulação de astaxantina-SLN no cérebro, quando administrada por via intranasal ($1,70 \pm 0,13$ dose/grama de cérebro), em comparação com a administração via intravenosa ($0,844 \pm 0,12$ dose/grama de cérebro).</p> <p>A formulação demonstrou propriedades antioxidantes ao controlar danos causados pelo peróxido de hidrogénio, observando-se uma redução dos níveis de peroxidação lipídica.</p>
SLN	Dopamina e compostos polifenólicos presentes num extrato de semente de uva	<p><i>In vitro</i>, as formulações de SLN com dopamina e extrato derivado de semente de uva, SLN com dopamina e SLN com extrato derivado de semente de uva não demonstram citotoxicidade em células olfatórias e em células do neuroblastoma SH-SY5Y, numa gama de concentrações de 18-75 μM e 4-34,5 μM de dopamina e de extrato derivado de semente de uva, respetivamente.</p>
SLN e NLC	Quercetina	<p><i>In vitro</i>, as formulações de NLC e SLN com quercetina confirmaram a ausência de citotoxicidade em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas imortalizadas (hCMEC/D3).</p> <p>Um modelo <i>in vitro</i> com o peptídeo β-amilóide demonstrou que a formulação de NLC com quercetina foi capaz de diminuir a formação de emaranhados neurofibrilares e a agregação de peptídeos, quando comparado com uma amostra controlo.</p>
SLN e NLC	Curcumina	<p><i>In vitro</i>, as formulações de NLC e SLN com curcumina não demonstram citotoxicidade em células de fibroblastos fetais de ratos numa gama de concentração de 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observando-se uma elevada viabilidade celular (80%).</p> <p><i>In vivo</i>, foi possível observar que a formulação de NLC foi capaz de aumentar a absorção de curcumina no cérebro 4 vezes superior à da formulação de SLN.</p>

Tabela 4. Exemplos de estudos com fármacos e compostos naturais bioativos encapsulados em SLN ou NLC, sugeridos para o tratamento de doenças neurodegenerativas pela via intranasal^{70,88-93} (cont.).

NLC	Resveratrol	<p><i>In vitro</i>, os estudos de citotoxicidade nasal demonstraram que o tecido nasal exposto ao hidrogel <i>in situ</i> de NLC com resveratrol não deu origem a toxicidade na camada epitelial, membrana basal ou núcleos de células glandulares.</p> <p><i>In vivo</i>, os estudos farmacocinéticos demonstram que se obteve uma maior concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) de fármaco no cérebro (1030 ± 135 ng/mL) após a administração da formulação desenvolvida por via intranasal, em comparação com a administração da suspensão de resveratrol por via oral (402 ± 41 ng/mL). No plasma, a $C_{\text{máx}}$ foi mais baixa para a formulação intranasal, em comparação com a concentração cerebral.</p> <p>O tempo necessário para atingir a $C_{\text{máx}}$ ($t_{\text{máx}}$) para a formulação intranasal foi de 30 min, enquanto para a formulação oral foi de 2 h, indicando um transporte de resveratrol mais rápido para o cérebro, quando este é administrado por via intranasal.</p> <p>Os estudos de biodistribuição do fármaco demonstraram uma maior concentração do hidrogel <i>in situ</i> de NLC com resveratrol, no cérebro, seguida do baço, pulmões, rim, coração e fígado. No entanto, a suspensão de resveratrol apresentava uma maior concentração no fígado, seguida dos pulmões, baço, cérebro, coração e rim, o que pode ser atribuído ao metabolismo hepático do fármaco.</p>
NLC	Pioglitazona	<p><i>In vitro</i>, a viabilidade celular foi semelhante para ambas as formulações desenvolvidas, nomeadamente 69,15% para a formulação de NLC com pioglitazona e 66,89% para a solução do mesmo fármaco na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. A avaliação da citotoxicidade, utilizando células de neuroblastoma SH-SY5Y, indicou que a formulação de NLC com pioglitazona era segura para as células neuronais.</p> <p>Estudos <i>ex vivo</i>, demonstraram uma maior permeabilidade nasal da formulação de NLC com pioglitazona quando comparada com a solução de pioglitazona.</p> <p><i>In vivo</i>, os estudos de biodistribuição demonstraram o transporte direto do fármaco do nariz para o cérebro quando este se encontrava encapsulado em NLC.</p>

