

Juan Miguel Entenza Soage

**Uso de formulações de nanopartículas lipídicas via direta nariz-cérebro no  
tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson: estado da arte**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023



Juan Miguel Entenza Soage

**Uso de formulações de nanopartículas lipídicas via direta nariz-cérebro no  
tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson: estado da arte**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

Juan Miguel Entenza Soage

**Uso de formulações de nanopartículas lipídicas via direta nariz-cérebro no  
tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson: estado da arte**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para obtenção de grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas,  
sob a orientação da Professora Doutora Ana Catarina Silva.

Atesto a originalidade do trabalho,

---

(Juan Miguel Entenza Soage)

## RESUMO

As doenças de Alzheimer e de Parkinson estão atualmente posicionadas como as doenças neurodegenerativas mais prevalentes, constituindo um grande problema de saúde pública. A terapêutica farmacológica para o tratamento destas doenças está significativamente limitada pela dificuldade de os fármacos atingirem o sistema nervoso central (SNC), dadas as múltiplas barreiras físicas e fisiológicas do organismo humano, sendo a barreira hematoencefálica (BHE) a mais relevante na redução da biodisponibilidade dos fármacos.

Neste contexto, a administração intranasal de formulações por via direta nariz-cérebro (*nose-to-brain*), apresenta vantagens, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, que permitem melhorar a atividade farmacológica dos fármacos no local alvo de ação, uma vez que não necessitam de atravessar a BHE. Desta forma, o desenvolvimento de formulações à base de nanossistemas lipídicos, em particular as nanopartículas lipídicas (*solid lipid nanoparticles* - SLN e *nanostructured lipid carriers* - NLC), constitui uma alternativa promissora, sendo que o potencial terapêutico, confirmando por vários estudos, permite aumentar a eficácia dos tratamentos de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e Parkinson. Contudo, até à data não estão comercializados medicamentos contendo SLN ou NLC para o tratamento destas doenças, pelo que são necessárias mais investigações, que incluam ensaios clínicos, para que seja possível a sua comercialização.

**Palavras-chave:** nanopartículas lipídicas, Alzheimer, Parkinson, via direta nariz-cérebro, NLC, SLN.

## **ABSTRACT**

Alzheimer's and Parkinson's diseases currently stand as the most prevalent neurodegenerative conditions, being a major public health challenge. Pharmacological treatment for these diseases faces significant limitations due to the difficulty of drugs in reaching the central nervous system (CNS), given the physical and physiological barriers within the human body, with the blood-brain barrier (BBB) being the most substantial obstacle to achieve high drug bioavailability in the CNS.

Within this context, the direct nose-to-brain administration of formulations presents pharmacokinetic and pharmacodynamic advantages that enhance the pharmacological activity of drugs at their site of action, bypassing the need to cross the BBB. Consequently, the development of lipid-based formulations, particularly solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carries (NLC), emerges as a promising alternative. The therapeutic potential, validated by several studies, holds the promise of improving the efficacy of treatments for neurodegenerative conditions like Alzheimer's and Parkinson's diseases. Nonetheless, medications containing SLN or NLC for treating these conditions have not reached the market, as they need further investigations, including clinical trials.

**Keywords:** lipid nanoparticles, Parkinson disease, Alzheimer's disease, nose-to-brain; NLC, SLN.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de mostrar o meu sincero agradecimento à minha professora orientadora a Dra. Ana Catarina Silva por toda a dedicação e tempo implicados na ajuda à elaboração e conclusão deste trabalho, assim como a sua prontidão e disponibilidade.

Também à minha família, que sempre me ofereceu um apoio e carinho incondicionais, como foram sempre para mim os meus pais e a minha irmã o maior exemplo a seguir, e uma motivação especial em todos os âmbitos. Não poderia ter mais orgulho neles, e é neles que reside a minha força.

Também às pessoas que me acompanharam ao longo deste percurso, e que fizeram que me sentisse como em casa desde o primeiro dia, mesmo dentro de um país e cultura diferentes. Com especial menção aos meus mais chegados amigos, Pinho, Jorge, João, Diogo, Wilson, Bea, Joana, Ruben e Ana. Sempre vou estar agradecido com eles e, quase como uma segunda família terão um lugar no meu coração.

Aos meus amigos que me apoiaram desde a distancia, e que sempre me mantiveram presente apesar de estar longe de casa: Pablo, Erin, Xian, Dunny, Diego, Moi, Marcos, Alba, Lucía, Irene, Ana, Tomás, Alex, Saúl, Sergio, Martina, Simón e David.

Também às equipas da Farmácia Campus São João e do Hospital Escola Fernando Pessoa, pela forma em que me acolheram, e pela sua paciência e dedicação na parte final da minha aprendizagem académica.

Por último, expressar a minha gratidão às pessoas que fizeram parte do meu percurso, direta ou indiretamente, e dentro ou fora da facultade, com especial menção aos amigos do Saloon Bar, onde apesar de não académicas, aprendi muitas lições de vida, assim como recordações que sempre irei guardar com carinho.

Muito obrigado a todos!



## ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
AGRADECIMENTOS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. DESENVOLVIMENTO .....	3
1. Doenças neurodegenerativas mais prevalentes .....	3
1.1 Doença de Alzheimer .....	3
1.2 Doença de Parkinson.....	5
2. Administração de fármacos para o sistema nervoso central .....	7
2.1. Barreiras fisiológicas.....	7
2.2. Estratégias alternativas para o transporte de fármacos.....	9
2.3. Via intranasal.....	10
2.3.1. Anatomofisiologia da cavidade nasal .....	10
2.3.2. Vias de transporte direto nariz-cérebro .....	14
2.4. Fatores que influenciam o transporte e a absorção intranasal de fármacos .....	18
3. Uso de nanopartículas lipídicas para o transporte direto de fármacos via nariz-cérebro .....	22

3.1. Principais características das nanopartículas lipídicas .....	22
3.1.1. Solid lipid nanoparticles .....	23
3.2.2. Nanostructured lipid carriers .....	25
3.2. Requisitos das nanopartículas lipídicas para a administração intranasal de fármacos .....	26
3.3. Estudos in vitro com formulações intranasais de SLN e NLC.....	27
3.4. Estudos in vivo com formulações intranasais de SLN e NLC .....	31
III. CONCLUSÃO.....	50
IV. BIBLIOGRAFIA.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da anatomia da cavidade nasal. ....	12
Figura 2. Estrutura celular do bulbo e epitélio olfatórios (adaptado de (Costa <i>et al.</i> , 2021b)). ....	14
Figura 3. Vias de transporte de fármacos após a administração intranasal (adaptado de (Costa <i>et al.</i> , 2021b)). ....	17
Figura 4. Esquema representativo das diferenças estruturais das SLN e NLC (adaptado de (Pardeike <i>et al.</i> , 2009)). ....	23
Figura 5. Representação esquemática dos diferentes modelos ou tipos de SLN. Tipo I SLN de matriz homogénea; Tipo II SLN de drug-enriched shell model; SLN de drug-enriched core model Tipo III (adaptado de (Viegas <i>et al.</i> , 2023)). ....	24
Figura 6. Representação esquemática dos diferentes modelos ou tipos de NLC. Tipo cristal imperfeito (Tipo I); Tipo amorfa (Tipo II); NLC múltiplo (Tipo III) (adaptado de (Viegas <i>et al.</i> , 2023)). ....	26

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de estudos in vitro com formulações de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) para via intranasal contendo fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer e de Parkinson.....	28
Tabela 2. Exemplos de estudos farmacodinâmicos com formulações de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) para via intranasal contendo fármacos usados no tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson. ....	35
Tabela 3. Exemplos de estudos in vivo com formulações de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) para via intranasal contendo fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer e de Parkinson.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina.

ACh – Acetilcolina (do inglês *Acetylcholine*).

AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *Acetylcholinesterase*).

ATP – Adenosina Trifosfato.

AUC – Área abaixo da curva (do inglês *Area Under the Curve*).

BCRP - proteína de resistência ao cancro da mama (do inglês *breast cancer resistance protein*).

BHE – Barreira Hematoencefálica.

COMT - catecol-O-metiltransferase.

DA – Dopamina.

DL50 – Dose letal 50.

DTE – percentagem da eficiência de direcionamento (do inglês *Targeting efficiency percentage*).

DTP – percentagem de transporte direto de fármaco (do inglês *nose-to-brain direct transport percentage*).

GRAS – Geralmente reconhecido como seguro (do inglês *Generally Recognized As Safe*).

GSE – Extrato de semente de uva (do inglês *Grape seed extract*)

GSH – Glutationa.

hCMEC – células humanas do endotélio microvascular cardíaco (do Inglês *Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells*).

HO-1 – Heme oxigenase-1.

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta.

IN – Via Intranasal.

IV – Via Intravenosa.

LCR – Líquido cefalorraquidiano.

LDH – Lactato desidrogenase (do inglês *Lactate dehydrogenase*).

MAO-B – Monoamina Oxidase B.

MDA – Malondialdeído.

MRPs – do inglês *Multidrug resistance proteins*.

MWM – Labirinto aquático de Morris (do Inglês *Morris water navigation task*).

NLC – Vetores lipídicos nanoestruturados (do inglês *Nanostructured lipid carriers*).

NMDA – N-metil-D-aspaertato.

OEC – Células olfativas envainhadas (do Inglês *Olfactory ensheathing cells*).

PDI – Índice de polidispersão.

PEG – Polietilenoglicol.

P-gp – Glicoproteína P (do Inglês *P-glycoprotein*).

PLGA – Políácido láctico co-glicólico (do ingles *poly lactic-co-glycolic acid*).

SLN – Nanopartículas de lípidos sólidos (do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*).

SNC – Sistema Nervoso Central.

SRE – Sistema Reticulo Endotelial.

TLE – Tempo de latência de escape.

TNF- $\alpha$  – Fator necrótico tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor alfa*).

TRAIL – Ligando relacionado com a apoptose induzida pelo TNF (do inglês TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand).

ZP - Potencial zeta.

## I. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aparecimento e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas tem sido um grave problema de saúde pública. Atingindo um terço da população mundial, estima-se que com o aumento da esperança média de vida e o envelhecimento da sociedade, este número continuará a aumentar. Neste sentido, os tratamentos das doenças neurodegenerativas, enfrentam dificuldades na eficácia terapêutica resultantes da farmacocinética ou farmacodinâmica dos fármacos. Desta forma, o desenvolvimento de vias de administração alternativas, que permitam aumentar a quantidade de fármaco que atinge o local de ação, tem captado a atenção de diversos investigadores que procuram melhorar o tratamento de doenças neurodegenerativas, em particular as doenças de Alzheimer e de Parkinson. Neste contexto, a via de administração direta nariz-cérebro (*nose-to-brain*) apresenta um potencial significativo, uma vez que, para além de não necessitar de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), o que permite a aumentar biodisponibilidade dos fármacos no local de ação, permite a utilização de sistemas de entrega alternativos, nomeadamente os nanossistemas lipídicos, com maior especificidade e seletividade para o local de ação (Amoah *et al.*, 2023).

