

Formulações de nanopartículas lipídicas via *nose-to-brain* para o tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson

Lipid nanoparticle formulations via nose-to-brain for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases

Soage J.¹, Loureiro J.A.^{2,3}, Silva A.C.^{1,4,5*}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

As doenças de Alzheimer e de Parkinson estão atualmente identificadas como sendo as doenças neurodegenerativas mais prevalentes, constituindo um problema de saúde pública. A terapêutica farmacológica para o tratamento destas doenças é limitada pela baixa biodisponibilidade dos fármacos no sistema nervoso central. Nos últimos anos, tem sido referido que a administração intranasal de formulações por via direta nariz-cérebro (*nose-to-brain*) apresenta vantagens farmacocinéticas e farmacodinâmicas que permitem melhorar a ação dos fármacos, uma vez que as moléculas não têm de atravessar a barreira hematoencefálica para chegar ao sistema nervoso central. Neste contexto, o desenvolvimento de formulações intranasais à base de nanopartículas lipídicas, em particular de nanopartículas de lípidos sólidos e de vetores lipídicos nanoestruturados, constitui uma alternativa promissora. O aumento do potencial terapêutico dos fármacos encapsulados nestas nanopartículas já foi observado em vários estudos *in vivo*, o que sugere a viabilidade da sua utilização nos tratamentos das doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Não obstante, até à data, não são comercializados medicamentos à base de nanopartículas lipídicas para o tratamento destas doenças, pelo que são necessárias mais investigações que incluam ensaios clínicos, para que seja possível a sua aplicação na prática clínica.

Palavras-chave: nanopartículas lipídicas, doença de alzheimer, doença de parkinson, via direta nariz-cérebro.

ABSTRACT

Alzheimer's and Parkinson's diseases are currently identified as the most prevalent neurodegenerative diseases, constituting a public health problem. Pharmacological therapy for the treatment of these diseases is limited by the low bioavailability of drugs in the central nervous system. In recent years, it has been reported that intranasal administration of formulations via the direct nose-to-brain route shows pharmacokinetic and pharmacodynamic advantages that improve drug activity, since the molecules do not have to cross the blood-brain barrier to reach the brain. In this context, the development of intranasal formulations based on lipid nanoparticles, in particular solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, is a promising alternative. The increased therapeutic potential of drugs encapsulated in these nanoparticles has already been observed in several *in vivo* studies, which suggests the feasibility of their use in the treatment of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease. However, to date, no drugs based on lipid nanoparticles have been launched for the treatment of these diseases, so more research is needed, including clinical trials, to enable their application in clinical practice.

Keywords: lipid nanoparticles, parkinson disease, alzheimer's disease, nose-to-brain.

¹ FP-13ID (Instituto de Investigação, Inovação e Desenvolvimento), FP-BHS (Biomedical and Health Sciences Research Unit), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

² LEPABE - Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.

³ ALiCE—Associate Laboratory in Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.

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

⁵ Associate Laboratory i4HB Institute for Health and Bioeconomy, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal.

*Autor para correspondência: anacatsil@gmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento do número de doentes com doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, tem sido um grave problema de saúde pública. Estima-se que, com o aumento da esperança média de vida e o consequente envelhecimento da população, este número continuará a aumentar, o que constitui uma preocupação, uma vez que não existe uma cura eficaz para estas doenças. Grande parte dos novos fármacos que estão a ser investigados enfrentam problemas de biodisponibilidade, relacionados com a dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE).

Assim, o desenvolvimento de vias de administração alternativas, que permitam aumentar a quantidade de fármaco que atinge o sistema nervoso central (SNC), tem sido bastante investigado. A via de administração direta nariz-cérebro (*nose-to-brain*) apresenta um potencial significativo, uma vez que, para além de evitar a necessidade de os fármacos atravessarem a BHE, o que poderá promover a sua biodisponibilidade, facilita a utilização de sistemas de entrega alternativos, como as nanopartículas lipídicas que promovem a absorção e o direccionamento dos fármacos¹⁻⁵.

Neste artigo de revisão é apresentada uma descrição da anatomofisiologia da cavidade nasal, com informações sobre a BHE e os mecanismos relevantes para a administração de fármacos por via *nose-to-brain*, seguidos da descrição de algumas particularidades desta via de administração. Adicionalmente, são descritas as principais características das nanopartículas lipídicas, nomea-

damente, as nanopartículas de lípidos sólidos (*solid lipid nanoparticles* – SLN) e os vetores lipídicos nanoestruturados (*nanostuctured lipid carriers* – NLC), juntamente com os requisitos das formulações nasais. Por fim, são apresentados os resultados mais relevantes de estudos *in vitro* e *in vivo* com este tipo de formulações usadas para o tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson. Para o efeito, foi compilada a informação dos artigos mais relevantes, publicados entre 2002 e 2023 em língua inglesa, usando como motores de busca a *Pubmed*, o *Science Direct* e o *Google Académico*; e as palavras-chave “lipid nanoparticles”, “nose-to-brain”, “NLC”, “SLN”, “Alzheimer” e “Parkinson”.

2. DOENÇAS DE ALZHEIMER E DE PARKINSON

A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais prevalente ao nível mundial, a qual está associada à demência severa. Estima-se que em 2050 mais de 130 milhões de pessoas sofram desta doença, o que representa um problema para a saúde pública, visto que, até à data, não existe uma cura efetiva¹.

Apesar de atualmente o mecanismo patológico da doença de Alzheimer ainda não estar totalmente esclarecido, estão descritos alguns mecanismos possíveis, tais como¹⁻⁶:

- Formação de placas de beta-amiloide: consistem em agregados de uma proteína denominada beta-amiloide, a qual é acumulada na forma de péptidos insolúveis no espaço extracelular do cérebro. Acredita-se que estas placas interrompem os sinais de comunicação entre as células nervosas e causam dano neuronal, promovendo a perda de memória

e a incapacidade, bem como a atrofia do cérebro. Assim, a formação de placas de beta-amiloide é considerada um dos marcadores patológicos da doença de Alzheimer.

- Formação de tranças neurofibrilares: consistem numa acumulação anormal da proteína tau hiperfosforilada no interior das células nervosas. Em condições normais, a tau ajuda a estabilizar os microtúbulos (componentes essenciais do citoesqueleto celular), no entanto, no caso da doença de Alzheimer, a proteína tau é modificada e acumula-se na forma de tranças neurofibrilares. Desta forma, estas afetam a estrutura e função das células nervosas, contribuindo para a disfunção neuronal e perda da conectividade sináptica.

- Inflamação e resposta imunológica: a inflamação cerebral crónica e a ativação da resposta imunológica são também componentes da neuropatologia da doença de Alzheimer. A microglia e as células imunes residentes do cérebro são ativadas em resposta à acumulação de placas de beta-amiloide e emaranhados neurofibrilares. Embora esta resposta imunológica seja um mecanismo de defesa natural, no caso da doença de Alzheimer ela torna-se crónica, e pode contribuir para o dano neuronal e a progressão da doença.

Por outro lado, verifica-se igualmente que vários fatores, relacionados com alterações genéticas, respostas imunes inatas, inflamação neuronal sistémica e uma dieta não equilibrada, podem contribuir para a degradação neuronal.

Atualmente, o tratamento convencional da doença de Alzheimer tem como objetivo diminuir a progressão dos sintomas e melhorar ou reduzir a incapacidade

mental e física, através da combinação de tratamentos farmacológicos e não farmacológicos. A terapia farmacológica consiste na monoterapia com inibidores da acetilcolinesterase ou na combinação destes inibidores com inibidores dos antagonistas dos recetores da N-metil-D-aspartato (NMDA), com vista a melhorar a função cognitiva e aliviar alguns dos sintomas. A administração destes fármacos é efetuada por via oral e/ou via transdérmica, o que os torna suscetíveis aos processos de degradação metabólica, e às barreiras fisiológicas, como a BHE, que tendem a dificultar a sua biodisponibilidade no SNC¹⁻⁶.

A doença de Parkinson é uma doença caracterizada pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância *nigra* do cérebro, a qual conduz a sintomas severos, destacando-se a disfunção motora, acompanhada por tremores e espasmos, rigidez muscular, bradicinesia, hipersensibilidade e postura anormal, entre outros. Os mecanismos fisiopatológicos da doença incluem⁷⁻¹⁰:

- Disfunção mitocondrial: resulta em uma menor produção de ATP e em um aumento da formação de radicais livres.

- Stress oxidativo: contribui, juntamente com a disfunção mitocondrial, para o processo de morte neuronal, agregação de proteínas, como a α -sinucleína, as quais contribuem para a formação dos corpos de Lewy.

- Inflamação neurogénica: consiste numa resposta inflamatória crónica do SNC que resulta da ativação de células imunes residentes no cérebro, como a microglia e astrócitos, a qual origina a produção de citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β).

- Agregação de proteínas: como a α -sinucleína, a qual é abundante nos neurónios dopaminérgicos, pode sofrer alterações conformacionais, levando à sua agregação e à formação de inclusões insolúveis conhecidas como corpos de Lewy. Estas interferem no funcionamento normal das células nervosas, causando stress celular e disfunção mitocondrial, sendo assim fatores determinantes para o processo de neurodegeneração. O tratamento atual da doença de Parkinson tem como objetivo o alívio e controlo dos sintomas motores, causados pela deficiência de dopamina, assim como retardar a progressão da doença, pois não existe uma cura definitiva⁷.

3. ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

3.1. Barreiras fisiológicas

As terapias da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson estão muito limitadas no que diz respeito ao acesso dos fármacos ao local alvo da ação, sendo necessário o desenvolvimento de veículos e vias de administração alternativos que consigam uma boa biodisponibilidade dos fármacos no SNC. Desta forma, o desenvolvimento de formulações para a administração de fármacos pela via *nose-to-brain*, de forma eficaz e segura, surge como alternativa promissora no tratamento destas doenças. Um dos principais obstáculos para o tratamento destas doenças neurodegenerativas é a dificuldade dos fármacos atravessarem a BHE, que consiste numa barreira constituída principalmente por células endoteliais da rede capilar do SNC, a qual regula de forma altamente seletiva a passagem de moléculas da corrente sanguínea para o cérebro, sendo apoiada secundariamente por outros tipos

de células, tais como os periócitos da lâmina basal abluminal, os astrócitos perivasculares, a lâmina basal da parede capilar e a microglia¹¹. Entre as funções da BHE destacam-se¹²: (i) proteção do cérebro dos compostos e moléculas circulantes na corrente sanguínea através das estreitas uniões do endotélio dos capilares cerebrais (*tight junctions*), permitindo apenas a passagem de oxigénio, glucose, aminoácidos e outros nutrientes essenciais para os tecidos cerebrais. (ii) Capacidade de transporte seletivo desde a rede capilar para o parênquima cerebral, por transporte facilitado, como ocorre com a glucose, ou por difusão ativa ATP dependente. (iii) Metabolização e/ou modificação de elementos sanguíneos do sangue para o tecido nervoso e vice-versa.

A BHE apresenta diferentes mecanismos fisiológicos que dificultam a passagem de compostos para o cérebro:

- Barreira paracelular, formada pelas *tight junctions* e *aderent junctions*: constituída por complexos proteicos formados entre as células, que conferem impermeabilidade, limitando a difusão passiva dos fármacos para o SNC. Apenas moléculas lipofílicas e pequenas moléculas hidrofílicas são capazes de atingir o cérebro através desta via^{12,13}.

- Barreira transcelular: apresenta atividade de endocitose significativamente menor do que noutras regiões do cérebro e, uma vez que este processo contribui para a passagem dos fármacos para a BHE, esta será também diminuída¹⁴.