Tabela 4. Exemplos de estudos com fármacos e compostos naturais bioativos encapsulados em SLN ou NLC, sugeridos para o tratamento de doenças neurodegenerativas pela via intranasal^{170,88-93} (cont.).

NLC	Tracrina	<i>In vitro</i> , a avaliação da citotoxicidade em células do neuroblastoma humano SH-SY5Y confirmou que, para a mesma concentração, a formulação de NLC com tracrina não apresentava toxicidade para as células, enquanto a formulação de NLC com tracrina conjugados com um peptídeo anfipático provocou uma diminuição da viabilidade celular. A utilização de uma concentração até 10 μM de tracrina foi considerada segura.
-----	----------	---

após administração intranasal. A formulação de SLN otimizada apresentava um tamanho médio de 213,23 nm e um PDI de 0,367. Os resultados dos ensaios *in vitro*, em células de feocromocitoma-12 (PC12), demonstraram o potencial antioxidante da astaxantina encapsulada em SLN contra o stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio. Estas nanopartículas foram posteriormente submetidas a estudos de biodistribuição *in vivo*, onde foram administradas pelas vias intranasal e intravenosa. Os resultados demonstraram que a acumulação de astaxantina-SLN no cérebro, após administração intranasal, foi de $1,70 \pm 0,13$ (dose/grama de cérebro) e de $0,844 \pm 0,12$ (dose/grama de cérebro), após administração intravenosa, e por isso, os dados de biodistribuição demonstraram que foi conseguida a passagem direta da astaxantina do nariz para o cérebro. A formulação também demonstrou propriedades antioxidantes ao controlar os danos causados pelo peróxido de hidrogénio, observando-se uma redução dos níveis de peroxidação lipídica. A partir destes resultados, os investigadores propuseram a utilização da formulação de astaxantina encapsulada em SLN para o direcionamento

do composto para o cérebro, onde pode exercer uma função de proteção contra o stress oxidativo e, conseqüentemente, beneficiar a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas⁸⁸.

Trapani *et al.* avaliaram a coadministração de agentes antioxidantes (compostos polifenóis presentes num extrato derivado da semente de uva) e dopamina, encapsulados em SLN e administrados por via intranasal, como uma abordagem inovadora no tratamento da DP. A caracterização destas nanopartículas demonstrou que estas apresentavam um diâmetro de partícula próximo de 200 nm, sendo este valor considerado adequado para a entrega direta nariz-cérebro. Nos estudos *in vitro* realizados, foi avaliada a citotoxicidade em células do neuroblastoma SH-SY5Y e células olfativas, das SLN que continham dopamina e um antioxidante presente no extrato derivado da semente de uva, e para possível comparação, de SLN apenas com dopamina e de SLN apenas com extrato derivado da semente de uva em células. Os resultados demonstraram que nenhuma das formulações apresentou citotoxicidade para ambos os tipos de células na gama de concentrações de 18 – 75 μM e 4 – 34,5 μM de dopamina e extrato

derivado de semente de uva, respectivamente, e portanto, os investigadores concluíram que as formulações testadas podem ser consideradas eficazes no tratamento da DP⁸⁹.