Na primeira parte do trabalho, é apresentada a informação necessária para a compreensão dos capítulos seguintes, nomeadamente a descrição da anatomofisiologia da cavidade nasal, com informações sobre a BHE e os mecanismos relevantes para a administração de fármacos por via direta nariz-cérebro, seguidos da descrição de algumas particularidades desta via de administração. Na segunda parte do trabalho, são descritas as principais características das nanopartículas lipídicas, nomeadamente, as nanopartículas de lípidos sólidos (*solid lipid nanoparticles – SLN*) e os vetores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers – NLC*), juntamente com os requisitos das formulações nasais. De seguida e, 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, com o objetivo de efetuar uma revisão do estado da arte desta terapêutica em desenvolvimento.

Relativamente à metodologia usada na realização deste trabalho, foi efetuada a pesquisa bibliográfica de artigos científicos, publicados num intervalo temporal compreendido entre 2002 e 2023, usando como palavras-chave “*lipid nanoparticles*”, “*nose-to-brain*”, “NLC”, “SLN”, “Alzheimer” e “Parkinson”. Os principais motores de busca usados foram a *Pubmed*, o *Science Direct* e o Google Académico, sendo estas bases de dados escolhidas pela credibilidade das suas publicações científicas, atualidade e facilidade de pesquisa. Os critérios utilizados na seleção da informação foram priorizados em função do interesse e importância em relação ao tema do trabalho, e foi limitado o idioma da pesquisa apenas para os conteúdos apresentados em inglês, espanhol e português.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. Doenças neurodegenerativas mais prevalentes

#### 1.1 Doença de Alzheimer

O Alzheimer é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes ao nível mundial, a qual está associada à demência severa. Representa um problema para a saúde pública, visto que atualmente não existe cura para esta doença (Amoah *et al.*, 2023).

A doença de Alzheimer é, numa fase inicial, caracterizada pela perda de memória a curto prazo a qual deriva num défice maior devido aos danos neuronais. Estima-se que em 2050 131.5 milhões de pessoas sofram desta doença, sendo que o número de casos desde 2015 está progressivamente a aumentar. Apesar de atualmente o mecanismo patológico da doença ainda não estar totalmente esclarecido, é possível inferir que acumulação de *misfolded tau proteins* ou proteínas de conformação tóxica, favorecem a formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, placas senis extracelulares, perda neuronal e ativação da microglia. 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, perda sináptica e atrofia cerebral difusa. Falando especificamente nos mecanismos de neuropatogénese, estes são (Amoah *et al.*, 2023; Chu *et al.*, 2023):

- Placas de beta-amiloide: são agregados anormais 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. Sendo assim, a formação de placas de beta-amiloide é considerada um dos marcadores patológicos da doença de Alzheimer.

Emaranhados 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 emaranhados neurofibrilares. Desta forma, estes afetam a estrutura e função das células nervosas, contribuindo para a disfunção neuronal e perda da conectividade sináptica.

- Perda neuronal e atrofia: a progressão da doença de Alzheimer está associada a uma acentuada perda de neurónios e a uma significativa atrofia cerebral. Devido a esta degeneração neuronal, as áreas do cérebro envolvidas na memória e nas funções cognitivas apresentam uma diminuição notável no seu volume. Também a perda neuronal esta associada à acumulação de placas de beta-amiloide assim como à formação de emaranhados neurofibrilares.
- 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 Alzheimer ela torna-se crónica, e pode contribuir para o dano neuronal e a progressão da doença.

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, por meio da combinação de tratamentos farmacológicos e não farmacológicos. A terapia farmacológica consiste na monoterapia a longo prazo de inibidores da acetilcolinesterase ou combinação dual destes com inibidores dos antagonistas dos recetores da N-metil-D-aspartato (NMDA), com vista a melhorar a função cognitiva e aliviar alguns dos sintomas associados à doença. A administração destes fármacos é efetuada por via oral e/ou transdérmica, o que faz com que estes estejam suscetíveis aos processos de degradação metabólica, ou barreiras fisiológicas, como a BHE, que tendem a dificultar a sua biodisponibilidade no sistema nervoso central (SNC) (Amoah *et al.*, 2023; Chu *et al.*, 2023).

Relativamente aos inibidores da colinesterase, este grupo de fármacos atua aumentando os níveis de acetilcolina no cérebro, através da inibição da sua quebra pela enzima colinesterase (a acetilcolina é um neurotransmissor importante envolvido na memória e na função cognitiva, sendo que a diminuição dos seus níveis no cérebro está relacionada com o desenvolvimento e o agravamento dos sintomas da doença de Alzheimer). Entre os inibidores da colinesterase mais utilizados encontram-se o donepezilo (utilizado no tratamento dos sintomas de demência, na doença de Alzheimer ligeira a moderadamente grave) a rivastigmina (utilizada em casos de Alzheimer leve a moderado, ajudando na função cognitiva e na memória) e a galantamina (também ajudando a melhorar a função cognitiva e a retardar a progressão dos restantes sintomas relacionados com a doença) (Chopade *et al.*, 2023).

Os antagonistas do recetor de NMDA regulam os níveis de glutamato no cérebro e, uma vez que este é um neurotransmissor que pode ser tóxico quando presente em elevadas quantidades no cérebro, evitam desta forma o dano neuronal associado à doença de Alzheimer. Entre os fármacos antagonistas do recetor de NMDA mais utilizados destaca-se a memantina, a qual atua bloqueando os recetores de NMDA, regulando os níveis de glutamato e protegendo as células neuronais. Este fármaco é habitualmente utilizado em doentes com Alzheimer moderado a grave (Chopade *et al.*, 2023).

## **1.2 Doença de Parkinson**

O Parkinson é uma doença caracterizada pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância negra 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. Dentro dos mecanismos fisiopatológicos da doença, destacam-se (Raza *et al.*, 2019; de Oliveira Junior *et al.*, 2020; Koeglsperger *et al.*, 2023; Saha *et al.*, 2023):

- Disfunção mitocondrial que resulta numa menor produção de ATP, assim como um aumento na génese de radicais livres.

- Stress oxidativo que contribui, juntamente com a disfunção mitocondrial, para o processo de morte neuronal, assim como para a agregação de proteínas como a  $\alpha$ -sinucleína, as quais contribuem para a formação dos corpos de Lewis.
- Inflamação neurogénica, que 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- $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).
- Agregação de proteínas, como a  $\alpha$ -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 e não motores, assim como retardar a progressão da doença, pois não existe uma cura definitiva para a doença. As principais linhas de escolha de terapêutica farmacológica são (Weintraub *et al.*, 2022; Chopade *et al.*, 2023; Saha *et al.*, 2023):

- Levodopa: constitui o fármaco mais eficaz para o tratamento da doença de Parkinson. É um precursor da dopamina, um neurotransmissor cujos níveis estão diminuídos nos doentes de Parkinson. A levodopa atravessa a BHE e é convertida em dopamina no cérebro, onde contribui para a melhoria dos sintomas motores, como tremores e rigidez muscular. Atualmente, este fármaco é utilizado através de diferentes formas farmacêuticas, incluindo comprimidos de libertação imediata e prolongada, sendo que a libertação prolongada permite um controlo mais estável dos níveis de dopamina no cérebro, reduzindo a ocorrência de flutuações motoras e prolongando o efeito terapêutico.
- Agonistas dopaminérgicos: mimetizam a ação da dopamina no cérebro, estimulando os seus recetores. Podem ser utilizados em simultâneo com a levodopa ou como monoterapia inicial nas primeiras fases da doença. Atualmente, entre os agonistas dopaminérgicos disponíveis encontram-se o pramipexol, ropinirol e rotigotina. Estas moléculas são habitualmente administradas na forma de comprimidos, adesivos transdérmicos ou formas farmacêuticas de libertação prolongada.

- Inibidores da monoamina oxidase-B (MAO-B): atuam inibindo a enzima MAO-B que é responsável pela degradação da dopamina no cérebro e, desta forma, contribui para aumentar os níveis de dopamina.

A rasagilina e a selegilina são os inibidores da MAO-B mais amplamente utilizados. São frequentemente administrados em terapia conjunta com a levodopa, com vista a prolongar os efeitos terapêuticos e a reduzir a necessidade de administrar doses mais elevadas de levodopa.

- Inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT): são usados em conjunto com a levodopa para prolongar a ação da dopamina e melhorar o controlo dos sintomas. Entre os mais utilizados no tratamento do Parkinson encontram-se a entacapona e tolcapona, os quais atuam impedindo a degradação de levodopa no intestino e no cérebro, aumentando indiretamente a biodisponibilidade da dopamina no SNC.

- Amantadina: é um fármaco com propriedades antivirais que apresenta efeitos sobre a dopamina no cérebro. É utilizado principalmente para o tratamento de sintomas motores leves a moderados do Parkinson, nas fases iniciais da doença.

Apesar de numerosas terapias se direcionarem para conseguir prevenir ou deter os sintomas motores causados pela deficiência de dopamina, nenhuma até hoje o conseguiu realizar notavelmente (de Oliveira Junior *et al.*, 2020).

## **2. Administração de fármacos para o sistema nervoso central**

### **2.1. Barreiras fisiológicas**

As doenças neurodegenerativas anteriormente referidas constituem um grave problema de saúde pública, e ambas as terapias de tratamento estão muito limitadas no que diz respeito ao acesso dos fármacos ao local alvo da ação, sendo necessário o desenvolvimento de novos veículos e novas vias de administração que consigam uma boa biodisponibilidade dos fármacos no SNC. Desta forma, o desenvolvimento de formulações para a administração de fármacos pela via direta nariz-cérebro, de forma eficaz e segura, surge como alternativa promissora no tratamento destas doenças.

Um dos principais obstáculos para o tratamento das doenças neurodegenerativas é a dificuldade dos fármacos atravessarem a BHE, que consiste numa barreira funcional 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 microglia (Zhao *et al.*, 2020).

Entre as funções da BHE destacam-se (Pandit *et al.*, 2020):

(1) 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.

(2) 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.

(3) Metabolização e/ou modificação de elementos sanguíneos do sangue para o tecido nervoso e vice-versa.

Com efeito, a BHE apresenta diferentes mecanismos fisiológicos que dificultam a passagem de compostos para o cérebro:

(1) Barreira paracelular, formada pelas *tight junctions* e *aderent junctions*, a qual constitui complexos proteicos formados entre duas células que conferem impermeabilidade e limitam a difusão passiva de fármacos para o SNC. Apenas substâncias lipofílicas e pequenas moléculas hidrófilas são capazes de atingir o cérebro (Campbell *et al.*, 2017; Pandit *et al.*, 2020).