- Barreira enzimática: as células da BHE possuem uma forte capacidade metabólica, apresentando uma expressão significativa de peptidases, fosfatases, nucleotidases, esterases e enzimas do ci-

tocromo P450, o que promove a capacidade de degradação de fármacos¹⁵.

- Barreira imunológica: a microglia, os mastócitos e os macrófagos formam uma barreira imunológica que irá acelerar o processo de *clearance* dos fármacos¹⁵.

- As proteínas de efluxo, como os transportadores ATP-dependentes (glicoproteína-P - P-gp, proteína de resistência ao cancro da mama - BCRP, *multidrug resistance proteins* - MRPs), juntamente com outros tipos de transportadores estão expressas na BHE em grande quantidade, aumentando o efluxo de fármacos para fora desta barreira, limitando assim a sua permeabilidade^{16,17}.

3.2. Estratégias alternativas para o transporte de fármacos

Existem vários métodos alternativos para o transporte de fármacos para o SNC, entre os quais se destacam o uso de nanossistemas administrados pela via intravenosa. No entanto, estes sistemas estão limitados pelo mecanismo de opsonização e consequente captura do fármaco pelas células do sistema reticulo-endotelial. Para evitar ou minimizar este mecanismo de eliminação, pode ser realizada a funcionalização dos nanossistemas, a qual consiste na alteração da sua superfície através da ligação de moléculas, como, por exemplo, o polietileno-glicol – PEG. Podem ainda ser ligadas outras moléculas à superfície, como, por exemplo, anticorpos monoclonais, que se ligam especificamente aos receptores das células-alvo, promovendo o direcionamento dos nanossistemas para o local alvo da ação¹⁸. Também podem ser usados métodos invasivos, como a aplicação transcraniana de formulações,

ou a ruptura da BHE por métodos de infusão hiperosmótica ou de radiação ultrassónica. No entanto, estes métodos são muito agressivos e podem comprometer o correto funcionamento da BHE, pelo que não são considerados métodos de primeira escolha na terapêutica¹².

Recentemente, tem sido sugerido o uso de formulações por via intranasal, sendo considerado como uma das opções mais viáveis e vantajosas para a administração de fármacos para o SNC, pois permite o transporte direto de fármacos do nariz para o cérebro, evitando a passagem pela BHE¹⁸.

3.3. Via intranasal

As vantagens da via intranasal na administração de fármacos para o SNC incluem o facto de ser uma via não-invasiva e que permite obter uma elevada biodisponibilidade dos fármacos devido ao elevado fluxo sanguíneo, à elevada área de superfície da mucosa nasal e à possibilidade da passagem direta dos fármacos da cavidade nasal para o SNC, o que permite uma rápida absorção e, consequentemente, uma maior rapidez do efeito terapêutico. Além disso, esta via também permite evitar o efeito de primeira passagem hepática dos fármacos e, como vantagem sobre outras vias de administração, como a via intravenosa, apresenta maior facilidade de aplicação. No entanto, é preciso ter em conta alguns fatores que podem comprometer a eficácia da via intranasal, como o processo de *clearance* mucociliar, a degradação enzimática e o baixo tempo de permanência da formulação no local de absorção¹⁹.

3.3.1. Anatomofisiologia da cavidade nasal

A cavidade nasal divide-se em duas partes iguais, separadas pelo septo, que se dividem em três regiões: vestíbulo (*atrium*), região respiratória e região olfatória. O vestíbulo localiza-se na parte frontal e constitui a primeira defesa à entrada de agentes patogénicos no organismo, sendo a região menos permeável aos fármacos, devido à falta de vascularização, pequena superfície de contacto, e presença de cílios nasais que filtram as partículas do ar inspirado. Esta área da cavidade nasal é constituída por epitélio escamoso e contém glândulas sebáceas e sudoríparas. Com efeito, esta é a região menos relevante no estudo da administração de fármacos¹⁹.

A região respiratória ocupa a maior área da cavidade nasal, é a mais vascularizada e permeável, sendo de maior relevância para o estudo da administração de fármacos. Esta área é formada por epitélio respiratório, cornetos e vilosidades e, na secção inferior, por pequenos orifícios que se ligam aos seios paranasais. Relativamente ao epitélio respiratório, o qual é caracterizado como epitélio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, este é composto por células caliciformes, responsáveis pela produção de muco; por células basais, cuja função é a recuperação do epitélio após uma lesão, devido à sua capacidade de diferenciação; e por células cilíndricas ciliadas e não-ciliadas. As células ciliadas ocupam 15-20% da quantidade total de células respiratórias e movimentam-se coordenadamente conduzindo o muco desde a parte anterior da cavidade nasal para a faringe, onde é eliminado através do trato gastrintestinal, pelo processo de *clearance* mucociliar, através do qual se confere a

proteção do trato respiratório das substâncias exógenas prejudiciais²⁰.

A lâmina própria, situada sobre a região respiratória, é responsável pela absorção dos fármacos, devido à presença de muitos capilares, vasos sanguíneos e nervos; e pela inervação das ramificações oftálmica e maxilar do nervo trigémeo a partir das quais constitui uma via direta de entrada para o SNC²¹.

A região olfatória localiza-se na secção superior da cavidade nasal, abaixo da placa cribiforme, que consiste numa estrutura óssea com pequenos poros e feixes neuronais. Desta forma, é a única região que liga diretamente a mucosa nasal ao cérebro, constituindo assim uma via de acesso direto ao SNC. Nesta região, encontra-se a mucosa olfatória, a qual contém as terminações nervosas responsáveis pelo sentido do olfato. A mucosa olfatória inclui o epitélio olfatório, tecido conjuntivo, e os neurónios olfatórios. Os últimos localizam-se na região do epitélio olfatório, especificamente na placa cribiforme. O revestimento da parte superior da cavidade nasal é constituído por epitélio olfatório pseudoestratificado, a partir do qual muitas células se convertem em células nervosas sensoriais, e cujo prolongamento central do seu extremo basal atravessa a lâmina cribiforme do osso etmoide e forma o nervo olfatório. Relativamente à estrutura da mucosa olfatória, podem-se diferenciar duas camadas separadas por uma membrana basal, nomeadamente, o neuroepitélio propriamente dito, e a lâmina própria. Esta última consiste num tecido conjuntivo rico em vasos e glândulas de Bowman, que representam a principal fonte de secreções mucosas e serosas da

mucosa nasal. Estas secreções, e falando especificamente da camada de muco produzida nesta região, consistem numa solução aquosa de mucopolisacarídeos, imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), lisozima e lactoferrina, e diversas enzimas. As funções gerais do muco estão relacionadas com a inativação de vírus e bactérias inalados, e com o transporte e modificação dos diversos estímulos olfativos e feromonas²².

No que diz respeito ao epitélio olfatório propriamente dito, este consiste num epitélio cilíndrico pseudoestratificado, é vascularizado pelas ramificações da artéria oftálmica, possui cílios de maior tamanho que os do epitélio respiratório, e apresenta três tipos de células^{20,23}: células de suporte, células sensoriais receptoras e células basais.

3.3.2. Vias de transporte direto nariz-cérebro

Os nervos responsáveis pela inervação da cavidade nasal são principalmente o olfatório e o trigêmeo, juntamente com as suas ramificações. O primeiro atinge o SNC através do bulbo olfatório, atravessando a placa cribiforme, enquanto o segundo, o qual inerva tanto o epitélio respiratório como o olfatório, atinge o SNC através da placa cribiforme pelas ramificações dos nervos maxilar e oftálmico. Desta forma, existem diferentes formas dos fármacos atingirem diretamente o SNC após administração intranasal (Figura 1):

- Via direta através do nervo olfatório: abrange o epitélio olfativo, núcleo olfatório anterior, trato olfatório, amígdala, hipotálamo e córtex piriforme. Esta região é composta pela mucosa olfatória, que é formada por uma grande quantidade de neurónios olfatórios,

pelo que é ideal para o transporte de elevadas quantidades de fármaco para o SNC. Dentro desta via, podem-se diferenciar duas vias secundárias, a neuronal e a epitelial, onde o transporte do fármaco pode ocorrer via intracelular ou extracelular. A via neuronal é caracterizada pela internalização de fármacos nos neurónios sensoriais olfatórios, através de mecanismos de endocitose ou pinocitose, e pelo transporte intracelular axonal, ao longo dos neurónios sensoriais até ao bulbo olfatório, no cérebro²⁰. Os fármacos que interagem com o epitélio olfatório ciliado são rapidamente transportados para o SNC, passando através da placa cribiforme, atingindo o bulbo olfatório e o líquido cefalorraquidiano (LCR). Neste último caso, o fármaco irá misturar-se com o líquido intersticial, permitindo assim a distribuição no córtex cerebral⁵.

- Via direta através do nervo trigêmeo: inerva o epitélio respiratório e o epitélio olfatório, sendo responsável pela transmissão de informação sensorial da cavidade nasal e oral, córnea e pálpebras para o SNC através das divisões oftálmica, maxilar e mandibular, constituindo assim uma alternativa para a entrega de fármacos no SNC e no LCR²⁴.

- Via indireta ou sistémica: a cavidade nasal recebe sangue da artéria carótida pelas ramificações maxilar, facial e oftálmica, o que faz com que esta seja uma região altamente vascularizada. Desta forma, os epitélios respiratório e olfatório são altamente irrigados, podendo assim ocorrer absorção do fármaco para a corrente sanguínea, através do epitélio nasal. Após chegar à corrente sanguínea, parte do fármaco atingirá o SNC, a qual irá variar em função

das características físico-químicas da molécula. Além disso, esta passagem é muito limitada por diversos mecanismos preventivos da passagem de fármacos para o cérebro, nomeadamente, degradação das moléculas pelas proteases sanguíneas, os processos de clearance renal e hepática, a ligação do fármaco às proteínas plasmáticas, assim como a dificuldade em atravessar a BHE, sobretudo para moléculas hidrófilas e/ou de elevado peso molecular. Também é importante referir que a passagem para a circulação sistémica, independentemente da capacidade do fármaco para atravessar a BHE, não implica necessariamente a passagem através desta barreira, pois a passagem de fármacos do sangue para o cérebro pode ocorrer alternativamente pelo plexo coroide, através do qual o fármaco acede ao LCR de forma unidirecional e a uma taxa inversamente proporcional ao seu peso molecular, podendo difundir-se para o cérebro, embora em uma menor quantidade devido ao lento processo de difusão e permeação^{20,24}.

- Via fluídos linfáticos e espinais: a área submucosa da região olfatória (lâmina própria) apresenta diversas vias extracelulares para o transporte de fármacos. Sendo assim, estes podem ser transferidos por via intracelular, associados às ramificações do nervo olfatório, desde a lâmina própria e através da placa cribriforme, para o bulbo olfatório. Alternativamente, os fármacos podem passar desde a lâmina própria, por absorção para os vasos olfatórios, como referido na via sistémica; ou também para os vasos linfáticos olfativos, os quais drenam para os gânglios linfáticos cervicais profundos no pescoço²⁰.

Tendo em conta que os gânglios cervicais profundos possuem ligação com os espaços subaracnoide e perineurais, através destes é possível facilitar o transporte do fármaco para o cérebro, pois estes contêm os nervos olfatórios e linfáticos nasais, os quais são necessários para a drenagem do LCR. Desta forma, concordando com diversos estudos, os fármacos administrados por via intranasal podem aceder diretamente ao LCR através da cavidade nasal, permitindo que os fármacos cheguem ao cérebro e sejam distribuídos pelas suas diferentes regiões e a medula espinhal^{24,25}.