Pinheiro *et al.* realizaram um estudo com quercetina, um flavonoide com atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena que demonstra capacidade de reduzir a oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, morte celular neuronal e inibir a agregação da proteína β -amilóide, e que por isso, poderá ser útil no tratamento da DA. Neste estudo, o composto foi encapsulado em SLN e NLC sendo que estes foram funcionalizados com transferrina de forma a promover a passagem destes nanossistemas pela BHE, e aumentar a biodisponibilidade da quercetina no cérebro. Em termos de caracterização, tanto as SLN como os NLC apresentaram tamanhos inferiores a 250 nm, valores de ZP de -30 mV e valores de EE entre 80-90%. *In vitro*, foram realizados ensaios de citotoxicidade em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas imortalizadas (hCMEC/D3) que confirmaram a ausência de toxicidade de SLN e NLC. Um modelo *in vitro* com o peptídeo β -amilóide demonstrou que a formulação de NLC com quercetina foi capaz de diminuir a formação de emaranhados neurofibrilares e a agregação de peptídeos quando comparado com uma amostra controlo. No entanto, estes resultados devem ser confirmados *in vivo*⁹⁰.

Malvajerd *et al.* desenvolveram SLN e NLC contendo curcumina de forma a estudar o potencial que podem apresentar no tratamento da DA. Na caracterização dos dois tipos de nanopartículas

lipídicas, os resultados obtidos demonstraram um tamanho de partícula e PDI para a formulação de SLN de $204,76 \pm 0,36$ nm e $0,194 \pm 0,04$, e para a formulação de NLC de $117,36 \pm 1,36$ nm e $0,188 \pm 0,020$. Nos estudos *in vitro* realizados, os investigadores avaliaram a citotoxicidade de ambas as formulações em células de fibroblastos fetais de ratos, sendo que os resultados demonstraram uma elevada viabilidade celular (80%) para as formulações de SLN e NLC até concentrações de $10 \mu\text{g/mL}$, já que para concentrações mais elevadas, se observou uma ligeira diminuição na viabilidade celular. Não obstante, foi possível concluir que nenhuma citotoxicidade notável foi observada para ambas as formulações testadas de nanopartículas lipídicas contendo curcumina. Para além disso, através da realização de estudos *in vivo*, foi possível observar que a formulação de NLC foi capaz de aumentar a absorção de curcumina no cérebro 4 vezes mais em comparação com a formulação de SLN, e que por este motivo, esta formulação poderá apresentar potencial na terapêutica da DA⁹¹.

Rajput *et al.* estudaram o potencial da utilização de NLC para a administração intranasal de resveratrol no tratamento da DA, dado que este composto apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras. Neste estudo, o complexo resveratrol-NLC foi incorporado num hidrogel *in situ*. A formulação final tinha um tamanho de partícula, PDI, ZP e EE de 132 ± 12 nm, $0,165 \pm 0,002$, -23 ± 4 mV e $74 \pm 6\%$, respetivamente. *In vitro*, os estudos de ciliotoxicidade nasal demonstraram que o tecido nasal exposto ao hidrogel *in situ* de NLC carregado com res-

veratrol não deu origem a toxicidade na camada epitelial, membrana basal ou núcleos de células glandulares. *In vivo*, os estudos farmacocinéticos foram realizados em ratos, sendo que lhes foi administrada a formulação desenvolvida, por via intranasal, e ainda lhes foi administrada uma suspensão de resveratrol por via oral para possível comparação, sendo que se obteve uma concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) de fármaco no cérebro de 1030 ± 135 e 402 ± 41 ng/mL, respetivamente. No plasma, a $C_{máx}$ foi mais baixa para a formulação intranasal (167 ± 20 ng/mL), em comparação com a concentração cerebral. O $t_{máx}$ (tempo necessário para o fármaco atingir a $C_{máx}$) para a formulação intranasal foi de 30 min, enquanto para a formulação oral foi de 2h, indicando um transporte de resveratrol mais rápido para o cérebro, quando este é administrado por via intranasal. Os estudos de biodistribuição do fármaco demonstraram uma maior concentração do hidrogel *in situ* de NLC contendo resveratrol, no cérebro, seguida do baço, pulmões, rim, coração e fígado. No entanto, a suspensão de resveratrol apresentou uma maior concentração no fígado, seguida dos pulmões, baço, cérebro, coração e rim, o que pode ser atribuído ao metabolismo hepático do fármaco. Desta forma, os resultados deste estudo evidenciam o potencial de utilização do hidrogel *in situ* de resveratrol-NLC no direcionamento do composto para o cérebro, promovendo o tratamento da DA⁷⁰.