(2) Barreira transcelular, onde a atividade de endocitose é significativamente menor do que noutras regiões do cérebro e, sendo que este processo contribui para a passagem dos fármacos para a BHE, esta ver-se-á também diminuída (Azarmi *et al.*, 2020).

(3) Barreira enzimática: as células da BHE possuem uma forte capacidade metabólica, apresentando uma expressão significativa de peptidases, fosfatases, nucleotidases, esterases e enzimas do citocromo P450, o que promove a capacidade de degradação de fármacos (Alexander, 2018).

(4) Barreira imunológica: a microglia, os mastócitos e os macrófagos presentes formam uma barreira imunológica que irá acelerar o processo de *clearance* dos fármacos (Alexander, 2018).

(5) As proteínas de efluxo, como os transportadores ATP-dependentes (P-gp, BCRP, 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 (Saidijam *et al.*, 2018; Rinaldi *et al.*, 2021) .

## **2.2. 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 sistemas coloidais administrados via intravenosa (IV). No entanto, estes sistemas estão limitados pela opsonização e consequente captura do fármaco pelas células do sistema reticuloendotelial (SRE). Para evitar ou minimizar este mecanismo de eliminação, pode ser realizada a funcionalização dos sistemas, a qual consiste na alteração da sua superfície através da ligação de moléculas (por exemplo, o polietilenoglicol – PEG) que fazem com que estes se tornem invisíveis aos macrófagos do SRE. Podem ainda ser ligadas moléculas (por exemplo, anticorpos monoclonais que se ligam especificamente aos recetores das células-alvo) que promovem o direcionamento dos sistemas para o local alvo da ação (Battaglia *et al.*, 2018). Também podem ser usados métodos invasivos, como a aplicação de formulações por via trans-cranial, ou a interrupção 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 terapêutica (Pandit *et al.*, 2020).

Recentemente, o uso de formulações por via intranasal, considerado como uma das opções mais viáveis e vantajosas para a administração de fármacos para o SNC, permite o transporte direto de fármacos para o cérebro, evitando a passagem pela BHE (Battaglia *et al.*, 2018).

### **2.3. Via intranasal**

A via intranasal apresenta numerosas vantagens para a administração de fármacos para o SNC, sendo este um método não-invasivo, o qual permite uma elevada biodisponibilidade dos fármacos administrados devido ao elevado fluxo sanguíneo e à elevada superfície de absorção da mucosa nasal, que permite a rápida absorção e uma consequente maior rapidez do efeito farmacológico. Além disso, esta via também permite evitar o efeito de primeira passagem hepática dos fármacos e, como vantagem sobre outras vias, como a via IV, apresenta uma maior facilidade de aplicação. No entanto, é preciso ter em conta outros fatores que poderão 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 absorção (Costa *et al.*, 2021b).

#### **2.3.1. Anatomofisiologia da cavidade nasal**

A cavidade nasal pode ser dividida em duas cavidades iguais, separadas pelo septo nasal (Figura 1). Cada uma destas cavidades está dividida em vestíbulo nasal (*atrium*), região respiratória, e região olfatória. A parte frontal desta cavidade é constituída pelo vestíbulo nasal, o qual constitui a primeira linha de defesa à entrada de agentes patogénicos no organismo, sendo a região menos permeável aos fármacos devido à falta de vascularização, baixa superfície de contacto e presença de muco e cílios nasais (os quais filtram as partículas maiores presentes no ar inspirado), pelo que não tem grande interesse para o estudo de administração de fármacos por via intranasal. Esta área da cavidade nasal é constituída por epitélio escamoso e contém também glândulas sebáceas e sudoríparas (Costa *et al.*, 2021b).

A região respiratória, a qual ocupa a maior área da cavidade nasal, é a mais vascularizada e permeável, sendo assim de maior relevância para o estudo da administração de fármacos. Esta área é formada por epitélio respiratório, os cornetos e as vilosidades (as quais estão cobertas pela mucosa nasal), e possui na secção inferior uns pequenos orifícios que conectam os seios paranasais. Relativamente ao epitélio respiratório, o qual é caracterizado como epitélio colunar 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 colunares ciliadas e não-ciliadas, sendo que as ciliadas (as quais ocupam 15-20% da quantidade total de células respiratórias), irão movimentar-se coordenadamente conduzindo o muco desde a parte anterior da cavidade nasal para a faringe, onde é eliminado através do trato gastrointestinal pelo processo de *clearance* mucociliar, através do qual se confere a proteção do trato respiratório das substâncias exógenas prejudiciais que ficam retidas no muco (Bourganis *et al.*, 2018).

A lâmina própria, situada sobre a região respiratória, é responsável pela absorção dos fármacos, devido à presença elevada de capilares, vasos sanguíneos e nervos; e pela inervação das ramificações do nervo trigêmeo, respetivamente as ramificações oftálmica e maxilar, a partir das quais forma uma via direta de entrada para o SNC (Cunha *et al.*, 2017a).

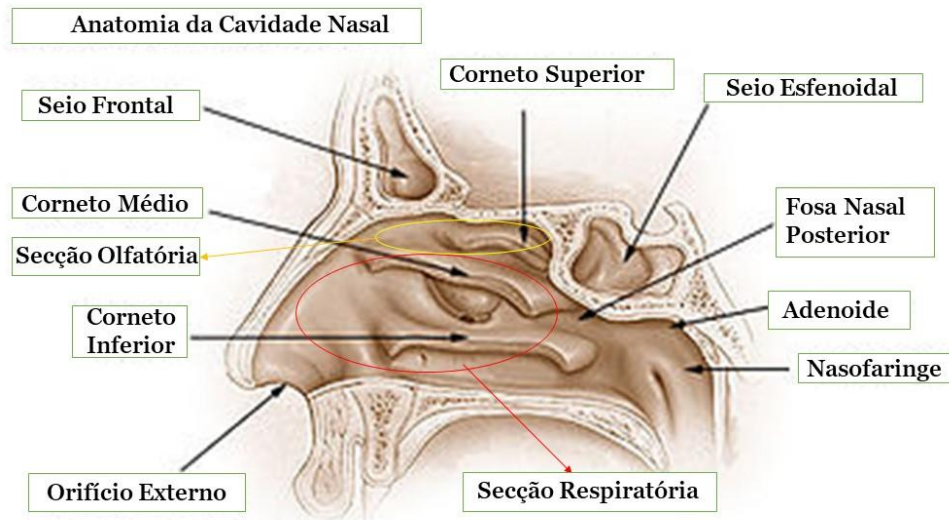


Figura 1. Esquema da anatomia da cavidade nasal.

A região olfatória, a qual está localizada na secção superior da cavidade nasal, abaixo da placa cribiforme, 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 que permitem o sentido do olfato. A mucosa olfatória inclui o epitélio olfatório, tecido conjuntivo, e neurónios olfatórios (Figura 2). 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 (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 feromonas (Costa *et al.*, 2019).

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 (Bourganis *et al.*, 2018; Crowe *et al.*, 2018):

(1) Células de suporte: atravessam o epitélio e terminam nas microvilosidades da porção luminal, as quais contribuem para a secreção de muco, isolam eletricamente as células recetoras vizinhas e cooperam na regulação e concentração de potássio.

(2) Células sensoriais recetoras: consistem em pequenos neurónios bipolares que enviam uma dendrite para a superfície da mucosa e um axónio que termina no bolbo olfativo. A dendrite termina numa dilatação conhecida como vesícula olfatória, e de cada uma delas são originados entre 5 e 20 cílios que são inseridos dentro do muco que cobre o epitélio. Estes cílios não possuem a proteína motora dineína, pelo que não apresentam motilidade intrínseca. Também estes cílios irão conferir uma grande amplificação da membrana quimiorrecetora, com a qual interagem as moléculas responsáveis pelos estímulos olfativos ao aumentar a superfície de contacto desta membrana. Relativamente às células da glia olfativas, estas formam a bainha dos neurónios olfativos primários, das quais os axónios se agrupam em aproximadamente 20 fascículos. Estes fascículos posteriormente irão formar os nervos olfatórios que se cruzam, sem ramificações, na lâmina cribiforme do osso etmoide para entrar no bolbo olfatório, convergindo numa única célula pós-sináptica do bolbo, entre 100 e 1000 fibras aferentes primárias.

(3) Células basais: estão localizadas junto à membrana basal e a principal função consiste em servir como células-mãe das células sensoriais olfatórias, sendo fundamentais na renovação celular, uma vez que o ciclo de desgaste das células sensoriais olfatórias dura aproximadamente 3 meses.

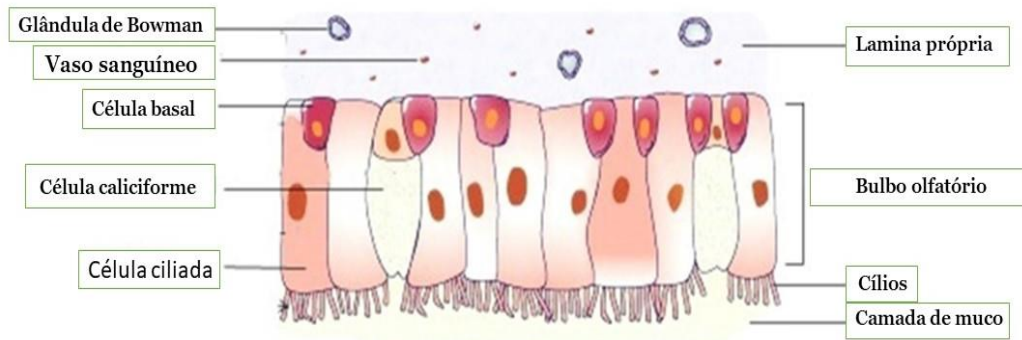


Figura 2. Estrutura celular do bulbo e epitélio olfatórios (adaptado de (Costa *et al.*, 2021b)).

### 2.3.2. 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 cribriforme, enquanto o segundo, o qual inerva tanto o epitélio respiratório como o olfatório, atinge o SNC através da placa cribriforme pelas ramificações dos nervos maxilar e oftálmico. Desta forma, existem diferentes formas dos fármacos atingirem diretamente o SNC após administração intranasal (Figura 3):

Via 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 cérebro (Bourganis *et al.*, 2018).

Os fármacos que interagem com o epitélio olfatório ciliado são rapidamente transportados para o SNC, passando através da placa cribriforme, 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 cerebral (Cunha *et al.*, 2021).