Devido à existência de duas vias diretas distintas, na maior parte dos casos, é difícil saber se o fármaco atinge o SNC através da via do nervo trigêmeo, da via olfatória ou de ambas, pois, como referido, uma porção do nervo trigêmeo entra no bulbo olfatório e atravessa a placa cribriforme, de forma adjacente à da via olfatória²⁴.

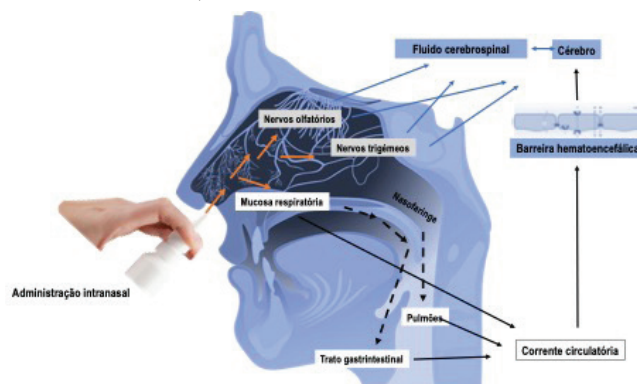


Figura 1. Vias de transporte direto nariz-cérebro de fármacos após a administração intranasal (adaptado de²², com autorização).

Ao nível celular, o fármaco pode atravessar os nervos para o SNC, via intraneuronal ou extraneuronal. A primeira requer a passagem através dos axónios neuronais, processo que é extremamente lento, podendo demorar horas ou até dias para que o fármaco atinja o local alvo de ação. Por outro lado, a via extraneuronal proporciona um transporte muito mais

rápido do fármaco, podendo ocorrer via paracelular ou transcelular, demorando poucos minutos para atingir o bulbo olfatório e o SNC. O fármaco pode também atravessar a mucosa olfatória através das células de suporte (transporte transcelular) ou ao longo das células de suporte através das *tight junctions* (transporte paracelular), sendo que em ambos casos o fármaco passa através da lâmina própria. Geralmente, os fármacos hidrofílicos utilizam este tipo de transporte, enquanto os fármacos lipofílicos usam o transporte transcelular, através de endocitose mediada por recetores ou difusão passiva^{20,23}.

Apesar da via paracelular constituir o caminho de acesso mais importante para que os fármacos atinjam o SNC, quando estes são administrados por via intranasal, há outros fatores que influenciam a sua passagem para o cérebro. Estes fatores estão principalmente relacionados com as propriedades da formulação, tais como o tamanho de partícula, grau de lipofília, peso molecular, entre outros. No entanto, é difícil determinar a via exata que o fármaco segue para chegar ao SNC, podendo este ser transportado através de um mecanismo combinado que envolve as três vias. Considera-se que a via intracelular e a via axonal não são as mais relevantes, sendo a via extracelular a mais rápida, como se verificou pelos curtos intervalos entre a administração e a deteção do fármaco no cérebro.

3.4. Fatores que influenciam a absorção intranasal de fármacos

A via intranasal requer o uso de formulações que sobreponham a absorção dos fármacos aos efeitos dos mecanismos fi-

siológicos de defesa da cavidade nasal, tais como a *clearance* mucociliar ou a degradação enzimática, que originam eliminação ou degradação do fármaco, respetivamente, impedindo a sua absorção nasal. Assim, é importante referir que se deve ter em conta as características físico-químicas específicas das formulações administradas via intranasal, entre as quais se destacam^{21,22,24,26}:

- Tamanho e peso molecular: as moléculas de elevado peso molecular (até 1kDa) têm uma absorção muito lenta, devido à impossibilidade de efetuar a passagem por via transcelular e, consequentemente, apresentam uma biodisponibilidade muito baixa (0,5-5%). Por outro lado, as moléculas mais pequenas (até 300Da) sofrem uma absorção rápida, através das *tight junctions* por via paracelular.

- Grau de ionização: interfere com a difusão dos fármacos, devendo ser usadas soluções cujo pH mantenha o fármaco na forma não ionizada, na qual a absorção é maior.

- Solubilidade no muco nasal: para conseguirem ser absorvidos, os fármacos devem dissolver-se no muco nasal, pelo que a solubilidade no muco é determinante para a sua absorção. Assim, devido ao muco nasal ter um elevado teor em água, as moléculas com um elevado grau de lipofília não se conseguem dissolver no muco e, consequentemente, o seu tempo de permanência na cavidade nasal não irá ser suficiente para a absorção. Por outro lado, as moléculas muito hidrofílicas apresentam uma grande capacidade de dissolução no muco. Não obstante, estas últimas irão apresentar uma maior sensibilidade à remoção da cavidade nasal pelo proces-

so da *clearance* mucociliar. Relativamente ao tamanho de partícula, deve ter-se em conta o facto de a mucina presente no muco nasal formar ligações com as moléculas de elevado peso molecular, impedindo a sua absorção. Também a rede polimérica formada entre a mucina e as enzimas proteolíticas pode degradar rapidamente as moléculas de fármaco. Em termos de forma farmacêutica, os fármacos em pó ou em suspensão apresentam menor tempo de dissolução no muco, pelo que serão mais facilmente removidos pelo mecanismo de *clearance* mucociliar. Depois deste processo de solubilização, a passagem do fármaco através das células epiteliais ocorre por transporte paracelular (sendo que as moléculas hidrofílicas de pequeno tamanho passam através das *tight junctions*, enquanto as moléculas de maior tamanho não conseguem atravessar), ou por transporte transcelular (o qual será empregue pelas moléculas de natureza lipofílica), atravessando as células por difusão passiva.

- *Clearance* mucociliar: o processo de remoção do muco interfere consideravelmente no tempo de permanência dos fármacos na cavidade nasal, sendo que estes são geralmente removidos entre 15 e 30 minutos após a administração. Dependendo do local de deposição do fármaco depois da administração intranasal, este será mais ou menos rapidamente eliminado. Desta forma, quando o fármaco é administrado em gotas, deposita-se na parte posterior da cavidade nasal, onde o processo de *clearance* mucociliar é superior devido à presença aumentada de células ciliadas. Por outro lado, quando o fármaco é administrado em forma de spray ou aerossol, este irá

depositar-se na parte anterior da cavidade nasal, onde o processo de *clearance* mucociliar é mais lento e, consequentemente, a absorção de fármaco será maior. Deve ainda ser tido em conta que a viscosidade da formulação, independentemente da forma farmacêutica usada, está diretamente relacionada com o movimento ciliar, pelo que esta deverá ser adequada, pois formulações muito viscosas podem alterar a função ciliar.

- Fluxo sanguíneo: está diretamente relacionado com a absorção do fármaco. As moléculas com propriedades vasodilatadoras aumentam a absorção de fármaco e, da mesma forma, moléculas vasoconstritoras diminuem a absorção. O mesmo ocorre com fatores externos que podem modificar o fluxo sanguíneo, como a humidade, temperatura, patologias ou stress.

- Metabolismo basal: é determinado pelas enzimas da cavidade nasal, as quais têm capacidade de degradação de fármacos, como as enzimas do citocromo P450 (Cyp P450), esterases e hidrolases, entre outras, responsáveis pela metabolização e degradação das moléculas de fármaco, afetando diretamente à sua absorção.

- Osmolaridade e volume: é importante que as formulações sejam isotónicas para que a sua administração não resulte numa alteração da função ciliar. O volume administrado pode afetar a absorção de fármaco, sendo que diversos estudos determinaram que deve ser administrado um volume máximo de 200 microlitros, para que o fármaco não seja eliminado pelo processo de *clearance* mucociliar, antes da absorção ser efetuada.

- Sistemas transportadores: o transporte do fármaco é influenciado pela atividade dos sistemas transportadores da cavi-

dade nasal, os quais podem influenciar a biodisponibilidade dos fármacos como, por exemplo, a P-gp (sistema de transporte ATP-dependente).

Têm sido usadas diferentes estratégias para contornar os fatores que influenciam a absorção dos fármacos administrados por via intranasal, tais como o uso de²⁴:

- Substâncias mucoadesivas: constitui uma das estratégias mais frequentes e consiste na utilização de excipientes com propriedades mucoadesivas para evitar a rápida remoção da formulação pelo processo de *clearance* mucociliar, aumentando assim o tempo de permanência do fármaco no local de absorção.

- Sistemas de nanopartículas com modificações de superfície: adição de ligandos seletivos para as células alvo da ação que promovem a absorção dos fármacos (por exemplo, as lectinas identificam recetores expressos nos epitélios respiratório e olfatório, promovendo a ligação seletiva e o transporte direto do fármaco para o SNC).

- Promotores de absorção e agentes solubilizantes: a sua função consiste em aumentar a permeabilidade das células epiteliais através da modificação da membrana fosfolipídica. Estes não comprometem a segurança das formulações para administração intranasal, pois não possuem propriedades alérgicas ou tóxicas, sendo compatíveis com os outros componentes da formulação, promovendo a rápida absorção dos fármacos.

- Inibidores enzimáticos: responsáveis pela redução da degradação enzimática no epitélio nasal, facilitando a absorção dos fármacos. Entre estes encontram-se os inibidores das peptidases e proteases. É importante referir que o mecanismo de ação destes inibidores enzimáticos não promove a penetração de fármaco

na membrana epitelial, o que irá comprometer a sua absorção se não for usado em simultâneo com promotores de absorção.

- Moduladores das *tight junctions*: promovem a abertura das *tight junctions* das células epiteliais e promovem a entrada de fármacos no epitélio nasal, facilitando a sua passagem por via paracelular.

4. USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA O TRANSPORTE DE FÁRMACOS VIA NOSE-TO-BRAIN

4.1. Principais características

O conceito de nanopartículas lipídicas refere-se a um tipo de dispersões coloidais de nanopartículas sólidas, de tamanhos entre 1 e 1000 nm, contendo 0.1 a 30% de lípido(s) semelhantes aos fisiológicos, estabilizadas por 0.5 a 5% de uma combinação de um ou dois agentes emulsivos considerados seguros para uso farmacêutico (*generally recognized as safe* – GRAS). As nanopartículas lipídicas possuem a capacidade de encapsular fármacos (principalmente moléculas lipofílicas), aumentando a sua biodisponibilidade, protegem-nos das degradações, permitem a sua libertação prolongada e originam baixa toxicidade nas formulações finais. Estas nanopartículas permitem ainda a funcionalização para promover o direcionamento para os locais alvo da ação^{27,28}.

Relativamente aos tipos de nanopartículas lipídicas, as SLN constituem a primeira geração, sendo formadas por um lípido sólido que origina uma estrutura interna altamente organizada^{27,29}. O segundo tipo de nanopartículas lipídicas, conhecido como NLC, é constituído por uma mistura de um lípido sólido (em maior quantidade) com um lípido líquido (em menor quantidade). Ao contrário das SLN, os NLC formam uma matriz

interna desorganizada que permite uma maior eficiência de encapsulação de fármaco e a redução da sua expulsão durante o armazenamento. Devido a estas duas vantagens sobre as SLN, atualmente as investigações focam-se nos NLC^{5,30,31}.