Jojo *et al.* otimizaram uma formulação de NLC com pioglitazona para entrega direta do nariz para o cérebro e com potencial para ser, também, utilizada no tratamento da DA, já que em mode-

los pré-clínicos este fármaco melhorou significativamente os sintomas que os portadores desta doença apresentavam. Após a otimização da formulação, os valores de tamanho de partícula, PDI, ZP e EE foram $211,4 \pm 3,54$ nm, $0,257 \pm 0,108$, $14,9 \pm 1,09$ mV e $70,18 \pm 4,5\%$, respetivamente. Posteriormente, através do estudo *in vitro* avaliou-se a citotoxicidade nasal, em células de neuroblastoma SH-SY5Y, da formulação de NLC com pioglitazona e de uma solução do mesmo fármaco, e os resultados demonstraram que a viabilidade celular foi semelhante para ambas as formulações, nomeadamente, 69,15% para a formulação de NLC com pioglitazona e 66,89% para a solução de pioglitazona na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, e que por isso a formulação de NLC demonstrou ser segura para administração nasal. Os estudos *ex vivo* demonstraram uma maior permeabilidade nasal da formulação de NLC otimizada com pioglitazona quando comparada com a solução de pioglitazona. Ainda relevante, os estudos de biodistribuição *in vivo*, realizado em ratos, demonstraram um transporte direto do fármaco do nariz para o cérebro quando este se encontrava encapsulado em NLC, e por isso, também esta investigação demonstrou o potencial que a encapsulação de um fármaco em NLC, e administrado por via intranasal, poderá ter no tratamento da DA⁹².

Silva *et al.* desenvolveram uma formulação de NLC com tracrina conjugado com um peptídeo anfipático de forma a diminuir as limitações deste fármaco, já que, apesar de ser o primeiro medicamento aprovado pela FDA para o tratamento da DA, a sua utilização a longo prazo resulta em efeitos colaterais inde-

sejados, como náuseas, vômitos e hepatotoxicidade. Após o desenvolvimento desta formulação, foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* dos NLC com tracrina e de NLC com tracrina conjugados com o peptídeo anfipático, para possível comparação, sendo esta avaliação feita em células do neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os resultados demonstraram que o fármaco encapsulado em NLC apresentava baixa toxicidade, sugerindo que este poderia ser um sistema transportador promissor na entrega do fármaco. No entanto, o sistema conjugado com o peptídeo anfipático demonstrou toxicidade nas células SH-SY5Y. Não obstante, os resultados concluíram que os NLC com tracrina são seguros para as células neuronais, e por isso, esta formulação poderá ser promissora no tratamento da DA. No entanto, mais estudos, incluindo estudos *in vivo*, terão de ser realizados para comprovar a sua eficácia⁹³.

CONCLUSÃO

A utilização de bio-resíduos marinhos com propriedades antioxidantes promove uma maior sustentabilidade e consciência sobre a importância da recuperação e valorização dos resíduos resultantes do processamento dos organismos marinhos, o que se integra no contexto da economia circular.