- Via 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 LCR (Cunha *et al.*, 2017b).
- Via sistémica ou indireta: a cavidade nasal recebe sangue da artéria carótida pelas ramificações maxilar, facial e oftálmica, o que faz com que seja esta 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, uma certa quantidade de fármaco atingirá o SNC, a qual irá variar em função das características físico-químicas da molécula. Além disso, esta passagem será 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 para 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 transferência de fármacos do sangue para o cérebro pode alternativamente ocorrer através do plexo coroide, pelo qual o fármaco acede ao LCR de forma unidirecional e a uma taxa inversamente proporcional ao seu peso molecular e pode difundir para o cérebro, embora em uma menor quantidade devido ao lento processo de difusão e permeação (Cunha *et al.*, 2017b; Bourganis *et al.*, 2018).

- Via fluídos linfáticos e espinais: a área submucosa da região olfatória (lâmina própria) apresenta diversas vias extracelulares para o transporte de fármaco. Sendo assim, o fármaco poderá ser transferido por via intracelular associado com as ramificações do nervo olfatório, desde a lâmina própria e através da placa cribriforme, para o bulbo olfatório. Alternativamente, o fármaco poderá passar desde a lâmina própria por absorção para os vasos olfatórios, como referido na via sistêmica; ou também para os vasos linfáticos olfativos, os quais drenam para os gânglios linfáticos cervicais profundos no pescoço (Bourganis *et al.*, 2018).

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 contem 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 (Cunha *et al.*, 2017b; Feng *et al.*, 2018)

Devido à existência de duas vias diretas distintas, na maior parte dos casos, é difícil saber se o fármaco administrado atinge o SNC através da via do nervo trigêmeo, da via olfatória ou de ambas, pois como referido, uma porção do nervo trigêmeo entra para o bulbo olfatório e atravessa a placa cribriforme, de forma adjacente à da via olfatória (Cunha *et al.*, 2017b).

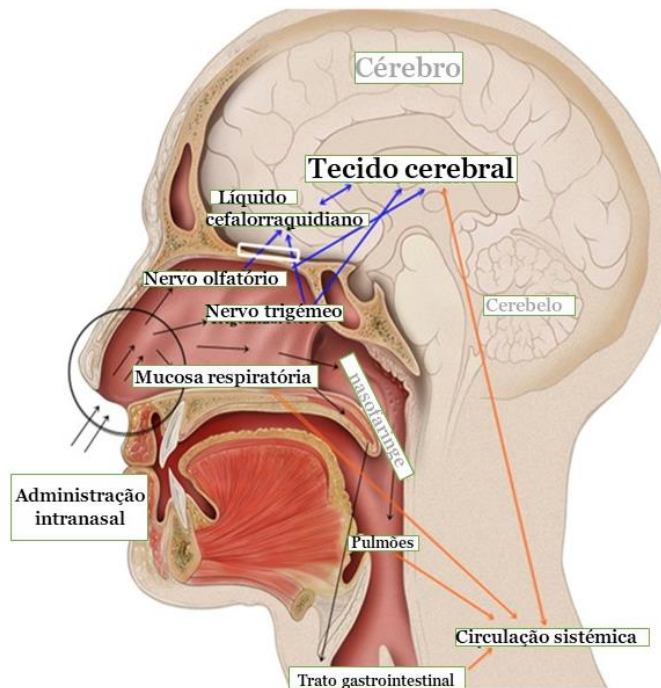


Figura 3. Vias de transporte de fármacos após a administração intranasal (adaptado de (Costa *et al.*, 2021b)).

Ao nível celular, o fármaco poderá atravessar os nervos para o SNC, via intraneuronal ou extraneuronal. A via intraneuronal requer a passagem através dos axônios neuronais, processo que é extremamente lento, podendo demorar horas ou até dias para atingir o local alvo de ação do fármaco. Por outro lado, a via extraneuronal proporciona um transporte muito mais rápido, podendo ocorrer via paracelular ou transcelular, demorando poucos minutos para o fármaco 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 (Bourganis *et al.*, 2018; Crowe *et al.*, 2018).

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 lipofilia, 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 predominantes, sendo a via extracelular a mais rápida, como se verificou pelos curtos intervalos entre a administração e a deteção do fármaco no cérebro. A via sistémica está associada a diversas desvantagens, tais como os efeitos adversos relacionados com a exposição do fármaco em locais não-alvo da ação, os curtos tempos de semivida dos fármacos que originam uma farmacocinética desfavorável, e a incapacidade de algumas moléculas de fármaco para atravessar a BHE, entre outros. Uma das formas de contornar este problema é através da promoção do direcionamento dos fármacos (*targeting*) para o epitélio olfativo, após a administração intranasal (Bourganis *et al.*, 2018).

#### **2.4. Fatores que influenciam o transporte e a absorção intranasal de fármacos**

A via intranasal requer o uso de formulações que sobreponham a absorção dos fármacos aos efeitos dos mecanismos fisiológicos de defesa da cavidade nasal, tais como a *clearance* mucociliar ou a degradação enzimática, que originam eliminação a degradação ou do fármaco, respetivamente, impedindo a sua absorção nasal. É por isso importante referir que se deve ter em conta as características físico-químicas específicas das formulações administradas via intranasal, entre as quais se destacam (Kumar *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2017a; Cunha *et al.*, 2017b; Costa *et al.*, 2019):

- 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, conseqüentemente, 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. Sendo assim, devido ao muco nasal ter um elevado teor em água, as moléculas com um elevado grau de lipofilia não se conseguem dissolver no muco e, conseqüentemente, 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 processo 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 influi de forma direta e considerável 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, conseqüentemente, a absorção de fármaco será maior. Deve ainda ter-se 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 P<sub>450</sub>), 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 também influenciado pela atividade de sistemas transportadores, os quais podem influenciar a biodisponibilidade dos fármacos administrados por via direta nariz-cérebro, 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 (Cunha *et al.*, 2017b):

- 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.

### **3. Uso de nanopartículas lipídicas para o transporte direto de fármacos via nariz-cérebro**

#### **3.1. Principais características das nanopartículas lipídicas**

O conceito de nanopartículas lipídicas refere-se a um tipo de dispersões coloidais de partículas sólidas, de tamanhos entre 1 e 1000 nm, contendo 0.1 a 30% de lípido(s), estabilizadas por um ou dois agentes emulsivos, com uma concentração entre 0.5 e 5%. As nanopartículas lipídicas possuem a capacidade de encapsular fármacos lipófilos, aumentando a sua biodisponibilidade, protegem-nos das degradações, permitem a sua libertação prolongada e originam uma baixa ou ausente toxicidade nas formulações finais. Estas nanopartículas permitem ainda a funcionalização para promover o direcionamento para os locais alvo da ação (ou *targeting*) (Haider *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021a).

Relativamente aos tipos de nanopartículas lipídicas, as SLN constituem a primeira geração, sendo formadas por um único lípido sólido que origina uma estrutura interna altamente organizada (Figura 4) (Khosa *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2021a).

Existe também um segundo tipo de nanopartículas lipídicas conhecido como NLC, as quais são constituídas 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 processo de armazenamento. Este é o principal motivo que faz com que atualmente as investigações se foquem neste último tipo de nanopartículas lipídicas (Tapeinos *et al.*, 2017; Ghasemiyeh *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2021).

Não obstante, têm sido descritas preocupações sobre a instabilidade física e segurança das formulações de SLN e de NLC. Para ultrapassar estas limitações, a estabilidade das formulações poderá ser otimizada modificando a temperatura de armazenamento. Também dentro das limitações das nanopartículas lipídicas, está descrito o risco de estas formarem agregados durante o período de armazenamento, o que provoca instabilidade das formulações, reduzindo o seu potencial para transportar (Haider *et al.*, 2020).

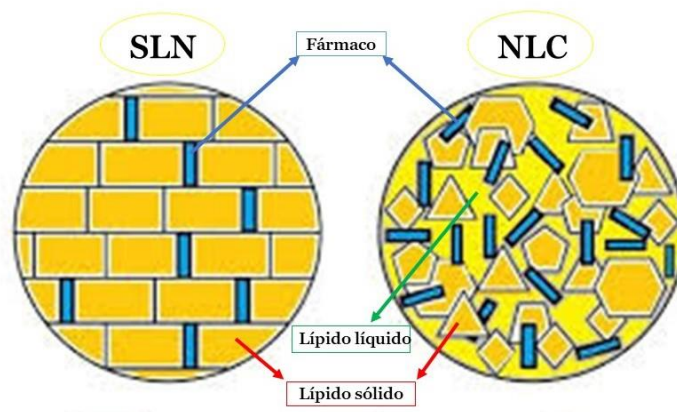


Figura 4. Esquema representativo das diferenças estruturais das SLN e NLC (adaptado de (Pardeike *et al.*, 2009)).

### 3.1.1. Solid lipid nanoparticles

As formulações de SLN são compostas por um lípido semelhante aos fisiológicos, o qual é sólido à temperatura ambiente e corporal, agente(s) emulsivo(s) e água. Como exemplos de lípidos sólidos usados temos os esteroides, di- ou triglicerídeos e misturas de glicerídeos ou ceras (normalmente em concentrações de 0.1 e 30% (*m/v*)). O agente emulsivo encontra-se normalmente em concentrações entre 0.5 a 5% (*m/v*), sendo que também pode ser utilizada uma combinação de agentes emulsivos para melhorar a estabilidade da formulação, no mesmo intervalo de concentrações (Garcês *et al.*, 2018).

A estrutura interna das SLN depende de vários fatores, como a composição da formulação, a solubilidade do fármaco nos excipientes, assim como do método de produção. Estão definidos diferentes tipos de SLN em função da sua estrutura interna (Figura 5) (Müller *et al.*, 2002).

1) SLN de matriz homogênea (tipo I): geralmente para moléculas de fármacos muito lipofílicas. As partículas são produzidas através de um processo de homogeneização a frio (dissolvendo o fármaco na matriz lipídica e expondo a mistura a um processo de homogeneização com elevada pressão, o que origina uma fragmentação mecânica e a formação de nanopartículas) ou a quente (dissolvendo o fármaco na matriz lipídica empregando elevadas temperaturas, e formando as nanopartículas por processos semelhantes aos do método em frio).

2) SLN de *drug-enriched shell model* (tipo II): as nanopartículas são obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão a quente. Durante o processo de arrefecimento, as moléculas lipídicas precipitam primeiro, formando um núcleo lipídico. No entanto, a concentração do fármaco aumenta no resto do lípido fundido até que a solubilidade máxima é atingida. Uma vez chegado a este ponto, a mistura do fármaco com o lípido fundido cristaliza, formando a camada à superfície das nanopartículas. Este modelo não é o mais adequado para fármacos destinados à libertação prolongada, mas poderá ser interessante para aumentar a penetração do fármaco na aplicação tópica da formulação.