No que diz respeito à administração de fármacos por via *nose-to-brain*, as SLN e os NLC permitem o transporte direto desde a cavidade nasal para o cérebro, por via dos nervos trigémeos e/ou dos nervos olfatórios, promovendo a biodisponibilidade dos fármacos. O uso de lípidos fisiológicos e excipientes GRAS aumenta consideravelmente a biocompatibilidade com a mucosa nasal e diminui a toxicidade das formulações. Por outro lado, as nanopartículas lipídicas aderem ao epitélio olfatório, aumentando o tempo de contacto da formulação com a mucosa nasal, evitando a rápida eliminação pelo processo de *clearance* mucociliar, conferem proteção dos fármacos contra a degradação enzimática na cavidade nasal

e permitem a sua libertação prolongada. É importante referir que, uma vez que estas nanopartículas se destinam ao transporte direto através dos nervos trigémeos e/ou dos nervos olfatórios, os seus tamanhos devem ser menores que o diâmetro desses nervos, devendo apresentar um tamanho menor que 200 nm, índice de polidispersão (*polydispersity index* - PDI) entre 0.2 e 0.3 e potencial zeta (zeta potential - ZP) aproximadamente de $|\pm 30|$ mV. Devem ainda ser respeitadas as condições de isotonia, viscosidade e pH adequadas aos valores fisiológicos da mucosa nasal^{5,21,30,32-35}.

4.2. Estudos *in vitro* com formulações intranasais de SLN e NLC

Nos últimos anos, vários grupos de investigação têm avaliado a eficácia e segurança *in vitro* de formulações de SLN e NLC para administração intranasal para melhorar o tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson. Na Tabela 1 estão sumarizados os resultados mais relevantes desses estudos.

Tabela 1. Exemplos de estudos *in vitro* com nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) intranasais³⁶⁻⁴⁰.

Tipo de nanopartículas lipídicas	Fármaco	Doença alvo	Linha celular	Resultados relevantes
SLN	Extrato de semente de uva e dopamina	Doença de Parkinson	Células de neuroblastoma (SH-SY5Y) Células olfatórias (OEC)	Nenhuma das três formulações testadas (extrato de semente de uva e dopamina; SLN carregados com dopamina e SLN carregados com dopamina e extrato de semente de uva) apresentou citotoxicidade nas células OEC e nas SH-SY5Y, em concentrações de 18-75 $\mu\text{g/mL}$
SLN	Extrato de semente de uva e dopamina	Doença de Alzheimer	OEC SH-SY5Y	Ambas as formulações de SLN (DA-FITC-co-GSE-SLN e GSE-ads-DA-FITC-SLN) apresentaram viabilidade celular para concentrações de 12.5 e 25 μM nas células SH-SY5Y, e para as células OEC em concentrações de 12.5, 25, 50 e 75 μM .

Tabela 1. Exemplos de estudos *in vitro* com nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) intranasais³⁶⁻⁴⁰ (cont).

Tipo de nanopartículas lipídicas	Fármaco	Doença alvo	Linha celular	Resultados relevantes
SLN e NLC	Curcumina	Doença de Parkinson	Células epiteliais da barreira hematoencefálica (hCMEC)	Foi comprovada a biocompatibilidade celular e viabilidade celular das formulações SLN e NLC conjugadas com transferrina contendo curcumina, assim como uma melhoria na permeabilidade celular das nanopartículas conjugadas com transferrina.
NLC	Pioglitazona	Doença de Alzheimer	SH-SY5Y	A viabilidade celular foi semelhante para ambas as formulações, sendo 69.15% para as NLC carregadas com pioglitazona e 66.89% para a molécula isolada de pioglitazona, em concentrações até 10 µg/mL
NLC	Tacrina	Doença de Alzheimer	SH-SY5Y	Ambas as formulações (NLC vazias e NLC carregadas com tacrina) demonstraram uma viabilidade celular semelhante. A viabilidade celular das NLC carregadas com tacrina conjugadas com um péptido anfotérico decresceu consideravelmente.

Trapani *et al.* realizaram estudos para determinação dos efeitos da administração simultânea de dopamina e compostos polifenólicos antioxidantes derivados do extrato de semente de uva, ambos encapsulados em SLN para administração intranasal, com vista à otimização do tratamento da doença de Alzheimer. O tamanho das nanopartículas foi de 184 ± 34 nm, e o seu PDI foi de 0.32 ± 0.07 . Não apresentou toxicidade associada à formulação nos estudos realizados em linhas celulares olfatórias (OEC) e de neuroblastoma (SH-SY5Y). Na avaliação *in vitro* dos efeitos da formulação na viabilidade celular, assim como no stress oxidativo induzido pela neuroto-

xina 6-hidroxiopamina (6-OHDA), foi demonstrado o aumento significativo da viabilidade celular em comparação com as células tratadas unicamente com a 6-OHDA³⁶.

Jojo *et al.* avaliaram formulações NLC carregadas com pioglitazona para o tratamento da doença de Alzheimer, especificamente o risco de citotoxicidade nasal associado. No estudo foram utilizadas células SH-SY5Y para a avaliação da citotoxicidade das formulações NLC carregadas com pioglitazona, e foram comparadas com formulações contendo o fármaco livre, sendo o parâmetro para a avaliação da viabilidade das formulações a dose letal 50 (DL50), sendo de

16.626 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as formulações contendo fármaco livre e 17.3874 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as formulações NLC de pioglitazona. Também, relativamente à viabilidade celular, esta foi semelhante para ambas as formulações (69.15% e 66.89% para as formulações de fármaco livre e de NLC, respetivamente, ambas na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), revelando assim não existem diferenças significativas quanto à segurança e à citotoxicidade entre as formulações³⁹.

Silva *et al.* utilizaram formulações NLC carregadas com tacrina, assim como formulações NLC conjugadas a um peptídeo anfotérico no lugar da tacrina, para avaliação da viabilidade em linhas celulares do neuroblastoma (SH-SY5Y). Os resultados demonstraram que as formulações NLC carregadas com tacrina obtiveram uma boa tolerância, ao contrário das formulações NLC conjugadas com o peptídeo anfotérico, as quais apresentaram elevada toxicidade e um decréscimo acentuado da viabilidade celular. Assim, concluiu-se que o uso de formulações NLC carregadas com tacrina é promissor para o tratamento da doença de Alzheimer, sendo interessante testar estas formulações em modelos *in vivo*⁴⁰.

Trapani *et al.* investigaram a combinação de dopamina (DA) com extrato de semente de uva (GSE) veiculadas em SLN, com o objetivo de testar um possível efeito sinérgico para o tratamento de doenças neurológicas, assim como de desenvolver um veículo apropriado para a sua administração por via direta nariz-cérebro para a doença de Parkinson. Para isto, foram desenvolvidos dois tipos de formulações: SLN contendo DA e GSE coencapsuladas (DA-co-GSE-SLN),

e SLN contendo DA, com GSE adsorvida (GSE-ads-DA-FITC-SLN). Ambas as formulações foram submetidas a estudos de citotoxicidade em células SH-SY5Y e OEC (DA-FITC-co-GSE-SLN e GSE-ads-DA-FITC-SLN). No estudo com células OEC, ambas as formulações demonstraram segurança e biocompatibilidade para todos os valores de concentração testados (12.5, 25, 50 e 75 μM). No que concerne aos estudos com células SH-SY5Y, foi demonstrada segurança para ambas as formulações em concentrações de 12.5 e 25 μM , sendo que foi observado um decréscimo da viabilidade celular para concentrações de 50 e 75 μM ³⁷.

Yasir *et al.* desenvolveram formulações NLC com o polímero catiónico quitosano (CH) para avaliar a eficácia destas para a veiculação do donepezilo, com vista à administração deste fármaco por via direta nariz-cérebro. Os estudos incluíram a avaliação da libertação do fármaco da formulação durante o armazenamento para as formulações NLC otimizadas contendo o fármaco (DPZ-CH-NLCs-OPT2), em comparação com o fármaco livre em solução (DZP-Sol). Desta forma, o padrão de libertação de fármaco para as formulações (DPZ-CH-NLCs-OPT2) exibiu-se de forma bifásica, sendo na fase inicial, após 1h, de $29.35 \pm 2.81\%$, seguido de uma libertação prolongada de $89.82 \pm 8.41\%$, após 24h. Por outro lado, na formulação de fármaco em solução a expulsão de fármaco foi significativamente maior, sendo de $97.23 \pm 6.51\%$ após 3h, o que provavelmente ocorreu devido à sua elevada solubilidade aquosa⁴¹.

Neves *et al.* desenvolveram formulações de nanopartículas lipídicas de SLN e

NLC conjugadas com transferrina para a veiculação de curcumina, com o objetivo de comprovar a sua segurança e biocompatibilidade, assim como a capacidade de permeabilidade celular. A atividade metabólica celular e a integridade da membrana celular foram avaliadas em culturas de células hCMEC/D3, como modelo da BHE humana. Os resultados não revelaram a presença significativa de citotoxicidade para nenhuma das formulações, assim como também foi observada uma boa biocompatibilidade das nanopartículas para concentrações de 10 μM após 4h de exposição às células (sendo que para concentrações de 10 μM , a viabilidade celular para as formulações SLN foi equitativa à obtida pelo fármaco livre). Também foi efetuada uma avaliação da capacidade de permeação dos nanossistemas funcionalizados com transferrina, para a sua comparação com os não funcionalizados e foi comprovada uma permeação através da monocamada de células hCMEC cultivadas 1.5 vezes superior por parte das formulações conjugadas com transferrina, confirmando assim os benefícios da funcionalização das nanopartículas lipídicas com transferrina para a veiculação de curcumina³⁸.

4.4. Estudos *in vivo* com formulações intranasais de SLN e NLC

Nos últimos anos, têm aumentado significativamente as investigações *in vivo* para avaliar a eficácia de formulações intranasais de SLN e NLC para melhorar o tratamento da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson. Nas Tabelas 2 e 3 estão sumariados os resultados mais relevantes dos estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, respetivamente. Em geral, nos estudos *in vivo* as formu-

lações de SLN ou NLC administradas por via intranasal são comparadas com soluções ou dispersões do fármaco livre administrado por via intranasal, intravenosa ou oral, assim como com as SLN e NLC administradas por via intravenosa. Nos estudos farmacocinéticos, são determinadas as concentrações de fármaco em diferentes intervalos de tempo, no sangue e no cérebro, assim como as respetivas áreas sob a curva no sangue (AUC_{sangue}) e no cérebro ($AUC_{\text{cérebro}}$). Também são determinadas as concentrações máximas ($C_{\text{máx}}$) e os tempos necessários para atingir a concentração máxima ($T_{\text{máx}}$)¹⁹.

Os parâmetros críticos utilizados para avaliar a quantidade das formulações SLN e NLC que chegam ao cérebro são:

- DTE (*drug targeting efficiency*): quantifica a acumulação de fármaco no cérebro por parte da formulação administrada por via intranasal (IN), em relação à administração intravenosa (IV). Este parâmetro é calculado pela seguinte equação^{19,42,43}:

$$\text{DTE}\% = \frac{(AUC_{\text{cérebro,IN}})/(AUC_{\text{sangue,IN}})}{(AUC_{\text{cérebro,IV}})/(AUC_{\text{sangue,IV}})} \times 100$$

Sendo que a AUC é determinada no estudo de duração de 0 até t, os valores de DTE% podem variar desde 0 até ∞ . Enquanto a referência dos valores de DTE%, valores $>$ ou $<$ 100 sugerem respetivamente uma distribuição para o cérebro eficiente ou ineficiente^{19,42,43}.

- DTP% (*direct transport percentage*): avalia a percentagem de fármaco que entra no cérebro, do sangue através da BHE pelas vias diretas (trigémina e olfatória). Este parâmetro é definido pela equação^{19,42,43}:

$$DTP\% = \frac{(AUC_{\text{cérebro}}^{\text{IN}} - [(AUC_{\text{cérebro}}^{\text{IV}} \times AUC_{\text{sangue}}^{\text{IV}} \times AUC_{\text{sangue}}^{\text{IN}}])}{AUC_{\text{cérebro}}^{\text{IN}}} \times 100$$

Os valores de DTP% podem variar desde -∞ até 100. Quando não há fármaco transportado para o cérebro pelas vias diretas, o DTP% = 0.