A administração intranasal de nanopartículas lipídicas, nomeadamente as SLN e os NLC, contendo compostos antioxidantes obtidos de bio-resíduos marinhos promove a prevenção e o tratamento das doenças neurodegenerativas, uma vez que estes compostos são transportados diretamente do nariz para o cérebro, sem ter de atravessar a BHE. Vários estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* têm demonstrado

resultados promissores, embora sejam necessárias mais investigações para que, mais tarde, seja possível avançar com os ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maschmeyer T, Luque R, Selva M. Upgrading of marine (fish and crustaceans) biowaste for high added-value molecules and bio(nano)-materials. *Chem Soc Rev.* 2020.
2. Shavandi A, Hou Y, Carne A, McConnell M, Bekhit AEA. Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. *Adv Food Nutr Res.* 2019;87:187-254.
3. Harnedy PA, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods.* 2012;4(1):6-24.
4. Ben-Othman S, Jõudu I, Bhat R. Bioactives From Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules.* 2020;25(3).
5. Genc Y, Bardakci H, Yucel C, Karatoprak GS, Kupeli Akkol E, Hakan Barak T, et al. Oxidative Stress and Marine Carotenoids: Application by Using Nanoformulations. *Mar Drugs.* 2020;18(8).
6. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2019;24(8).
7. Rehman A, Tong Q, Jafari SM, Assadpour E, Shehzad Q, Aadil RM, et al. Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;275:102048.
8. Rostamabadi H, Falsafi SR, Jafari SM. Nanoencapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. *J Control Re-*

lease. 2019;298:38-67.

9. Hamidi M, Kozani PS, Kozani PS, Pierre G, Michaud P, Delattre C. Marine Bacteria versus Microalgae: Who Is the Best for Biotechnological Production of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties and Other Biological Applications? *Mar Drugs*. 2019;18(1).

10. Zhong Q, Wei B, Wang S, Ke S, Chen J, Zhang H, *et al.* The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Mar Drugs*. 2019;17(12).

11. Catanesi M, Caioni G, Castelli V, Benedetti E, d'Angelo M, Cimini A. Benefits under the Sea: The Role of Marine Compounds in Neurodegenerative Disorders. *Mar Drugs*. 2021;19(1).

12. Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, *et al.* On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives? *Mar Drugs*. 2018;16(8).

13. Sztretye M, Dienes B, Gonczi M, Czirjak T, Csernoch L, Dux L, *et al.* Astaxanthin: A Potential Mitochondrial-Targeted Antioxidant Treatment in Diseases and with Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3849692.

14. Barros MP, Poppe SC, Bondan EF. Neuroprotective properties of the marine carotenoid astaxanthin and omega-3 fatty acids, and perspectives for the natural combination of both in krill oil. *Nutrients*. 2014;6(3):1293-317.

15. Mullan K, Williams MA, Cardwell CR, McGuinness B, Passmore P, Silvestri G, *et al.* Serum concentrations of vitamin E and carotenoids are altered in Alzheimer's disease: A case-control study. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2017;3(3):432-9.

16. Hughes KC, Gao X, Kim IY, Rimm

EB, Wang M, Weisskopf MG, *et al.* Intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2016;31(12):1909-14.

17. Cho KS, Shin M, Kim S, Lee SB. Recent Advances in Studies on the Therapeutic Potential of Dietary Carotenoids in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:4120458.

18. Suarez-Jimenez GM, Burgos-Hernandez A, Ezquerro-Brauer JM. Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Mar Drugs*. 2012;10(5):963-86.

19. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol*. 2018;17(1):20-6.

20. Muthu M, Gopal J, Chun S, Devadoss AJP, Hasan N, Sivanesan I. Crustacean Waste-Derived Chitosan: Antioxidant Properties and Future Perspective. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2).

21. Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirov T, Gu W, *et al.* Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Mar Drugs*. 2010;8(7):1962-87.

22. Hao C, Wang W, Wang S, Zhang L, Guo Y. An Overview of the Protective Effects of Chitosan and Acetylated Chitosan Oligosaccharides against Neuronal Disorders. *Mar Drugs*. 2017;15(4).

23. Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res*. 2005;49:93-135.

24. Xu C, Nasrollahzadeh M, Selva M, Issaabadi Z, Luque R. Waste-to-wealth: biowaste valorization into valuable bio(nano)materials. *Chem Soc Rev*.