3) SLN de *drug-enriched core model* (tipo III): neste modelo, as nanopartículas são formadas quando a concentração do fármaco é próxima à solubilidade máxima no lípido fundido. Neste método, o primeiro composto a precipitar é o fármaco, o qual forma o núcleo, e a matriz externa é formada pelo lípido junto com uma baixa concentração do fármaco.

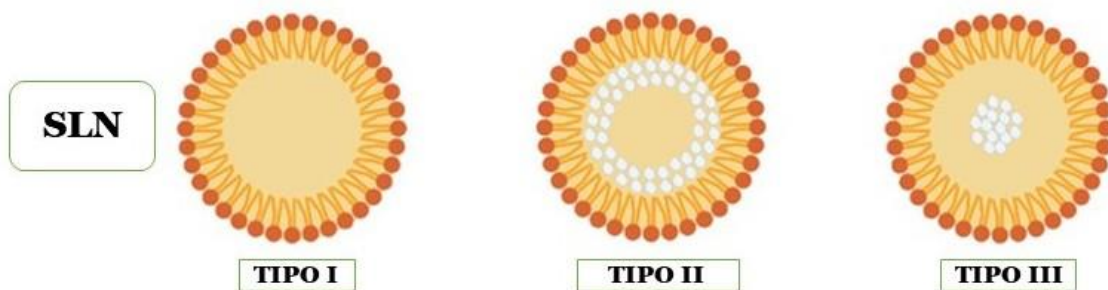


Figura 5. Representação esquemática dos diferentes modelos ou tipos de SLN. Tipo I SLN de matriz homogênea; Tipo II SLN de drug-enriched shell model; SLN de drug-enriched core model Tipo III (adaptado de (Viegas *et al.*, 2023)).

### 3.2.2. Nanostructured lipid carriers

Os NLC são a segunda geração de nanopartículas lipídicas, desenvolvidos para solucionar as desvantagens das SLN, principalmente a baixa eficiência de encapsulação e a elevada libertação do fármaco durante o armazenamento. Os NLC são constituídos por uma mistura de um lípido sólido com um lípido líquido, numa proporção aproximada de 70/30, respetivamente, e uma fase aquosa composta por um ou dois agentes emulsivos. A mistura de lípidos sólidos e líquidos resulta na formação de uma matriz mais imperfeita, em comparação à matriz das SLN, resultando numa maior eficácia na capacidade de incorporação e veiculação de fármaco (Beloqui *et al.*, 2016; Shehata *et al.*, 2023a).

Em função da sua estrutura, os NLC podem ser classificados em três tipos (Figura 6) que diferem principalmente na composição lipídica (Beloqui *et al.*, 2016).

- 1) Tipo cristal imperfeito: resulta da mistura de lípidos com diferentes comprimentos de cadeia lipídica, ou utilizando mono-, di- ou triglicerídeos. Desta forma, a matriz contém diversos espaços e imperfeições, formando mais espaço para a incorporação de fármacos.
- 2) Tipo amorfa: os NLC desta classe são obtidos empregando triglicerídeos de cadeia média junto com lípidos sólidos. Os lípidos sólidos não se submetem à recristalização após o arrefecimento dos NLC, originando assim nanopartículas solidas com uma estrutura amorfa. Sendo assim, pela não recristalização durante o período de arrefecimento e, durante o período de armazenamento, é reduzida a libertação não desejada do fármaco (conhecida como *burst release*), o que melhora consideravelmente a estabilidade da formulação.
- 3) NLC múltiplo: nesta classe, os NLC são obtidos pela mistura de lípidos sólidos com um óleo (por exemplo, ácido oleico) e/ou triglicerídeos de cadeia media e longa. O óleo é misturado numa proporção acima da sua solubilidade máxima no lípido sólido, resultando na formação de pequenos compartimentos de óleo (nanocompartimentos) na matriz dos NLC durante a fase de arrefecimento.

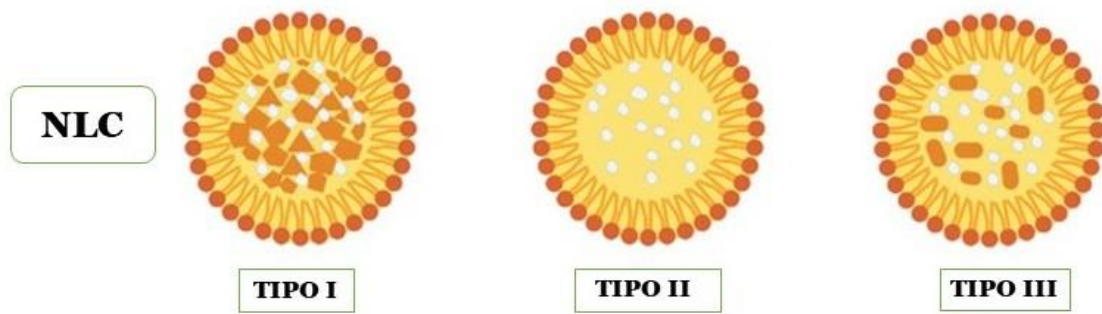


Figura 6. Representação esquemática dos diferentes modelos ou tipos de NLC. Tipo cristal imperfeito (Tipo I); Tipo amorfa (Tipo II); NLC múltiplo (Tipo III) (adaptado de (Viegas *et al.*, 2023)).

### 3.2. Requisitos das nanopartículas lipídicas para a administração intranasal de fármacos

No que diz respeito à administração de fármacos por via nariz-cérebro, as SLN e os NLC permitem o transporte direto para o cérebro, por via dos nervos trigêmeos ou dos nervos olfatórios, promovendo a biodisponibilidade dos fármacos no cérebro. O uso de lípidos fisiológicos e excipientes GRAS (do inglês *Generally Recognized as Safe*) aumenta consideravelmente a biocompatibilidade com a mucosa nasal e diminui a toxicidade das formulações. Por outro lado, as nanopartículas lipídicas promovem a adesão ao epitélio olfatório e aumentam o tempo de contacto da formulação com a mucosa nasal, evitando a rápida eliminação pelo processo de *clearance* mucociliar. Também proporcionam proteção do fármaco para a degradação enzimática na cavidade nasal e permitem libertação prolongada dos fármacos. É importante referir que uma vez que estas nanopartículas se destinam ao transporte direto através dos nervos olfatórios, os seus tamanhos devem ser menores que o diâmetro desses nervos. Diversos estudos descrevem que as formulações de SLN ou NLC destinadas à administração por via direta nariz-cérebro devem apresentar os seguintes requisitos: tamanho de partícula menor que 200 nm, índice de polidispersão (do inglês *polydispersity index* - PDI) entre 0.2 e 0.3, potencial zeta (do inglês *zeta potential* - ZP) aproximadamente de 30 mV, eficácia de encapsulação maior ou igual ao 90% e uma libertação prolongada do fármaco.

Além disso, devem ser respeitadas as condições de isotonia, viscosidade e pH adequados aos valores fisiológicos da mucosa nasal (Cunha *et al.*, 2017a; Silva *et al.*, 2017; Tapeinos *et al.*, 2017; Garcês *et al.*, 2018; Gadhav *et al.*, 2019; Cunha *et al.*, 2020; Cunha *et al.*, 2021).

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

Nos últimos anos, vários grupos de investigação têm avaliado a eficácia *in vitro* de formulações intranasais de SLN e NLC para melhorar o tratamento da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson. Na Tabelas 1 estão sumariados os resultados mais relevantes desses estudos.

Tabela 1. Exemplos de estudos *in vitro* com formulações de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) para via intranasal contendo fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer e de Parkinson.

Tipo de nanopartículas lipídicas	Farmaco	Doença Alvo	Linha celular	Resultados relevantes	Ref
SLN	Extrato de semente de uva e dopamina	Doença de Parkinson	Neuroblastoma SH-SY5Y Células olfatórias	Nenhuma das três formulações testadas (extrato de semente de uva e dopamina; SLN carregado com dopamina e SLN carregado com dopamina e extrato de semente de uva) apresentou citotoxicidade nas células olfatórias em nos neuroblastomas SH-SY5Y, em concentrações de 18-75 µg/mL	(Trapani <i>et al.</i> , 2021)
NLC	Pioglitazona	Doença de Alzheimer	SH-SY5Y	Verificou-se que a DL50 (dose letal 50) foi 16.626 µg/mL para as formulações de NLC carregadas com pioglitazona. 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	(Jojo <i>et al.</i> , 2019)
NLC	Tacrina	Doença de Alzheimer	SH-SY5Y	Ambas as formulações de NLC vazias e de NLC carregadas com tacrina, na mesma concentração, demonstraram uma viabilidade celular semelhante. A viabilidade celular das NLC carregadas com tacrina conjugadas com um péptido anfotérico decresceu consideravelmente em formulações carregadas com tacrina até concentrações de 10Mm.	(Silva <i>et al.</i> , 2020)
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.	(Trapani <i>et al.</i> , 2023)
NLC	Donezepil	Doença de Alzheimer		Foi comprovado um menor fenómeno de expulsão do fármaco durante o armazenamento para as formulações NLC com o fármaco do que para a formulação do fármaco livre em solução.	(Yasir <i>et al.</i> , 2022)
SLN e NLC	Curcumina	Doença de Parkinson	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, através de ensaios MTT e LDH.	(Neves <i>et al.</i> , 2021)

Trapani *et al.* efetuaram estudos para determinação dos efeitos da administração simultânea de dopamina e compostos de 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 de partícula da formulação SLN obtida foi de  $184 \pm 34$  nm, e o seu PDI foi de  $0.32 \pm 0.07$ . Não houve indicação de toxicidade associada à formulação nos estudos realizados com células olfatórias OEC e SH-SY5Y. Na avaliação *in vitro* dos efeitos da formulação na viabilidade celular, assim como no stress oxidativo induzido pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), foi demonstrado o aumento significativo da viabilidade celular em comparação com as células tratadas unicamente com a 6-OHDA. Sendo assim, foi concluído que as formulações SLN em estudo são promissoras para o futuro transporte dos compostos testados no tratamento da doença de Alzheimer (Trapani *et al.*, 2021).

Jojo *et al.* avaliaram formulações NLC carregadas com pioglitazona para a sua aplicação no tratamento da doença de Alzheimer, especificamente o risco de citotoxicidade nasal associado. Em relação ao fármaco, foi de grande interesse devido às suas propriedades como antidiabético e, aos distúrbios metabólicos associados às alterações na sinalização da insulina no cérebro, relacionados com o desenvolvimento de demência. 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 assim, a DL50 foi  $16.626 \mu\text{g/mL}$  para as formulações contendo fármaco livre e  $17.3874 \mu\text{g/mL}$  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  $10 \mu\text{g/mL}$ ). Em conclusão, os resultados indicaram que não existem diferenças significativas quanto à segurança e à citotoxicidade entre as formulações, confirmando assim a segurança das formulações NLC de pioglitazona para as células neuronais (Jojo *et al.*, 2019).