Quando os valores de DTP% são <0, deve-se aos valores de DTE% serem

<100, o que indica que o fármaco em questão não consegue ultrapassar a BHE ($AUC_{\text{cérebro,IV}} = 0$). Por outro lado, quando os valores de DTP% são positivos, significa que os transportes pelas vias diretas contribuem significativamente para o transporte total de fármaco para o cérebro. Sendo assim, fármacos que não atravessam facilmente a BHE terão um valor elevado de DTP%^{19,42,43}.

Tabela 2. Exemplos de estudos farmacodinâmicos com nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) intranasais⁴⁴⁻⁵¹.

Fármaco/dose Modelo animal	Formulações testadas	Observações
Alfa-mangostim/2.5 mg/kg Doença de Parkinson/ Ratos ICR machos	Alfa-mangostim livre (oral) NLC carregado por alfa-mangostim (oral)	As formulações de NLC com alfa-mangostim preveniram de forma superior a redução de neurónios no striatum e no córtex motor.
Ácido ferúlico/15.2 mg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (180-200 g)	SLN carregado de ácido ferúlico intranasal (IN) Solução de ácido ferúlico não revestido (IN) Solução de ácido ferúlico (IN) Suspensão de ácido ferúlico (oral)	Foi observada uma melhoria na cognição com as formulações de ácido ferúlico revestido e não revestido, assim como a redução do tempo de latência na formulação IN de SLN carregados com ácido ferúlico revestido em relação ao não revestido. Foi apresentada uma maior concentração de ácido ferúlico nos homogeneizados cerebrais dos animais tratados com as formulações SLN, em comparação com os tratados com o fármaco livre.
Anticorpo monoclonal anti-TRAIL Doença de Alzheimer / Ratos machos 3xTg-AD	Nanopartículas poliméricas (PLGA) com anticorpo monoclonal Anti-TRAIL NLC carregadas com anticorpo monoclonal Anti-TRAIL	Foi demonstrada a eficácia de ambas as formulações de nanopartículas (NLC e PLGA) para a veiculação do anticorpo monoclonal anti-TRAIL, assim como a melhoria da eficácia terapêutica do mesmo para a doença de Alzheimer em comparação ao anticorpo administrado em forma livre, sobre as células RAW 264.7
Astaxantina 0.4 mg/Kg Doença de Alzheimer / Ratos albinos machos (150-200g)	Astaxantina carregada em NLC Astaxantina livre em solução	Foram observadas diferenças significativas no tempo de latência para o teste do labirinto de Morris, entre os grupos de ratos com a doença induzida que não receberam tratamento, os que receberam o fármaco em solução e aos quais foi administrado o fármaco veiculado em NLC, apresentando este último grupo um menor tempo de latência.

Tabela 2. Exemplos de estudos farmacodinâmicos com nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) intranasais⁴⁴⁻⁵¹ (cont.).

Fármaco/dose Modelo animal	Formulações testadas	Observações
Carbamazepina 133 μ g/kg Doença de Parkinson / Ratos Wistar (200-220g)	NLC em gel <i>in situ</i> contendo o fármaco (IN) Gel <i>in situ</i> contendo o fármaco (sem NLC) (IN) Suspensão oral com o fármaco livre	Foi demonstrada uma maior capacidade de proteção anticonvulsivante para as formulações de NLC carregados com carbamazepina em gel <i>in situ</i> , em relação às outras formulações testadas, através do modelo MES.
Atomoxetina 0.18mg Doença de Alzheimer Ratos Wistar	NLC em gel <i>in situ</i> Fármaco livre em solução	Foi demonstrado através do teste do labirinto de Morris uma maior eficácia das formulações NLC para a administração do fármaco em relação à formulação de fármaco livre em solução, ambas administradas por via intranasal.
Donepezilo + Astaxantina (0.1 mg/kg e 0.4 mg/kg, respectivamente) Doença de Alzheimer Ratos Wistar (150-200g)	NLC com a associação de fármacos NLC com donepezilo Solução com a associação de fármacos Solução de donepezilo livre	Foi demonstrada a melhor eficácia das formulações NLC com a associação de fármacos em relação às restantes através do teste do labirinto de Morris, assim como pela determinação de acetilcolinesterase e acetilcolina em ratos com a doença de Alzheimer induzida.
Tansinona IIA/0.3 mg/kg Doença de Parkinson / Ratos Wistar (180-220g)	NLC revestidas por quitosano carregadas com fármaco NLC carregadas com fármaco Suspensão de fármaco livre	Foi demonstrada uma melhor eficácia das formulações de NLC carregadas com tansinona e revestidas com quitosano, em relação às restantes formulações testadas para o tratamento da doença de Parkinson, refletida nos testes comportamentais rotenone test, teste de campo livre e teste de natação forçada, assim como na avaliação e quantificação de biomarcadores da doença.

Sakamula *et al.* usaram formulações de NLC para transportar moléculas de alfa-mangostim, o qual é um derivado de xantinas com capacidade citoprotetora demonstrada em diversos modelos de doenças neurodegenerativas. Para este efeito, foram associadas as moléculas de alfa-mangostim com formulações NLC em modelos animais para a doença de Parkinson. A administração oral de ambas as formulações, bem como de alfa-mangostim livre como da mesma molécula veiculada em NLC (ambas na

dosagem de 25mg/kg/48h) demonstrou uma diminuição significativa no déficit motor associado à doença neurodegenerativa, prevendo a redução da expressão da tiroxinase hidroxilase mediada pela rotenona, na substância *nigra* e no *striatum*, e prevendo também a redução de neurónios no mesmo local. Não obstante, apenas a formulação de alfa-mangostim veiculada em NLC previniu significativamente a redução neuronal mediada pela rotenona em ambos locais (*striatum* e no córtex motor), que

se verificou através do decréscimo significativo no nível de malondialdeído (o qual é um indicador da peroxidação lipídica) e um aumento na atividade de ambas enzimas antioxidantes, catalase e superóxido dismutase. Sendo assim, os resultados obtidos demonstraram que os efeitos antioxidantes do alfa-mangostim contra o stress oxidativo foram significativamente melhorados quando encapsulado nas NLC⁴⁴.

Saini *et al.* avaliaram o uso de formulações SLN revestidas por quitosano e contendo ácido ferúlico para o tratamento da doença de Alzheimer. Neste estudo, foi comparado o efeito das formulações de SLN com ácido ferúlico (revestido e não revestidos com quitosano), administradas por via intranasal, com uma solução de fármaco livre administrada por via oral. Foi demonstrada uma maior eficácia da formulação de ácido ferúlico revestido em SLN em comparação com a formulação de fármaco livre administrado tanto por via oral como por via intranasal (das quais esta última foi caracterizada por um declínio maior da atividade cognitiva), tendo sido observada uma atividade cognitiva melhorada com as formulações revestida e não revestida de ácido ferúlico veiculado em SLN. Também nestas últimas formulações, em comparação com a solução oral de fármaco livre, foi significativamente reduzido o tempo de escape de latência no teste do labirinto de Morris, também foi observada uma maior concentração de ácido ferúlico nos homogeneizados de cérebro dos ratos aos quais foram administradas as formulações SLN não-revestidas (5,42 vezes maior do que com o fármaco livre em solução) e ainda maior nas formu-

lações de ácido ferúlico SLN revestidas (6,91 vezes maior)⁴⁵.

Musumeci *et al.* avaliaram a capacidade do anticorpo monoclonal anti-TRAIL (do inglês *Tumor Related Apoptosis Inducing Ligand*), o qual constitui um dos principais fatores de inflamação cerebrais associada à doença de Alzheimer), veiculado através de formulações de nanopartículas poliméricas PLGA (poli-ácido láctico-co-glicólico), assim como através de NLC para atingir o cérebro por via direta nariz-cérebro, com vista a obter sistemas de transporte de fármacos mais eficazes e adequados para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Para isto, foi confirmado em estudos *in vitro* a capacidade do anticorpo anti-TRAIL para evitar os efeitos tóxicos do TRAIL em culturas celulares. De seguida, foram efetuados estudos *in vitro* com ambos os tipos de nanopartículas (PLGA e NLC), em ratos 3xTg-AD, onde ambas as nanopartículas, salientando uma melhor eficácia das NLC, conseguiram atingir o cérebro sendo abundantemente localizadas nas áreas CA2 e CA3 do hipocampo⁴⁶.

Shehata *et al.* desenvolveram formulações NLC contendo astaxantina com o objetivo de testar a sua eficácia para a terapêutica na doença de Alzheimer, em ratos com a doença de Alzheimer induzida. No estudo, foi comparado o tempo de latência dos ratos para o teste do labirinto de Morris, sendo estes divididos em três grupos: ratos com doença de Alzheimer induzida sem tratamento (placebo); ratos submetidos a tratamento com astaxantina em solução intranasal; e tratados com uma formulação intranasal de NLC contendo astaxantina. Os resultados demonstraram uma maior

eficácia nos ratos tratados com astaxantina e, entre estes, foi demonstrada uma maior eficácia das formulações de NLC com astaxantina, obtendo estes uma redução do tempo de latência no quarto dia de tratamento para metade (de $29,50 \pm 2,95$ para $11,17 \pm 2,14$)⁴⁷.

Deshkar *et al.* desenvolveram formulações NLC destinadas à veiculação da carbamazepina (CBZ) na forma de gel *in situ* (NLC-CBZ), com o objetivo de comprovar a capacidade desta para a otimização dos efeitos do fármaco por via IN. Desta forma, foram comparados os resultados obtidos para as formulações NLC-CBZ, com formulações contendo o fármaco em gel *in situ* sem NLC (IN) e com o fármaco em suspensão administrado por via oral. Para a avaliação das formulações desenvolvidas, foi comparada a atividade anticonvulsionante das CBZ-NLC em gel *in situ*, com a das formulações CBZ (não veiculadas em NLC) em gel *in situ* administradas ambas por via intranasal, assim como a da suspensão oral de CBZ, todas carregadas com $133\mu\text{g}/\text{kg}$ de fármaco. Para isto foram empregues ratos Wistar machos (200-220g) saudáveis e livre de convulsões, em quatro grupos, sendo o restante o grupo de controlo, o qual não foi sujeito a nenhum tratamento. Foi usado o modelo MES, no qual os ratos foram submetidos a eletrochoques aplicados na córnea, de 150 mA durante 2 segundos, para os intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 3 e 4h após a administração das formulações, sendo induzida a convulsão, com o objetivo de avaliar a proteção contra convulsões em fase de extensão. Desta forma, segundo os resultados obtidos para as formulações de gel *in situ* CBZ-NLC, de gel *in situ* CBZ

(IN) e para a suspensão oral de CBZ, confirma-se uma maior capacidade de proteção anticonvulsionante para as formulações NLC-CBZ, provavelmente atribuída pela maior permeação do fármaco veiculado nas NLC através da mucosa nasal⁴⁸.