2019;48(18):4791-822.

25. Kim TK, Hewavitharana AK, Shaw PN, Fuerst JA. Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):2118-25.

26. Kabir MT, Uddin MS, Jeandet P, Emran TB, Mitra S, Albadrani GM, *et al*. Anti-Alzheimer's Molecules Derived from Marine Life: Understanding Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Mar Drugs*. 2021;19(5).

27. Kilic U, Kilic E, Lingor P, Yulug B, Bähr M. Rifampicin inhibits neurodegeneration in the optic nerve transection model *in vivo* and after 1-methyl-4-phenylpyridinium intoxication *in vitro*. *Acta Neuropathol*. 2004;108(1):65-8.

28. Leirós M, Alonso E, Rateb ME, Ebel R, Jaspars M, Alfonso A, *et al*. The Streptomyces metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer's disease *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience*. 2015;305:26-35.

29. Leirós M, Alonso E, Sanchez JA, Rateb ME, Ebel R, Houssen WE, *et al*. Mitigation of ROS insults by Streptomyces secondary metabolites in primary cortical neurons. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(1):71-80.

30. Alvariño R, Alonso E, Abbasov ME, Chaheine CM, Conner ML, Romo D, *et al*. Gracilin A Derivatives Target Early Events in Alzheimer's Disease: *in Vitro* Effects on Neuroinflammation and Oxidative Stress. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(9):4102-11.

31. Gegunde S, Alfonso A, Alonso E, Alvariño R, Botana LM. Gracilin-Derivatives as Lead Compounds for Anti-inflammatory Effects. *Cell Mol Neurobiol*.

2020;40(4):603-15.

32. Leirós M, Sánchez JA, Alonso E, Rateb ME, Houssen WE, Ebel R, *et al*. Spongionella secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress. *Mar Drugs*. 2014;12(2):700-18.

33. Abbasov ME, Alvariño R, Chaheine CM, Alonso E, Sánchez JA, Conner ML, *et al*. Simplified immunosuppressive and neuroprotective agents based on gracilin A. *Nat Chem*. 2019;11(4):342-50.

34. Rodriguez-Ruiz V, Salatti-Dorado JA, Barzegari A, Nicolas-Boluda A, Houaoui A, Caballo C, *et al*. Astaxanthin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Preservation of Antioxidant Activity. *Molecules*. 2018;23(10).

35. Santonocito D, Raciti G, Campisi A, Sposito G, Panico A, Siciliano EA, *et al*. Astaxanthin-Loaded Stealth Lipid Nanoparticles (AST-SSLN) as Potential Carriers for the Treatment of Alzheimer's Disease: Formulation Development and Optimization. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(2).

36. Li M, Zahi MR, Yuan Q, Tian F, Liang H. Preparation and stability of astaxanthin solid lipid nanoparticles based on stearic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2016;118(4):592-602.

37. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. EDTA and α -tocopherol improve the chemical stability of astaxanthin loaded into nanostructured lipid carriers. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014;116(8):968-77.

38. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. *Innovative Food*

- Science & Emerging Technologies. 2014;26:366-74.
39. Fakhri S, Aneva IY, Farzaei MH, Sobarzo-Sanchez E. The Neuroprotective Effects of Astaxanthin: Therapeutic Targets and Clinical Perspective. *Molecules*. 2019;24(14).
40. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. 2017;174(11):1290-324.
41. Jo C, Khan FF, Khan MI, Iqbal J. Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions. *Food Reviews International*. 2016;33(1):44-61.
42. Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:2525967.
43. Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, Garrison DE, Meade JR, Peace TI, *et al*. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
44. Rekatsina M, Paladini A, Piroli A, Zis P, Pergolizzi JV, Varrassi G. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020;37(1):113-39.
45. Rahman MH, Bajgai J, Fadriquel A, Sharma S, Trinh TT, Akter R, *et al*. Therapeutic Potential of Natural Products in Treating Neurodegenerative Disorders and Their Future Prospects and Challenges. *Molecules*. 2021;26(17).
46. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, *et al*. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(6):4094-125.
47. Barbosa M, Valentao P, Andrade PB. Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases. *Mar Drugs*. 2014;12(9):4934-72.
48. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, *et al*. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*. 2015;74:101-10.
49. Muntimadugu E, Dhommatti R, Jain A, Challa VG, Shaheen M, Khan W. Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci*. 2016;92:224-34.
50. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 2017;39(1):73-82.
51. Kung HC, Lin KJ, Kung CT, Lin TK. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol in Parkinson's Disease. *Biomedicines*. 2021;9(8).
52. Jiang T, Sun Q, Chen S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2016;147:1-19.
53. Bonferoni MC, Rassa G, Gavini E, Sorrenti M, Catenacci L, Giunchedi P. Nose-to-Brain Delivery of Antioxidants as a Potential Tool for the Therapy of Neurological Diseases. *Pharmaceutics*. 2020;12(12).
54. Raamsdonk JMV, Vega IE, Brundin

P. Oxidative stress in neurodegenerative disease: causation or association? 2017.

55. Yang L, Youngblood H, Wu C, Zhang Q. Mitochondria as a target for neuroprotection: role of methylene blue and photobiomodulation. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):19.

56. Md S, Bhattmisra SK, Zeeshan F, Shahzad N, Mujtaba MA, Srikanth Meka V, et al. Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2018;43:295-310.

57. Ashok A, Andrabi SS, Mansoor S, Kuang Y, Kwon BK, Labhasetwar V. Antioxidant Therapy in Oxidative Stress-Induced Neurodegenerative Diseases: Role of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems in Clinical Translation. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(2).

58. Singh K, Ahmad Z, Shakya P, Kumar A, Arif M. Nano formulation: A novel approach for nose to brain drug delivery. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 2016.

59. Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;128:337-62.

60. Alexander A, Saraf S. Nose-to-brain drug delivery approach: A key to easily accessing the brain for the treatment of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 2018;13(12):2102-4.

61. Khan AR, Liu M, Khan MW, Zhai G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *J Control Release.* 2017;268:364-89.

62. Fernandes F, Dias-Teixeira M, Deleue-Matos C, Grosso C. Critical Review

of Lipid-Based Nanoparticles as Carriers of Neuroprotective Drugs and Extracts. *Nanomaterials (Basel).* 2021;11(3).

63. Costa CP, Moreira JN, Sousa Lobo JM, Silva AC. Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of *in vivo* studies. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(4):925-40.

64. Vishesh Singh, Arun Singh Lalotra, Shelly Agrawal, Mishrai G. Nose-to-Brain drug delivery via nanocarriers for the management of neurodegenerative disorders: recent advances and future. 2021.

65. Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed Pharmacother.* 2018;103:598-613.

66. Beloqui A, Solinis MA, Rodriguez-Gascon A, Almeida AJ, Preat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine.* 2016;12(1):143-61.

67. Devkar TB, Tekade AR, Khandelwal KR. Surface engineered nanostructured lipid carriers for efficient nose to brain delivery of ondansetron HCl using Delonix regia gum as a natural mucoadhesive polymer. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;122:143-50.

68. Cunha S, Almeida H, Amaral MH, Lobo JMS, Silva AC. Intranasal lipid nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 2017.