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 celular nas alíneas celulares do neuroblastoma (SH-SY5Y). A citotoxicidade das formulações, ambas administradas na mesma concentração, demonstrou 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. Sendo assim, conclui-se que o posicionamento das formulações NLC carregadas com tacrina é promissor para o tratamento da doença de Alzheimer, sendo interessante no futuro testar estas formulações em modelos *in vivo* (Silva *et al.*, 2020).

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  $\mu\text{M}$ ). No que concerne aos estudos com células SH-SY5Y, foi demonstrada segurança para ambas as formulações em concentrações de 12.5 e 25  $\mu\text{M}$ , sendo que foi observado um decréscimo da viabilidade celular para concentrações de 50 e 75  $\mu\text{M}$  (Trapani *et al.*, 2023).

Yasir *et al.* desenvolveram formulações NLC com o polímero catiónico 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 expulsão 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 expulsão 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 aquosa (Yasir *et al.*, 2022).

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 de BHE humana. Os resultados não revelaram a presença significativa de citotoxicidade para nenhuma das formulações de nanopartículas (foi observada uma toxicidade máxima do 30-40% em relação aos controlos), assim como também foi observada uma boa biocompatibilidade das nanopartículas para concentrações de 10  $\mu$ M após 4h de exposição às células (sendo que para concentrações de 10  $\mu$ M, 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 curcumina (Neves *et al.*, 2021).

### **3.4. 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. Na Tabelas 2 e 3 estão sumariados os resultados mais relevantes desses estudos.

Em geral, nos estudos *in vivo* as formulações de SLN ou NLC administradas por via intranasal são comparadas com soluções ou dispersões do fármaco livre administrado por via intranasal, IV ou oral, assim como com as próprias SLN e NLC administradas por via IV.

Nos estudos farmacocinéticos são determinadas as concentrações de fármaco em diferentes intervalos de tempo, no sangue e no cérebro, assim como as respectivas áreas sob a curva no sangue ( $AUC_{\text{sangue}}$ ) e no cérebro ( $AUC_{\text{cérebro}}$ ). Também são determinadas as concentrações máximas ( $C_{\text{max}}$ ) e os tempos necessários para atingir a concentração máxima ( $T_{\text{max}}$ ) (Costa *et al.*, 2021b).

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

DTE%, o qual mede a acumulação de fármaco no cérebro por parte da formulação administrada por via IN, em relação a administração IV. Este parâmetro é calculado pela seguinte equação (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022):

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

Sendo que a AUC é determinada no estudo de duração de 0 até t, os valores de DTE% podem variar desde 0 até  $\infty$ . Enquanto a referência dos valores de DTE%, valores  $>$  ou  $<$  100 sugerem respectivamente uma distribuição para o cérebro eficiente ou ineficiente (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022).

DTP%, 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 (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022):

$$\text{DTP\%} = \left[ \frac{(AUC_{\text{cérebro, IN}} - (AUC_{\text{cérebro, IV}} \times AUC_{\text{sangue, IV}} / AUC_{\text{sangue, IN}}))}{AUC_{\text{brain, IN}}} \right] \times 100$$

Sendo que a equação pode ser também arranjada para:

$$DTP\% = (1 - 100 DTE\%) \times 100$$

Os valores de DTP% podem variar desde  $-\infty$  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 por vias diretas contribuem significativamente ao transporte total de fármaco para o cérebro. Sendo assim, fármacos que não atravessam facilmente a BHE terão um valor elevado de DTP% (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022).

Para a comparação dos valores de DTE% e DTP% das formulações veiculadas por SLN e NLC (IN), são empregues os relativos valores destes parâmetros, através do log RDTE% e do log RDTP%, sendo estes (Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022):

$$\text{Log RDTE\%} = \log_{10} [ (DTE\% \text{IN}_{\text{SLN ou NLC}} / DTE\% \text{IN}_{\text{farmaco livre}}) \times 100 ]$$

$$\text{Log RDTP\%} = \log_{10} [ (DTP\% \text{IN}_{\text{SLN ou NLC}} / DTP\% \text{IN}_{\text{farmaco livre}}) \times 100 ]$$

Os valores de log RDTE% e de log RDTP%  $> 2$  indicam que as formulações de NLC e SLN (IN) tem uma melhor eficiência para o transporte do fármaco para o cérebro do que o fármaco livre administrado por via IN (Costa *et al.*, 2021b) (Nguyen *et al.*, 2022).

Apesar do DTE% e do DTP% serem parâmetros efetivos, quando a  $AUC_{\text{sangue,IN}}$  é muito pequena, os valores de DTE% e DTP% podem ser demasiado elevados apesar de existir uma pequena  $AUC_{\text{cérebro,IN}}$ . Nestes casos são empregues outros parâmetros, como:

$B_{\text{IN/IV}}$  o qual consiste no ratio entre a acumulação do fármaco no cérebro por via IN sobre a mesma por via IV. Sendo assim (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022):

$$B\%_{\text{IN/IV}} = (AUC_{\text{cérebro,IN}} / AUC_{\text{cérebro,IV}}) \times 100$$

Enquanto os valores de  $B\%_{\text{IN/IV}}$ , quando estes são  $> 100$ , quer dizer que a administração intranasal resulta numa melhor acumulação de fármaco no cérebro do que a efetuada por via IV (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022).

RB%, o qual consiste no ratio entre a quantidade de fármaco acumulada no cérebro por formulações NLC e SLN (IN) sobre os valores de acumulação de fármaco atingidos por formulações com o fármaco livre administrados também por via IN. Sendo assim (Ruigrok *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022):

$$RB\% = (AUC_{\text{cérebro,SLNs e NLCs (IN)}} / AUC_{\text{cérebro,fármaco livre (IN)}}) \times 100$$

Relativamente aos valores de RB%, quando estes são  $> 100$ , a acumulação de fármaco no cérebro é maior para as formulações SLN e NLC (IN) do que as que contem o fármaco livre (IN) (Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022).

A acumulação do fármaco no cérebro poderá também ser observada através de métodos como a cintilação gama depois da administração. Esta técnica pode também ser empregue para estudos farmacocinéticos para a quantificação da acumulação do fármaco no sangue e no cérebro (Costa *et al.*, 2021b; Nguyen *et al.*, 2022).

Tabela 2. Exemplos de estudos farmacodinâmicos com formulações de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) para via intranasal contendo fármacos usados no tratamento das doenças de Alzheimer e de Parkinson.

Fármaco / Dose	Formulações testadas	Observações	Ref
Alfa-mangostim / 2.5 mg/kg Doença de Parkinson / Ratos ICR machos	Alfa-mangostim livre (oral) NLC carregado por alfa-mangostim (oral)	Os animais receberam 2.5mg/kg/48h de rotenona por via IV para indução da neurodegeneração. As formulações de NLC com alfa-mangostim preveniram de forma superior a redução de neurónios no <i>striatum</i> e no córtex motor.	(Sakamula <i>et al.</i> , 2022)
Acido ferúlico / 15.2 mg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (180-200 g)	SLN carregado de ácido ferúlico (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 de SLN IN de 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.	(Saini <i>et al.</i> , 2021)
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	(Musumeci <i>et al.</i> , 2022)
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 aquático de Morris (MWM), 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 para o teste.	(Shehata <i>et al.</i> , 2023b)

Carbamazepina 133µg/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 anticonvulsionante para as formulações NLC-CBZ em gel <i>in situ</i> , em relação às outras formulações testadas, através do modelo MES.	(Deshkar <i>et al.</i> , 2021)
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.	(Mohanty <i>et al.</i> , 2023)
Donepezilo c/ Astaxantina (0.1 mg/kg e 0.4 mg/kg respetivamente) 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 (MWM), assim como pela determinação de AChE e ACh em ratos com a doença de Alzheimer induzida.	(Shehata <i>et al.</i> , 2023a)
Tansinona IIA / 0.3 mg/kg Doença de Parkinson / Ratos Wistar (180- 220g)	NLC revestidas por quitosana carregadas com fármaco NLC carregadas com fármaco Suspensão de fármaco livre	Foi demonstrada uma melhor eficácia das formulações CS-TAN-NLC, em relação ao resto de formulações testadas para o tratamento da doença de Parkinson, refletida nos testes comportamentais <i>rotenone test</i> , teste de campo livre e teste de natação forçada, assim como na avaliação e quantificação de biomarcadores da doença (MDA, GSH e HO-1).	(Hassan <i>et al.</i> , 2023)

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 (nomeadamente, ratos com neurodegeneração induzida baixo os efeitos da rotenona). 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 défice motor associado à doença neurodegenerativa, prevendo a redução da expressão da tiroxinase hidroxilase mediada pela rotenona, na *substância negra par compacta* e no *striatum*, e prevendo também a redução de neurónios no mesmo local. Não obstante, apenas a formulação de alfa-mangostim veiculada em NLC preveniu significativamente a redução neuronal mediada pela rotenona em ambos locais (*striatum* e no córtex motor), que se verificou através do decrescimento 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 em comparação com o efeito das formulações de NLC (Sakamula *et al.*, 2022).

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), 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 (MWM), 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 formulações de ácido ferúlico SLN revestidas (6.91 vezes maior) (Saini *et al.*, 2021).

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, como a doença de Alzheimer. Para isto, foi confirmada 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 ambas classes de nanopartículas (PLGA e NLC), sobre ratos 3xTg-AD, onde ambos complexos de nanopartículas, salientando uma melhor eficácia das NLC, conseguiram atingir o cérebro sendo abundantemente localizadas nas áreas CA2 e CA3 do hipocampo dos ratos 3xTg-AD (Musumeci *et al.*, 2022).

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 através da administração de AlCl<sub>3</sub>. Para isto foi comparado o tempo de latência dos ratos para o teste do labirinto aquático de Morris (MWM), sendo estes divididos em três grupos: ratos com a doença de Alzheimer induzida sem tratamento, submetidos a tratamento com astaxantina em solução (IN) e tratados com NLC contendo astaxantina. Após este estudo, foi observada um maior decréscimo nos ratos os quais receberam tratamento com astaxantina e, dentro destes, foi demonstrada uma maior eficácia das formulações de NLC com astaxantina, obtendo estes uma redução do tempo de latência no quarto dia de tratamento de mais da metade (de  $29.50 \pm 2.95$  para  $11.17 \pm 2.14$ ) (Shehata *et al.*, 2023b).

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 anticonvulsante 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 133µg/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 empregue o modelo MES, no qual os ratos foram submetidos a eletroshocks aplicados na córnea, de 150mA 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 (71.95, 50.26 e 13.22%, respetivamente), confirma-se uma maior capacidade de proteção anticonvulsante para as formulações NLC-CBZ, provavelmente atribuída pela maior permeação do fármaco veiculado nas NLC através da mucosa nasal (Deshkar *et al.*, 2021).