Mohanty *et al.* desenvolveram formulações NLC em gel *in situ* (AXT-NLC) para a veiculação de atomoxetina, com o objetivo de demonstrar a eficácia para a administração destas por via direta nariz-cérebro. Para isto foram efetuados estudos em ratos Wistar, para os quais foi administrada uma dose de fármaco de 0,18 mg. Os ratos foram divididos em um total de 5 grupos, sendo estes: grupo sem tratamento, grupo tratado L-metionina, dois grupos tratados após a demência induzida pela L-metionina com a formulação NLC otimizada (AXT-NLC13-G4) e o outro com a solução do fármaco livre, e no último grupo, ratos tratados unicamente com donepezilo na concentração de $0,1\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, após a indução da demência, em solução IN. Foi efetuado o teste do labirinto aquático de Morris, onde foram avaliadas a capacidade de aprendizagem espacial e memória através do cálculo do tempo de latência de escape (TLE). Desta forma, o tempo no quadrante alvo foi significativamente maior para os ratos nos quais foi administrada a formulação (AXT-NLC13-G4) (46,33s) do que para os que receberam o fármaco livre em solução (35s), e menor do que os grupos tratados com donepezilo (56,33s). Em conclusão, devido aos resultados obtidos pelas formulações AXT-NLC13-G4, em relação à formulação de fármaco livre, foi demonstrada a eficácia da formulação para o direcionamento do fármaco

co para o cérebro, refletido na eficácia deste para o tratamento contra a demência induzida⁴⁹.

Shetata *et al.* desenvolveram formulações NLC contendo donepezilo combinado com astaxantina (DPL/AST-NLC) para a administração destes fármacos por via direta nariz-cérebro. Para a avaliação da eficácia das formulações desenvolvidas, foram realizados estudos *in vivo* em modelos de ratos com doença de Alzheimer induzida. Foram comparados os resultados obtidos no teste do labirinto de Morris, para os grupos de ratos administrados com donepezilo livre em solução (DPL-Sol), assim como a associação de ambos fármacos em solução (DPL/AST-Sol), em comparação com as formulações NLC contendo donepezilo (DPL-NLC) e associado à astaxantina (DPL/AST-NLC), durante 4 dias, na dose de 0,1mg/kg de donepezilo e 0,4mg/kg de astaxantina, e sendo todas as formulações administradas por via IN. No estudo, foi observado que os ratos tratados com as formulações DPL/AST-NLC obtiveram um menor tempo de escape de latência, assim como foi notável a progressão ao longo do tratamento (21.50 ± 5.09 , 16.67 ± 3.67 , 13.33 ± 3.27 , 9.34 ± 2.07 s nos dias 1, 2, 3 e 4 respetivamente), do que os grupos tratados com DPL/AST-Sol (28.50 ± 2.07 , 24.50 ± 1.64 , 21.33 ± 1.21 , 17.58 ± 1.19 s), DPL-Sol (36.17 ± 2.04 , 32.13 ± 6.38 , 28.67 ± 3.72 , 27.15 ± 3.83 s) e DPL-NLC (29.83 ± 2.64 , 25.20 ± 2.37 , 21.67 ± 1.51 , 18.31 ± 2.37 s). Também foi observado um maior tempo de retenção no quadrante alvo por parte do grupo tratado com as formulações DPL/AST-NLC ($31.36a \pm 1.68$ s), em comparação com os grupos tratados com DPL/AST-Sol

($20.09c \pm 1.50$ s), DPL/AST-Sol ($25.82b \pm 2.43$ s) e DPL-NLC ($25.22b \pm 1.98$ s), sendo confirmada assim a maior eficácia para a melhoria da memória e cognição, assim como a eficácia antiamnésica por parte das formulações DPL/AST-NLC desenvolvidas [50]. Por outro lado, no mesmo estudo foi efetuada a determinação de parâmetros bioquímicos, sendo estes os níveis de acetilcolinesterase (AChE) e acetilcolina (ACh). Desta forma, nos grupos de ratos com a doença de Alzheimer induzida, foi observado um aumento nos níveis de AChE (21.86 ± 0.79 , 25.62 ± 2.34 ng/mg) e uma diminuição significativa nos níveis de ACh (7.58 ± 1.08 , 8.38 ± 1.89 pg/mg), do que nos grupos de controlo sem a doença induzida (AChE; 7.48 ± 0.87 , 8.56 ± 0.72 ng/mg, ACh; 23.86 ± 0.82 , 35.38 ± 1.13 pg/mg), no córtex cerebral e no hipocampo. Após a determinação destes parâmetros, foi observado que o grupo tratado com DPL/AST-Sol, obteve menores níveis de AChE, assim como maiores níveis de ACh (AChE 8.13 ± 0.96 , 8.76 ± 1.82 ng/mg, ACh 22.17 ± 1.50 , 32.90 ± 1.61 pg/mg) do que os grupos tratados com DPL-NLC (AChE 14.20 ± 0.88 , 15.45 ± 0.50 ng/mg e ACh 14.84 ± 1.02 , 17.25 ± 1.36 pg/mg), DPL-Sol (AChE; 18.46 ± 0.73 , 22.37 ± 0.79 ng/mg, ACh; 10.98 ± 1.23 , 11.77 ± 1.72 pg/mg) e DPL/AST-Sol (AChE; 13.70 ± 0.78 , 14.29 ± 1.36 ng/mg, ACh 15.32 ± 0.65 , 18.73 ± 0.91 pg/m). Desta forma, foi confirmada a maior eficácia terapêutica do donepezilo, o qual atua como inibidor da AChE, estimulando os recetores nicotínicos da ACh e, prevenindo a degeneração colinérgica relacionada com a função cognitiva⁵⁰.

Hassan *et al.* desenvolveram formulações

de NLC revestidas por quitosano (CS-TAN-NLC) para a administração IN de tansinona IIA. Os estudos *in vivo* foram efetuados em ratos Wistar (180-220g), para os quais foi induzida a doença de Parkinson através da injeção cutânea de rotenona. Foi avaliada a eficácia terapêutica para as formulações de fármaco livre em suspensão (TAN-Sus), as formulações NLC com fármaco (TAN-NLC), assim como as mesmas conjugadas com quitosano (CS-TAN-NLC), sendo todas administradas por via IN, com uma dose equivalente a 0.3mg/kg de fármaco. Depois, para a avaliação da eficácia das formulações, foram efetuados ensaios comportamentais, nomeadamente, o *rotarod test*, o teste de natação forçada assim como o teste de campo aberto, destinados a avaliar a coordenação, equilíbrio, e atividade motora, assim como a observação das manifestações não-motoras da doença de Parkinson. No primeiro teste, foi comprovado pela avaliação do tempo de queda dos ratos, que a única formulação que conseguiu restaurar a função locomotora após a indução da doença foi a CS-TAN-NLC (129.2 ± 21.6 s, sendo que o controlo negativo obteve resultados de 141.7 ± 20.1 s) e, apresentando uma diferença significativa com as formulações TAN-NLC (92.1 ± 5.8 s) e com a TAN-Sus (70.1 ± 2.8 s). Da mesma forma, no teste de campo aberto, os ratos para os quais foi administrada a formulação CS-TAN-NLC apresentaram um menor tempo de latência para o movimento (4 ± 0.4 s) e atravessaram um maior número de quadrantes (67.3 ± 3) do que as formulações TAN-NLC e TAN-Sus (6 ± 0.3 s e 60.1 ± 2.5 quadrantes; 7.4 ± 0.3 s e 51.5 ± 5.4 quadrantes, respetivamente), contrastando assim a maior eficácia das

formulações CS-TAN-NLC para o tratamento dos efeitos da doença de Parkinson induzida. No último teste realizado, novamente as formulações CS-TAN-NLC obtiveram resultados concordantes com a maior eficácia das mesmas, respetivamente ao tempo de atividade e tempo de imobilidade (157 ± 3.8 e 23 ± 3.9 s, respetivamente), em relação as formulações TAN-NLC e TAN-Sus (132.5 ± 2.4 e 40 ± 2.1 s; 140 ± 2.1 e 47.5 ± 2.4 s respetivamente)⁵¹. Foram também avaliados outros parâmetros, como os níveis de dopamina no *striatum*, assim como a determinação de marcadores da inflamação neuronal e do stress oxidativo. Desta forma, no que diz respeito aos níveis de dopamina no cérebro, foi observado que a diminuição dos níveis deste neurotransmissor, associada à indução da doença, foi completamente restabelecida pela administração das formulações CS-TAN-NLC (12.3 ± 0.1 ng/g), com a ausência de diferença significativa em relação ao controlo negativo (12.5 ± 0.25 ng/g) e sendo estes valores 5,3 vezes superior aos obtidos pelo controlo positivo (2.3 ± 0.1 ng/g). Em relação às outras formulações testadas, foi comprovada uma melhoria moderada nos níveis de dopamina (5.1 ± 0.11 e 8.7 ± 0.09 ng/g, para as formulações TAN-Sus e TAN-NLC respetivamente), mas sem atingir a eficácia obtida pelas formulações NLC conjugadas com quitosano⁵¹. Para a avaliação dos marcadores da inflamação, foram determinados os níveis de NF- κ B e de captetina B. Desta forma, foi observado que as formulações TAN-NLC conseguiram diminuir significativamente os níveis de NF- κ B e captetina B (54 e 50%, respetivamente, em comparação com o grupo de controlo). Da mesma forma ocorreu

com as formulações CS-TAN-NLC, as quais demonstraram uma diminuição maior destes níveis (14.3 e 28.4% superiores em relação às formulações TAN-SLN), refletindo assim uma maior eficácia anti-inflamatória do que as formulações não revestidas⁵¹. Por último, foi avaliada a presença de marcadores do stress oxidativo, o qual é um dos principais fatores do desenvolvimento da doença de Parkinson, sendo que é desenvolvido através de um desequilíbrio entre a génese e a degeneração dos radicais livres de oxigénio e, consequentemente, provoca a formação de malondialdeído (MDA). Por outro lado, também a glutatona (GSH) tem um papel determinante na manifestação de neurodegeneração, devido à sua atividade antioxidante, pelo que também foi objeto de análise. Foram avaliados os parâmetros de MDA (cujos níveis estão diretamente relacionados com o aumento da produção de radicais livres de oxigénio), glutatona (pela sua atividade antioxidante), e heme oxigenase-1 (HO-1) (a qual tem um papel antioxidante pela catalisação da conversão de heme para biliverdina, monóxido de carbono e ferro livre, a exposição prolongada da HO-1 esta relacionada com a indução de danificação oxidativa mitocondrial junto com a doutros organelos

subcelulares). Desta forma, os níveis destes parâmetros são alterados pela indução da doença, como observado no grupo de controlo (3.1, e 9.8 vezes maiores para o MDA e HO-1 respetivamente, e -66% no caso da GSH). Os resultados obtidos demonstraram melhorias significativas para a alteração dos níveis destes biomarcadores em relação ao grupo de controlo positivo, nomeadamente para a TAN-Sol: -14% e 61.5% nos níveis de MDA e HO-1 respetivamente e um aumento do 50% nos níveis de GSH. Para as formulações TAN-NLC: -34% e -77% respetivamente ao MDA e HO-1, assim como um aumento do 116.5% nos níveis de GSH. Por último, as formulações revestidas, CS-TAN-NLC obtiveram uma maior eficácia, atingindo uma diminuição de MDA e HO-1 do 48% e 84.6% respetivamente, assim como um aumento nos níveis de GSH do 154.6%⁵¹. Desta forma, pode-se concluir que as formulações CS-TAN-NLC obtiveram uma eficácia significativamente superior à das outras formulações testadas para o direcionamento do fármaco para o cérebro e, consequentemente, para o tratamento da doença de Parkinson, tendo sendo isto refletido nos estudos de avaliação comportamental e na avaliação dos biomarcadores⁵¹.

Tabela 3. Exemplos de estudos *in vivo* com nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) intranasais^{41, 49, 52-55}.