69. Cunha S, Amaral MH, Lobo JMS, Silva AC. Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery. 2017.

70. Rajput AP, Butani SB. Resveratrol anchored nanostructured lipid carrier loaded *in situ* gel via nasal route: Formu-

- lation, optimization and *in vivo* characterization. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2019;51:214-23.
71. Erdo F, Bors LA, Farkas D, Bajza A, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. Brain Res Bull. 2018;143:155-70.
72. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, *et al.* Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. J Control Release. 2018;281:139-77.
73. Costa C, Moreira JN, Amaral MH, Sousa Lobo JM, Silva AC. Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. J Control Release. 2019;295:187-200.
74. Costa CP, Barreiro S, Moreira JN, Silva R, Almeida H, Sousa Lobo JM, *et al.* *In Vitro* Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN). Pharmaceuticals (Basel). 2021;14(8).
75. Wang Z, Xiong G, Tsang WC, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Nose-to-Brain Delivery. J Pharmacol Exp Ther. 2019;370(3):593-601.
76. Nguyen T-T-L, Maeng H-J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intranasal Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Nose-to-Brain Delivery. Pharmaceutics. 2022;14(3):572.
77. Chen TC, da Fonseca CO, Schonthal AH. Intranasal Perillyl Alcohol for Glioma Therapy: Molecular Mechanisms and Clinical Development. Int J Mol Sci. 2018;19(12).
78. Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E, Faisy C, Blouquit-Laye S, Couderc LJ, *et al.* Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. Pharmacol Ther. 2012;134(3):366-79.
79. Djupesland PG, Mahmoud RA, Messina JC. Accessing the brain: the nose may know the way. J Cereb Blood Flow Metab. 2013;33(5):793-4.
80. Sharma N, Bhandari S, Deshmukh R, Yadav AK, Mishra N. Development and characterization of embelin-loaded nanolipid carriers for brain targeting. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017;45(3):409-13.
81. Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. Front Mol Biosci. 2020;7:587997.
82. Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, De Bonis P, *et al.* Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2018;15(4):369-78.
83. Borges A, Freitas V, Mateus N, Fernandes I, Oliveira J. Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. Antioxidants (Basel). 2020;9(10).
84. Yasir M, Sara UVS, Chauhan I, Gaur PK, Singh AP, Puri D, *et al.* Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of donepezil: formulation, optimization by Box-Behnken design, *in vitro* and *in vivo* evaluation. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2017:1-14.
85. Tapeinos C, Battaglini M, Ciofani G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. J Control Release. 2017;264:306-32.

86. Labouta HI, Sarsons C, Kennard J, Gomez-Garcia MJ, Villar K, Lee H, *et al*. Understanding and improving assays for cytotoxicity of nanoparticles: what really matters? *RSC Adv*. 2018;8(41):23027-39.
87. Silva AH, Filippin-Monteiro FB, Mattei B, Zanetti-Ramos BG, Creczynski-Pasa TB. *In vitro* biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2012;432:382-8.
88. Chandra Bhatt P, Srivastava P, Pandey P, Khan W, Panda BP. Nose to brain delivery of astaxanthin-loaded solid lipid nanoparticles: fabrication, radio labeling, optimization and biological studies. *RSC Advances*. 2016;6(12):10001-10.
89. Trapani A, Guerra L, Corbo F, Castellani S, Sanna E, Capobianco L, *et al*. Cyto/Biocompatibility of Dopamine Combined with the Antioxidant Grape Seed-Derived Polyphenol Compounds in Solid Lipid Nanoparticles. *Molecules*. 2021;26(4).
90. Pinheiro RGR, Granja A, Loureiro JA, Pereira MC, Pinheiro M, Neves AR, *et al*. Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci*. 2020;148:105314.
91. Sadegh Malvajerd S, Azadi A, Izadi Z, Kurd M, Dara T, Dibaei M, *et al*. Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(1):728-39.
92. Jojo GM, Kuppusamy G, De A, Karri V. Formulation and optimization of intranasal nanolipid carriers of pioglitazone for the repurposing in Alzheimer's disease using Box-Behnken design. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019;45(7):1061-72.
93. Silva S, Marto J, Goncalves L, Almeida AJ, Vale N. Formulation, Characterization and Evaluation against SH-SY5Y Cells of New Tacrine and Tacrine-MAP Loaded with Lipid Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(10).