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 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 unicamente com 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, no último grupo, ratos tratados unicamente com donepezilo na concentração de 0.1mg/kg/dia, após a indução da demência, em solução IN. Sendo assim, foi efetuado o teste do labirinto aquático de Morris (MWM), onde foram avaliadas a capacidade de aprendizagem espacial e memória dos ratos, 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 para o cérebro, refletido na eficácia deste para o tratamento contra a demência induzida (Mohanty *et al.*, 2023).

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 pela administração de cloreto de alumínio hidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Foram comparados os resultados obtidos no teste do labirinto aquático de Morris (MWM), 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 ( $21.50 \pm 5.09$ ,  $16.67 \pm 3.67$ ,  $13.33 \pm 3.27$ ,  $9.34 \pm 2.07$ s nos dias 1, 2, 3 e 4 respectivamente), do que os grupos tratados com DPL/AST-Sol ( $28.50 \pm 2.07$ ,  $24.50 \pm 1.64$ ,  $21.33 \pm 1.21$ ,  $17.58 \pm 1.19$ s), DPL-Sol ( $36.17 \pm 2.04$ ,  $32.13 \pm 6.38$ ,  $28.67 \pm 3.72$ ,  $27.15 \pm 3.83$ s) e DPL-NLC ( $29.83 \pm 2.64$ ,  $25.20 \pm 2.37$ ,  $21.67 \pm 1.51$ ,  $18.31 \pm 2.37$ 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 (Shehata *et al.*, 2023a).

Por outro lado, no mesmo estudo foi efetuada a determinação de parâmetros bioquímicos, sendo estes os níveis de acetilcolinesterase (AChE) e acetilcolina. Desta forma, nos grupos de ratos com a doença de Alzheimer induzida, foi observado um aumento nos níveis de AChE ( $21.86 \pm 0.79$ ,  $25.62 \pm 2.34$  ng/mg) e uma diminuição significativa nos níveis de ACh ( $7.58 \pm 1.08$ ,  $8.38 \pm 1.89$  pg/mg), do que nos grupos de controlo sem a doença induzida (AChE;  $7.48 \pm 0.87$ ,  $8.56 \pm 0.72$  ng/mg, ACh;  $23.86 \pm 0.82$ ,  $35.38 \pm 1.13$

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  $8.13 \pm 0.96$ ,  $8.76 \pm 1.82$  ng/ mg, ACh  $22.17 \pm 1.50$ ,  $32.90 \pm 1.61$  pg/mg) do que os grupos tratados com DPL-NLC (AChE  $14.20 \pm 0.88$ ,  $15.45 \pm 0.50$  ng/mg e ACh  $14.84 \pm 1.02$ ,  $17.25 \pm 1.36$  pg/mg), DPL-Sol (AChE;  $18.46 \pm 0.73$ ,  $22.37 \pm 0.79$  ng/mg, ACh;  $10.98 \pm 1.23$ ,  $11.77 \pm 1.72$  pg/mg) e DPL/AST-Sol (AChE;  $13.70 \pm 0.78$ ,  $14.29 \pm 1.36$  ng/mg, ACh  $15.32 \pm 0.65$ ,  $18.73 \pm 0.91$  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, prevendo a degeneração colinérgica relacionada com a função cognitiva (Shehata *et al.*, 2023a).

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. Sendo assim, 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 ( $129.2 \pm 21.6$  s, sendo que o controlo negativo obteve resultados de  $141.7 \pm 20.1$  s) e, apresentando uma diferença significativa com as formulações TAN-NLC ( $92.1 \pm 5.8$  s) e com a TAN-Sus ( $70.1 \pm 2.8$  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 ( $4 \pm 0.4$ s) e atravessaram um maior número de quadrantes ( $67.3 \pm 3$ ) do que as formulações TAN-NLC e TAN-Sus ( $6 \pm 0.3$ s e  $60.1 \pm 2.5$  quadrantes;  $7.4 \pm 0.3$ s e  $51.5 \pm 5.4$  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 ( $157 \pm 3.8$  e  $23 \pm 3.9$ s, respetivamente), em relação as formulações TAN-NLC e TAN-Sus ( $132.5 \pm 2.4$  e  $40 \pm 2.1$ s;  $140 \pm 2.1$  e  $47.5 \pm 2.4$ s respetivamente) (Hassan *et al.*, 2023).

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 ( $12.3 \pm 0.1$  ng/g), com a ausência de diferença significativa em relação ao controlo negativo ( $12.5 \pm 0.25$  ng/g) e sendo estes valores 5.3 vezes superior aos obtidos pelo controlo positivo ( $2.3 \pm 0.1$  ng/g). Em relação às outras formulações testadas, foi comprovada uma melhoria moderada nos níveis de dopamina ( $5.1 \pm 0.11$  e  $8.7 \pm 0.09$  ng/g, para as formulações TAN-Sus e TAN-NLC respetivamente), mas sem atingir a eficácia obtida pelas formulações NLC conjugadas com quitosano (Hassan *et al.*, 2023).

Para a avaliação dos marcadores da inflamação, foram determinados os níveis de NF- $\kappa$ B e de captetina B, ambos mediadores relacionados com a neuroinflamação e, desta forma, relacionados diretamente com a patogénese da doença. Desta forma, foi observado que as formulações TAN-NLC conseguiram diminuir significativamente os níveis de ambos NF- $\kappa$ 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 revestidas (Hassan *et al.*, 2023).

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, conseqüentemente, provoca a formação de malondialdeído (MDA). Por outro lado, também a glutathiona (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), glutathiona (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% (Hassan *et al.*, 2023).

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, conseqüentemente, para o tratamento da doença de Parkinson, tendo sendo isto refletido nos estudos de avaliação comportamental e na avaliação dos biomarcadores (Hassan *et al.*, 2023).

Tabela 3. Exemplos de estudos *in vivo* com formulações de nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) para via intranasal contendo fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer e de Parkinson.

Fármaco / Dose Doença / Modelo animal	Formulações testadas	C <sub>máx</sub> (µg/mL)	DTE (%)	DTP (%)	T <sub>máx</sub> (min)	Área abaixo da curva (AUC)	Ref
Piribedil / 2mg/kg Doença de Parkinson / Ratos Wistar (240-260g)	PBD-SLN-Suspensão	265.45 ± 55.02 (ng/mL)	119.89	16.59	30	32488 (ng/g*min)	(Uppuluri <i>et al.</i> , 2021)
	PBD-SLN-ISG	245.83 ± 33.65 (ng/mL)	137.54	27.29	30	42046 (ng/g*min)	
	PBD-Suspensão	242.43 ± 45.84 (ng/mL)	39.40	-77.95	30	10394 (ng/g*min)	
Berberina / 5mg/kg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (210-240g)	NLC carregados com o fármaco (IN)	1033 (ng/mL)			120	469,403 (ng/g*min)	(Abo El- Enin <i>et al.</i> , 2022)
	Solução de fármaco IV	780 (ng/mL)	509.2	80.4	45	74,944 (ng/g*min)	
	Solução de fármaco IN	748 (ng/mL)			30	137,275 (ng/g*min)	
Rivastigmina / 0.178 mg/kg Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (150-200g)	SLN carregado com o fármaco	73.99 ± 5.66 (ng/mL)	-	-	40	25,678 ± 56.67 (ng·h/ml)	(Arora <i>et al.</i> , 2022)
	Fármaco em solução IV	49.64 ± 5.58 (ng/mL)	-	-	60	7,018.40 ± 20.97 (ng·h/ml)	
	Fármaco em solução IN	65.24 ± 3.35 (ng/mL)	-	-	60	12,567.76 ± 13.80 (ng·h/ml)	

	NLC com o fármaco IN	73.3 ± 6.7 (ng/mL)	433.03	76.03	120	662.7 ± 26.4 (ng·h/ml)	
Rotigotina / 0.36mg	NLC com o fármaco IV	38.2 ± 5.3 (ng/mL)	-	-	120	313.6 ± 36.3 (ng·h/ml)	(Zafar <i>et al.</i> , 2022)
Doença de Parkinson / Ratos Wistar (200-250g)	NLC com o fármaco oral						
	Dispersão de fármaco livre IN	17.2 ± 2.5 (ng/mL)	-	-	120	207.1 ± 19.3 (ng·h/ml)	
		39.7 ± 0.3 (ng/mL)	173.91	59.97	180	329.5 ± 29.3 (ng·h/ml)	
Donepezilo / 180 mg	NLC com donepezilo revestidas por quitosano IN	218.93 ± 11.62 (ng/mL)	321.21	74.55	240	2676.63 ± 117.27 (ng·h/ml)	(Yasir <i>et al.</i> , 2022)
Doença de Alzheimer / Ratos Wistar (200-250g)	Solução IN de fármaco livre	149.21 ± 18.42 (ng/mL)	158.52	36.92	120	1321.20 ± 73.28 (ng·h/ml)	
	NLC com donepezilo revestido por quitosano IV	117.19 ± 31.25 (ng/mL)	-	-	120	1109.98 ± 46.37 (ng·h/ml)	
Atomoxetina / 0.18mg	NLC gel <i>in situ</i> IN	173.07 ± 13.02 (ng/mL)	207.91	51.91	60	1409.58 ± 138.79 (ng·h/ml)	(Mohanty <i>et al.</i> , 2023)
	NLC IV	101.18 ± 9.09 (ng/mL)			60	871.16 ± 82.95 (ng·h/ml)	
Doença de Alzheimer / Ratos Wistar	NLC oral	96.32 ± 8.00 (ng/mL)		28.64	60	720.67 ± 86.67 (ng·h/ml)	
	Fármaco livre em solução IN	99.70 ± 6.45 (ng/mL)	140.14		120	786.53 ± 93.86 (ng·h/ml)	

Abreviaturas: PBD-SLN-Suspensão (Suspensão das formulações SLN contendo piribedil), PBD-SLN-ISG

(Formulações SLN em gel *in situ* contendo piribedil), PBD-Suspensão (Piribedil livre em suspensão)

Uppuluri *et al.* desenvolveram formulações SLN veiculando piribedil (PBD-SLN) com o objetivo de otimizar a administração do fármaco por via direta nariz-cérebro. Para a avaliação das formulações desenvolvidas foram efetuados 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 comparadas 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 ( $C_{máx}$ ) serem semelhantes para as três formulações testadas ( $265.45 \pm 55.02$ ,  $245.83 \pm 33.65$  e  $242.43 \pm 45.84$  ng/mL, respectivamente 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 administração 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, respectivamente para as formulações PBD-SLN-Susp, PBD-SLN-ISG e PBD-Susp) (Uppuluri *et al.*, 2021).

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  $C_{máx}$  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 respectivamente), 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, respectivamente. Na mesma linha que os resultados anteriores, os valores da  $AUC_{cérebro}/AUC_{sangue}$  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-NLC (Abo El-Enin *et al.*, 2022).