Fármaco / dose	Doença/modelo animal	Formulações testadas	C _{máx} (ng/mL)	DTE (%)	DTP (%)	T _{máx} (min)	AUC
Piribedil / 2mg/kg		SLN intranasais (IN) carregados com fármaco	265.45±55.02	119.89	16.59	30	32488ng/g*min
Doença de Parkinson / Ratos Wistar (240-260g)		Gel in situ IN contendo SLN carregados com fármaco	245.83±33.65	137.54	27.29	30	42046ng/g*min
		Suspensão IN de fármaco	242.43±45.84	39.40	-77.95	30	10394ng/g*min

Tabela 3. Exemplos de estudos *in vivo* com nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) intranasais^{41, 49, 52-55} (cont.).

Fármaco / dose Doença/modelo animal	Formulações testadas	C _{máx} (ng/mL)	DTE (%)	DTP (%)	T _{máx} (min)	AUC
Berberina /5mg/kg Doença de Alzheimer /Ratos Wistar (210-240g)	NLC IN carregados com o fármaco	1033			120	469.403ng/g*min
	Solução IV de fármaco	780	509.2	80.4	45	74.944ng/g*min
	Solução IN de fármaco	748			30	137.275ng/g*min
Rivastigmina/0.178 mg/kg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (150-200g)	SLN IN carregado com o fármaco	73.99±5.66	-	-	40	25.678±56.67ng*h/mL
	Solução IV de fármaco	49.64±5.58	-	-	60	7018.40±20.97ng*h/mL
	Solução IN de fármaco	65.24±3.35	-	-	60	12567.76±13.80 ng*h/mL
Rotigotina / 0.36mg Doença de Parkinson / Ratos Wistar (200-250g)	NLC IN carregados com o fármaco	73.3±6.7	433.03	76.03	120	662.7±26.4ng*h/mL
	NLC IV carregados com o fármaco	38.2±5.3	-	-	120	313.6±36.3ng*h/mL
	NLC oral carregados com o fármaco	17.2±2.5	-	-	120	207.1±19.3ng*h/mL
	Dispersão IN de fármaco livre	39.7±0.3	173.91	59.97	180	329.5±29.3ng*h/mL
Donepezilo / 180 mg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (200-250g)	NLC IN carregados com donepezilo e revestidos por quitosano	218.93±11.62	321.21	74.55	240	2676.63±117.27ng*h/mL
	Solução IN de fármaco livre	149.21±18.42	158.52	36.92	120	1321.20±73.28ng*h/mL
	NLC IV carregados com donepezilo e revestidos com quitosano	117.19±31.25	-	-	120	1109.98±46.37 ng*h/mL
Atomoxetina / 0.18mg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar	Gel <i>in situ</i> IN de NLC carregados com fármaco	173.07±13.02	207.91	51.91	60	1409.58±138.79 ng*h/mL
	NLC IV carregados com fármaco	101.18±9.09			60	871.16±82.95ng*h/mL
	NLC oral carregados com fármaco	96.32±8.00		28.64	60	720.67±86.67ng*h/mL
	Solução IN de fármaco livre	99.70±6.45	140.14		120	786.53±93.86ng*h/mL

Uppuluri *et al.* desenvolveram formulações SLN veiculando piribedil (PDB-SLN) com o objetivo de otimizar a administração do fármaco por via direta nariz-cérebro. Foram realizados estudos *in vivo*, em ratos Wistar machos (240-260g), para a caracterização dos parâmetros farmacocinéticos das formulações PBD-SLN em suspensão (PBD-SLN-Susp), assim como das mesmas na forma de gel *in situ* (PBD-SLN-ISG) os quais foram comparados com os obtidos pela administração do fármaco livre em suspensão, todas por via IN, com uma dose de 2 mg/kg de fármaco. Desta forma, foi observado que apesar de os valores de concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$) serem semelhantes para as três formulações testadas (265.45 ± 55.02 , 245.83 ± 33.65 e 242.43 ± 45.84 ng/mL, respetivamente, para as formulações PBD-SLN-Susp, PBD-SLN-ISG e PBD-Susp), foi observado que as concentrações de fármaco nos ratos submetidos à administração do fármaco em suspensão diminuíram notoriamente após 60 e 240 min, em relação às outras formulações (não foi observada diferença significativa entre as concentrações de fármaco para as formulações PBD-SLN-ISG e PBD-Susp para ambos intervalos de tempo mencionados, esta foi de 3 vezes superior à do fármaco em suspensão para 60 min após a administração e, aproximadamente de 100 ng/g para 240 min após a administração das formulações; e não foi quantificada uma concentração mínima para as formulações do fármaco em suspensão), sendo demonstrada a vantagem das formulações SLN desenvolvidas para a administração prolongada do fármaco. Também é importante destacar que após 360 minutos da ad-

ministração das formulações, no caso das formulações PBD-SLN-Susp, não foi observada uma quantidade de fármaco quantificável, em comparação com as formulações PBD-SLN-ISG, isto devido ao maior tempo de residência conferido pelas formulações em gel *in situ*, o que constitui uma vantagem a ter em conta para a administração prolongada do fármaco. Por outro lado, relativamente aos valores de AUC, foi confirmada a melhoria da biodisponibilidade do fármaco no cérebro por parte das formulações SLN em relação ao fármaco livre em suspensão, sendo destacada a formulação PBD-SLN-ISG a qual obteve uma biodisponibilidade 4 vezes superior à do fármaco em suspensão (32488, 42046, 10394 ng/g*min, respetivamente para as formulações PBD-SLN-Susp, PBD-SLN-ISG e PBD-Susp)⁵².

Abo El-Enin *et al.* desenvolveram formulações NLC contendo berberina (BER-CTS-NLC). Para a avaliação da eficácia da formulação, foram realizados estudos farmacocinéticos em ratos Wistar (210-240g), os quais foram divididos em três grupos. Foi administrada uma dose de 5mg/kg de fármaco, através de formulações do fármaco livre em solução IV (BER-Sol), assim como a mesma BER-Sol por via IN e, no caso do último grupo, a formulação BER-CTS-NLC por via IN. Desta forma, foi observado que a $C_{m\acute{a}x}$ no cérebro obtida pelas formulações BER-CTS-NLC (1033 ng/mL) foi significativamente superior à das formulações de BER-Sol IV e IN (780 e 748 ng/mL respetivamente), assim como também foi determinado que os níveis de fármaco no cérebro obtidos pelas formulações BER-CTS-NLC após 360 minutos da administração foi superior 13.2 e 4.4

vezes para as formulações do fármaco em solução IV e IN, respetivamente. Na mesma linha que os resultados anteriores, os valores da $AUC_{\text{cérebro}} / AUC_{\text{sangue}}$ foram superiores para as formulações NLC (1.22), em comparação com as formulações em solução (0.99 e 0.24, para as vias IV e IN), confirmando assim um melhor transporte do fármaco para o cérebro e uma maior acumulação de fármaco no cérebro pelas formulações NLC. Por último, os elevados valores de DTE e DTP obtidos pelas formulações BER-CTS-NLC (509.2 e 80.4), reforçam a conclusão de um melhor direcionamento de fármaco para o cérebro pelas BER-CTS-NLC⁵³.

Arora *et al.* desenvolveram formulações SLN contendo rivastigmina (RT-SLN) com o objetivo de demonstrar a eficácia desta formulação para o direcionamento do fármaco para o cérebro por via direta nariz-cérebro. Foram realizados estudos farmacocinéticos em ratos Wistar (150-200g), divididos em três grupos, em função da formulação administrada (RT-SLN por via IN, e o fármaco livre em solução IV e IN), todas com uma dose de 0.178 mg/mL. Desta forma, foi demonstrada a eficácia superior das formulações RT-SLN (IN) em relação às restantes. Isto refletido nos valores de $C_{\text{máx}}$ (73.99 ± 5.66 ng/mL para as formulações RT-SLN, e 49.64 ± 5.58 e 65.24 ± 3.35 ng/mL para as formulações do fármaco em solução IV e IN respetivamente), assim como no AUC ($25,678 \pm 56.67$ ng•h/mL nas RT-SLN, $7,018.40 \pm 20.97$ e $12,567.76 \pm 13.80$ ng•h/mL para as soluções IV e IN respetivamente)⁵⁴.

Zafar *et al.* desenvolveram e otimizaram formulações NLC revestidas por quitoso-

sano e carregadas de rotigotina (RT-CH-NLC-OPT) para a sua administração por via direta nariz-cérebro. Foram realizados estudos com ratos albinos Wistar (200-250g) aos quais foi administrada uma dose de fármaco de 0.36mg de todas as formulações testadas. Foi determinado que a biodisponibilidade relativa do RT para administração IN das RT-CH-NLC-OPT foi 3.2 vezes superior do que a suspensão de fármaco livre (RT-Dis). Também a biodisponibilidade absoluta das RT-CH-NLC-OPT foi 2.1 mais elevada do que as mesmas administradas por via IV. A capacidade de direcionamento do fármaco para o cérebro, foi comprovada pela determinação do DTE (422.03%) e DTP (76.03%), ambos superiores aos obtidos pela administração da suspensão de fármaco (DTE 173.91 e DTP 59.97%)⁵⁵.

Yasir *et al.* desenvolveram formulações NLC revestidas com o polímero catiónico quitosano (CH) para avaliar a eficácia destas na veiculação do donepezilo para via *nose-to-brain*. Foram usados ratos Wistar (200-250g) de ambos sexos, divididos em três grupos em função da formulação administrada: DPZ-Sol, DPZ-CH-NLC (IN) e DPZ-CH-NLC (IV), ambas as formulações com uma dose de fármaco de 180 mg. No estudo farmacocinético foi observado relativamente ao $T_{\text{máx}}$ das formulações DPZ-Sol e DPZ-CH-NLCs-OPT2 um intervalo significativamente maior para as formulações NLC (2h e 4h respetivamente), demonstrando uma maior libertação prolongada por parte da formulação de NLC do que o fármaco livre em solução, devidamente às propriedades mucoadesivas do polímero CH adicionado às NLC. Por outro lado, os valores de $C_{\text{máx}}$ para as for-

mulações DPZ-CH-NLC-OPT2 (218.93 ± 11.62 ng) foram significativamente maiores do que as formulações DPZ-Sol e DPZ-CH-NLC-OPT2 IV (149.21 ± 18.42 e 117.19 ± 31.25 ng/mL significativamente). O mesmo aconteceu com a biodisponibilidade, sendo esta 2.02 vezes maior para as formulações e DPZ-CH-NLC-OPT2 do que para as DPZ-Sol (IN) e 2.41 maior do que as formulações DPZ-CH-NLC-OPT2 administradas por via IV. Relativamente ao direcionamento das DPZ-CH-NLC-OPT2, este foi avaliado pela determinação do DTP, o qual demonstrou uma maior eficácia nas formulações NLC administradas por via IN (74.55%) em relação ao fármaco livre administrado em solução. Também o valor de DTE (321.21%) das DPZ-CH-NLC-OPT2 confirma a eficácia para o direcionamento de fármacos destas formulações (IN)⁴¹.

Mohanty *et al.* desenvolveram formulações NLC em gel *in situ* (AXT-NLC) para a veiculação de atomoxetina, com o objetivo de demonstrar a eficácia para a administração destas por via direta nariz-cérebro, assim como a sua capacidade de direcionamento do fármaco para o cérebro, após a administração intranasal. Para isto foram efetuados estudos farmacocinéticos em ratos Wistar aos quais foi administrada uma dose de fármaco de 0.18 mg. Para a determinação farmacocinética, os ratos foram divididos em quatro grupos, sendo que no primeiro grupo foi administrado o fármaco livre em solução (AXT-Sol) por via IN, e nos restantes foram utilizadas as formulações NLC otimizadas (AXT-NLC13-G4), por via IN, IV e oral, respetivamente. Relativamente à concentração máxima de fármaco no cérebro,

foi evidente a melhor veiculação por parte da formulação AXT-NLC13-G4 administrada por via IN (173.07 ± 13.02), em relação à mesma administrada por via oral e IV (96.32 ± 8.00 e 101.18 ± 9.09 , respetivamente) assim como da formulação do fármaco livre em solução administrado por via IN (99.70 ± 6.45), tendo-se verificado o mesmo com a concentração de fármaco presente no cérebro (31.1 ± 3.61) após 0.5h da administração (75.29 ± 4.95 , 17.80 ± 3.47 , 28.09 ± 4.53 e 31.1 ± 3.61 , respetivamente). Através da avaliação do DTP confirmou-se que uma maior fração de fármaco atingiu o bulbo olfatório nas formulações AXT-NLC13-G4 administradas por via IN (51.91%), em comparação com a solução de fármaco livre (28.64%). Também, o valor de DTE para a AXT-NLC13-G4 (207.91%), comparado com a AXT-Sol (140.14%), administradas pela mesma via (IN), confirmou a eficácia da formulação desenvolvida para o direcionamento do fármaco para o cérebro, proporcionando uma maior biodisponibilidade⁴⁹.

CONCLUSÃO

A via *nose-to-brain* apresenta-se como um método não-invasivo, rápido e eficaz para a administração de fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson. Neste campo, as nanopartículas lípicas do tipo SLN e NLC têm sido apresentadas como veículos alternativos às formas farmacêuticas convencionais para a entrega dos fármacos de forma mais eficaz. De acordo com os resultados apresentados em estudos recentes, *in vitro* e *in vivo*, a sua aplicação é promissora. Contudo, até à data, não estão comercializados medicamentos

contendo fármacos encapsulados em SLN ou NLC para o tratamento destas doenças, pelo que são necessárias mais investigações para que, no futuro, seja possível a sua utilização na prática clínica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Unidade de Bio-ciências Moleculares Aplicadas (UCIBIO), que é financiada por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amoah, V., *et al.*, Lantana camara leaf extract ameliorates memory deficit and the neuroinflammation associated with scopolamine-induced Alzheimer's-like cognitive impairment in zebrafish and mice. *Pharm Biol*, 2023. 61(1): p. 825-838.
2. Correia, A.C., *et al.*, Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the blood-brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022. 189: p. 114485.
3. Torres, J., *et al.*, Intranasal Lipid Nanoparticles Containing Bioactive Compounds Obtained from Marine Sources to Manage Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 2023. 16(2): p. 311.
4. Cunha, S., *et al.*, Therapeutic Strategies for Alzheimer's and Parkinson's Diseases by Means of Drug Delivery Systems. *Curr Med Chem*, 2016. 23(31): p. 3618-3631.
5. Cunha, S., *et al.*, Improving Drug Delivery for Alzheimer's Disease Through Nose-to-Brain Delivery Using Nanoemulsions, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and in situ Hydrogels. *Int J Nanomedicine*, 2021. 16: p. 4373-4390.
6. Chu, J.C., *et al.*, Synthesis and biological evaluation of C-4 substituted phenoxazine-bearing hydroxamic acids with potent class II histone deacetylase inhibitory activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023. 38(1): p. 2212326.
7. de Oliveira Junior, E.R., *et al.*, Nasal administration of nanoencapsulated geraniol/ursodeoxycholic acid conjugate: Towards a new approach for the management of Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release*, 2020. 321: p. 540-552.
8. Saha, P., H. Kathuria, and M.M. Pandey, Intranasal nanotherapeutics for brain targeting and clinical studies in Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release*, 2023. 358: p. 293-318.
9. Koeglsperger, T., *et al.*, Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 2023. 18(1): p. 32.
10. Raza, C., R. Anjum, and N.u.A. Shakeel, Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*, 2019. 226: p. 77-90.
11. Zhao, M., *et al.*, Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. *Theranostics*, 2020. 10(3): p. 1355-1372.
12. Pandit, R., L. Chen, and J. Götz, The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020. 165-166: p. 1-14.
13. Campbell, H.K., J.L. Maiers, and K.A. DeMali, Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res*, 2017. 358(1): p. 39-44.

14. Azarmi, M., *et al.*, Transcellular brain drug delivery: A review on recent advancements. *Int J Pharm*, 2020. 586: p. 119582.
15. Alexander, J.J., Blood-brain barrier (BBB) and the complement landscape. *Mol Immunol*, 2018. 102: p. 26-31.
16. Saidijam, M., *et al.*, Efflux proteins at the blood-brain barrier: review and bioinformatics analysis. *Xenobiotica*, 2018. 48(5): p. 506-532.
17. Rinaldi, C., *et al.*, Oxidative Stress and the Neurovascular Unit. 2021. 11(8): p. 767.
18. Battaglia, L., *et al.*, Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018. 15(4): p. 369-378.
19. Costa, C.P., *et al.*, 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): p. 925-940.
20. Bourganis, V., *et al.*, Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018. 128: p. 337-362.
21. Cunha, S., *et al.*, Intranasal lipid nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des*, 2017.
22. Costa, C., *et al.*, Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. *Journal of Controlled Release*, 2019. 295: p. 187-200.
23. Crowe, T.P., *et al.*, Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 2018. 195: p. 44-52.
24. Cunha, S., *et al.*, Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2017. 34(3): p. 257-282.
25. Feng, Y., *et al.*, An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2018. 23(5): p. 1079-1088.
26. Kumar, A., A.N. Pandey, and S.K. Jain, Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv*, 2016. 23(3): p. 681-93.
27. Costa, C.P., *et al.*, Quality by design (QbD) optimization of diazepam-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for nose-to-brain delivery: Toxicological effect of surface charge on human neuronal cells. *Int J Pharm*, 2021. 607: p. 120933.
28. Haider, M., *et al.*, Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics*, 2020. 12(3).
29. Khosa, A., S. Reddi, and R.N. Saha, Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. 103: p. 598-613.
30. Tapeinos, C., M. Battaglini, and G. Ciofani, Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release*, 2017. 264: p. 306-332.
31. Ghasemiyeh, P. and S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci*, 2018. 13(4): p. 288-303.
32. Silva, A.C., *et al.*, Editorial: Applications of Solid Lipid Nanoparticles

(SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): State of the Art. *Curr Pharm Des*, 2017.

33. Garcês, A., *et al.*, Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *Eur J Pharm Sci*, 2018. 112: p. 159-167.

34. Gadhave, D.G. and C.R. Kokare, Nanostructured lipid carriers engineered for intranasal delivery of teriflunomide in multiple sclerosis: optimization and in vivo studies. *Drug Dev Ind Pharm*, 2019. 45(5): p. 839-851.

35. Cunha, S., *et al.*, Double Optimization of Rivastigmine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Nose-to-Brain Delivery Using the Quality by Design (QbD) Approach: Formulation Variables and Instrumental Parameters. *Pharmaceutics*, 2020. 12(7).

36. Trapani, A., *et al.*, Cyto/Biocompatibility of Dopamine Combined with the Antioxidant Grape Seed-Derived Polyphenol Compounds in Solid Lipid Nanoparticles. *Molecules*, 2021. 26(4).

37. Trapani, A., *et al.*, Combined Dopamine and Grape Seed Extract-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Nasal Mucosa Permeation, and Uptake by Olfactory Ensheathing Cells and Neuronal SH-SY5Y Cells. *Pharmaceutics*, 2023. 15(3).

38. Neves, A.R., *et al.*, Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery. *J Biotechnol*, 2021. 331: p. 108-117.

39. Jojo, G.M., *et al.*, 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): p. 1061-1072.

40. Silva, S., *et al.*, Formulation, Characterization and Evaluation against SH-SY5Y Cells of New Tacrine and Tacrine-MAP Loaded with Lipid Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 2020. 10(10).

41. Yasir, M., *et al.*, Nose to brain delivery of donepezil through surface modified NLCs: Formulation development, optimization, and brain targeting study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2022. 75: p. 103631.

42. Ruigrok, M.J. and E.C. de Lange, Emerging Insights for Translational Pharmacokinetic and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies: Towards Prediction of Nose-to-Brain Transport in Humans. *Aaps j*, 2015. 17(3): p. 493-505.

43. Nguyen, T.T. and H.J. Maeng, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intranasal Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics*, 2022. 14(3).

44. Sakamula, R., T. Yata, and W. Thong-Asa, Nanostructure lipid carriers enhance alpha-mangostin neuroprotective efficacy in mice with rotenone-induced neurodegeneration. *Metab Brain Dis*, 2022. 37(5): p. 1465-1476.

45. Saini, S., *et al.*, Systematically designed chitosan-coated solid lipid nanoparticles of ferulic acid for effective management of Alzheimer's disease: A preclinical evidence. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021. 205: p. 111838.

46. Musumeci, T., *et al.*, Intranasal Administration of a TRAIL Neutralizing Monoclonal Antibody Adsorbed in PLGA Nanoparticles and NLC Nanosystems: An In Vivo Study on a Mouse Model

of Alzheimer's Disease. *Biomedicines*, 2022. 10(5).

47. Shehata, M.K., A.A. Ismail, and M.A. Kamel, Nose to Brain Delivery of Astaxanthin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers in Rat Model of Alzheimer's Disease: Preparation, in vitro and in vivo Evaluation. *Int J Nanomedicine*, 2023. 18: p. 1631-1658.

48. Deshkar, S.S., M.S. Jadhav, and S.V. Shirolkar, Development of Carbamazepine Nanostructured Lipid Carrier Loaded Thermosensitive Gel for Intranasal Delivery. *Adv Pharm Bull*, 2021. 11(1): p. 150-162.

49. Mohanty, D., *et al.*, Development of Atomoxetine-Loaded NLC In Situ Gel for Nose-to-Brain Delivery: Optimization, In Vitro, and Preclinical Evaluation. *Pharmaceutics*, 2023. 15(7).

50. Shehata, M.K., A.A. Ismail, and M.A. Kamel, Combined Donepezil with Astaxanthin via Nanostructured Lipid Carriers Effective Delivery to Brain for Alzheimer's Disease in Rat Model. *Int J Nanomedicine*, 2023. 18: p. 4193-4227.

51. Hassan, D.M., *et al.*, Chitosan-coated nanostructured lipid carriers for effective brain delivery of Tanshinone IIA in Parkinson's disease: interplay between nuclear factor-kappa β and cathepsin B. *Drug Deliv Transl Res*, 2023.

52. Uppuluri, C.T., P.R. Ravi, and A.V. Dalvi, Design, optimization and pharmacokinetic evaluation of Piribedil loaded solid lipid nanoparticles dispersed in nasal in situ gelling system for effective management of Parkinson's disease. *Int J Pharm*, 2021. 606: p. 120881.

53. Abo El-Enin, H.A., *et al.*, Lipid Nanocarriers Overlaid with Chitosan for Brain Delivery of Berberine via the Nasal Route. *Pharmaceutics (Basel)*, 2022. 15(3).

54. Arora, D., *et al.*, QbD-based rivastigmine tartrate-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced intranasal delivery to the brain for Alzheimer's therapeutics. *Front Aging Neurosci*, 2022. 14: p. 960246.

55. Zafar, A., *et al.*, Formulation of intranasal surface engineered nanostructured lipid carriers of rotigotine: Full factorial design optimization, in vitro characterization, and pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm*, 2022. 627: p. 122232.