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  $C_{máx}$  ( $73.99 \pm 5.66$  ng/mL para as formulações RT-SLN, e  $49.64 \pm 5.58$  e  $65.24 \pm 3.35$  ng/mL para as formulações do fármaco em solução IV e IN respectivamente), 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 respectivamente) (Arora *et al.*, 2022).

Zafar *et al.* desenvolveram e otimizaram formulações NLC revestidas por quitosano 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. Enquanto à 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%) (Zafar *et al.*, 2022).

Yasir *et al.* desenvolveram formulações NLC revestidas com o polímero catiónico CH para avaliar a eficácia destas na veiculação do donepezilo, em vista à administração do fármaco por via direta nariz-cérebro. Para o efeito, 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  $T_{max}$  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  $C_{max}$  para as formulações DPZ-CH-NLC-OPT2 ( $218.93 \pm 11.62$  ng) foram significativamente maiores do que as formulações DPZ-Sol e DPZ-CH-NLC-OPT2 IV ( $149.21 \pm 18.42$  e  $117.19 \pm 31.25$  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) (Yasir *et al.*, 2022).

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 ( $173.07 \pm 13.02$ ), em relação à mesma administrada por via oral e IV ( $96.32 \pm 8.00$  e  $101.18 \pm 9.09$ , respetivamente) assim como da formulação do fármaco livre em solução administrado por via IN ( $99.70 \pm 6.45$ ), tendo-se verificado o mesmo com a concentração de fármaco presente no cérebro ( $31.1 \pm 3.61$ ) após 0.5h da administração ( $75.29 \pm 4.95$ ,  $17.80 \pm 3.47$ ,  $28.09 \pm 4.53$  e  $31.1 \pm 3.61$ , 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 biodisponibilidade (Mohanty *et al.*, 2023).

### **III. CONCLUSÃO**

A via direta nariz-cérebro apresenta-se como um método não-invasivo e promissor para a intervenção farmacológica, que oferece segurança e eficácia à terapêutica, nomeadamente em doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e de Alzheimer. Neste sentido, as nanopartículas lípidicas (SLN e NLC) proporcionam um sistema que permite disponibilizar o fármaco de uma forma mais seletiva e específica no local de ação. De acordo com os resultados apresentados em estudos recentes, a sua aplicação futura é promissora. Contudo, até à data, não estão comercializados medicamentos contendo SLN ou NLC para o tratamento destas doenças, pelo que são necessárias mais investigações, que incluam ensaios clínicos, para que seja possível a sua comercialização.

#### IV. BIBLIOGRAFIA

Abo El-Enin, H. A. *et al.* (2022). Lipid Nanocarriers Overlaid with Chitosan for Brain Delivery of Berberine via the Nasal Route. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(3), pp. 1-15.

Alexander, J. J. (2018). Blood-brain barrier (BBB) and the complement landscape. *Molecular Immunology*, 102, pp. 26-31.

Amoah, V. *et al.* (2023). Lantana camara leaf extract ameliorates memory deficit and the neuroinflammation associated with scopolamine-induced Alzheimer's-like cognitive impairment in zebrafish and mice. *Pharmaceutical Biology*, 61(1), pp. 825-838.

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

Azarmi, M. *et al.* (2020). Transcellular brain drug delivery: A review on recent advancements. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119582.

Battaglia, L. *et al.* (2018). Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opinion Drug Delivery*, 15(4), pp. 369-378.

Beloqui, A. *et al.* (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), pp. 143-161.

Bourganis, V. *et al.* (2018). Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128, pp. 337-362.

Campbell, H. K., Maiers, J. L. e DeMali, K. A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Experimental Cell Research*, 358(1), pp. 39-44.

Chopade, P. *et al.* (2023). Alzheimer's and Parkinson's disease therapies in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 8(1), e10367.

Chu, J. C. *et al.* (2023). Synthesis and biological evaluation of C-4 substituted phenoxazine-bearing hydroxamic acids with potent class II histone deacetylase inhibitory activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2212326.

Costa, C. *et al.* (2019). Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. *Journal of Controlled Release*, 295, pp. 187-200.

Costa, C. P. *et al.* (2021a). 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. *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 120933.

Costa, C. P. *et al.* (2021b). Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(4), pp. 925-940.

Crowe, T. P. *et al.* (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, pp. 44-52.

Cunha, S. *et al.* (2017a). Intranasal lipid nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Current Pharmacological Design*, 23(43), pp. 6553-6562.

Cunha, S. *et al.* (2017b). Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 34(3), pp. 257-282.

Cunha, S. *et al.* (2020). 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*, 12(7), pp. 16-28.

Cunha, S. *et al.* (2021). Improving Drug Delivery for Alzheimer's Disease Through Nose-to-Brain Delivery Using Nanoemulsions, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and in situ Hydrogels. *International Journal of Nanomedicine*, 16, pp. 4373-4390.

de Oliveira Junior, E. R. *et al.* (2020). Nasal administration of nanoencapsulated geraniol/ursodeoxycholic acid conjugate: Towards a new approach for the management of Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release*, 321, pp. 540-552.

Deshkar, S. S., Jadhav, M. S. e Shirolkar, S. V. (2021). Development of Carbamazepine Nanostructured Lipid Carrier Loaded Thermosensitive Gel for Intranasal Delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 11(1), pp. 150-162.

Feng, Y. *et al.* (2018). An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discovery Today*, 23(5), pp. 1079-1088.

Gadhve, D. G. e Kokare, C. R. (2019). Nanostructured lipid carriers engineered for intranasal delivery of teriflunomide in multiple sclerosis: optimization and in vivo studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(5), pp. 839-851.

Garcês, A. *et al.* (2018). Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, pp. 159-167.

Ghasemiyeh, P. e Mohammadi-Samani, S. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(4), pp. 288-303.

Haider, M. *et al.* (2020). Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics*, 12(3), pp. 16-27.

Hassan, D. M. *et al.* (2023). Chitosan-coated nanostructured lipid carriers for effective brain delivery of Tanshinone IIA in Parkinson's disease: interplay between nuclear factor-kappa  $\beta$  and cathepsin B. *Drug Delivery and Translational Research*, 2023, pp. 1-18.

Jojo, G. M. *et al.* (2019). Formulation and optimization of intranasal nanolipid carriers of pioglitazone for the repurposing in Alzheimer's disease using Box-Behnken design. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(7), pp. 1061-1072.

Khosa, A., Reddi, S. e Saha, R. N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, pp. 598-613.

Koeglsperger, T. *et al.* (2023). Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), pp. 32-38.

Kumar, A., Pandey, A. N. e Jain, S. K. (2016). Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Delivery*, 23(3), pp. 681-693.

Mohanty, D. *et al.* (2023). Development of Atomoxetine-Loaded NLC In Situ Gel for Nose-to-Brain Delivery: Optimization, In Vitro, and Preclinical Evaluation. *Pharmaceutics*, 15(7), pp. 227-235.

Müller, R. H., Radtke, M. e Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, pp. S131-S155.

Musumeci, T. *et al.* (2022). 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*, 10(5), pp. 472-491.

Neves, A. R. *et al.* (2021). Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery. *Journal of Biotechnology*, 331, pp. 108-117.

Nguyen, T. T. e Maeng, H. J. (2022). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intranasal Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics*, 14(3), pp. 672-688.

Pandit, R., Chen, L. e Götz, J. (2020). The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 165-166, pp. 1-14.

Pardeike, J., Hommoss, A. e Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1), pp. 170-184.

Raza, C., Anjum, R. e Shakeel, N. u. A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*, 226, pp. 77-90.

Rinaldi, C. *et al.* (2021). Oxidative Stress and the Neurovascular Unit. *Life (Basel)*, 11(8), pp. 767.

Ruigrok, M. J. e de Lange, E. C. (2015). Emerging Insights for Translational Pharmacokinetic and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies: Towards Prediction of Nose-to-Brain Transport in Humans. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 17(3), pp. 493-505.

Saha, P., Kathuria, H. e Pandey, M. M. (2023). Intranasal nanotherapeutics for brain targeting and clinical studies in Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release*, 358, pp. 293-318.

Saidijam, M. *et al.* (2018). Efflux proteins at the blood-brain barrier: review and bioinformatics analysis. *Xenobiotica*, 48(5), pp. 506-532.

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

Sakamula, R., Yata, T. e Thong-Asa, W. (2022). Nanostructure lipid carriers enhance alpha-mangostin neuroprotective efficacy in mice with rotenone-induced neurodegeneration. *Metabolic Brain Disease*, 37(5), pp. 1465-1476.

Shehata, M. K., Ismail, A. A. e Kamel, M. A. (2023a). Combined Donepezil with Astaxanthin via Nanostructured Lipid Carriers Effective Delivery to Brain for Alzheimer's Disease in Rat Model. *International Journal of Nanomedicine*, 18, pp. 4193-4227.

Shehata, M. K., Ismail, A. A. e Kamel, M. A. (2023b). Nose to Brain Delivery of Astaxanthin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers in Rat Model of Alzheimer's Disease: Preparation, in vitro and in vivo Evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 18, pp. 1631-1658.

Silva, A. C. *et al.* (2017). Editorial: Applications of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): State of the Art. *Current Pharmaceutical Design*, 24, pp. 1381-1391.

Silva, S. *et al.* (2020). Formulation, Characterization and Evaluation against SH-SY5Y Cells of New Tacrine and Tacrine-MAP Loaded with Lipid Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 10(10), pp. 21-28.

Tapeinos, C., Battaglini, M. e Ciofani, G. (2017). Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release*, 264, pp. 306-332.

Trapani, A. *et al.* (2023). 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*, 15(3), pp. 37-48.

Trapani, A. *et al.* (2021). Cyto/Biocompatibility of Dopamine Combined with the Antioxidant Grape Seed-Derived Polyphenol Compounds in Solid Lipid Nanoparticles. *Molecules*, 26(4), pp. 992-1001.

Uppuluri, C. T., Ravi, P. R. e Dalvi, A. V. (2021). 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. *International Journal of Pharmaceutics*, 606, 120881.

Viegas, C. *et al.* (2023). Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. *Pharmaceutics*, 15(6), pp. 47-55.

Weintraub, D. e Irwin, D. (2022). Diagnosis and Treatment of Cognitive and Neuropsychiatric Symptoms in Parkinson Disease and Dementia With Lewy Bodies. *Continuum*, 28(5), pp. 1314-1332.

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

Zafar, A. *et al.* (2022). Formulation of intranasal surface engineered nanostructured lipid carriers of rotigotine: Full factorial design optimization, in vitro characterization, and pharmacokinetic evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 627, 122232.

Zhao, M. *et al.* (2020). Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. *Theranostics*, 10(3), pp. 1355-1372.