



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Administração de Fármacos
do Nariz para o Cérebro e sua Aplicação
na Doença de Alzheimer**

Margarida Domingos Silvestre

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de Prof. Doutora Ana
Margarida Moutinho Grenha

Faro, junho de 2024



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Administração de Fármacos
do Nariz para o Cérebro e sua Aplicação
na Doença de Alzheimer**

Margarida Domingos Silvestre

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de Prof. Doutora Ana
Margarida Moutinho Grenha

Faro, junho de 2024

Administração de Fármacos do Nariz para o Cérebro e sua Aplicação na Doença de Alzheimer

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Margarida Domingos Silvestre)

Copyright 2024 Margarida Domingos Silvestre

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*“A luta é de quem trabalha
Mudando o presente com as mãos,
Mas também é dos que acreditam
Que os seus sonhos não são vãos”.*

Celina da Piedade

Agradecimentos

Parece que foi ontem que fiz a candidatura de acesso ao ensino superior. Das 6 opções apenas preenchi uma, a primeira. Uma opção, uma candidatura, uma Universidade, um curso, apenas uma escolha. Senti-me incosequente e quase que irresponsável, mas sempre fui de arriscar e de não me contentar com menos do que aquilo que quero.

Realmente parece que foi ontem, mas 5 anos se passaram desde setembro de 2018. Acho que foi a partir dessa altura que efetivamente senti o que sempre me disseram: o tempo passa a correr. E passa mesmo. Não vou ser hipócrita e dizer que achei que não ia conseguir. Sempre achei que conseguia mesmo que em certos momentos, a certeza, desse lugar à incerteza. Parte dessa crença deve-se aos que embarcaram comigo nesta aventura, os meus pais e a toda a minha família, e àqueles que a mim se juntaram.

Cresci bastante ao longo destes 5 anos e, comigo, cresceram os meus pais. Impossível ter chegado a este ponto sem estes 2 seres humanos. Os meus pais. A Sónia e o Zé Miguel. Pode existir igual, mas é com toda a certeza do Mundo que afirmo que melhor não existe. Aqueles que nunca me deixaram na mão. Aqueles que suportaram todas as minhas inseguranças e as transformaram em forças. Aqueles que sempre colocaram, e colocam, as minhas necessidades antes das deles. Obrigada é pouco, e vai ser sempre. Só espero ser capaz de retribuir e de estar para vocês como sempre estiveram por mim. Obrigada, mãe e pai.

Ao meu irmão, Miguel, por ter sempre um abraço acolhedor e apertado, acompanhado de um sorriso enternecedor de cada vez que me via.

Aos meus 4 avós, mas em especial às minhas avós. Aquelas que me aconchegam mesmo não estando ao meu lado. Sempre foram capazes de reestruturar a minha alegria

de cada vez que lhes ouvia a voz. Que sortuda sou por vos ter. Obrigada, avó Lurdes.
Obrigada, avó Luísa.

Ao meu tio, e padrinho, Bruno e à minha Tia Ana, que sempre me incentivaram a fazer e a ser melhor. Aos meus primos, Gustavo e Catarina.

Ao meu Tio Pedro e à minha Tia, e madrinha, Sónia. Pela cumplicidade, apoio e valorização. Ao meu primo Tiago, por nunca me deixar esquecer que, dentro de mim, existe uma criança que nunca deve crescer.

À minha amizade mais antiga e à irmã que nunca tive. A ti, Laura Afonso, que és e sempre foste família. Obrigada por nunca me deixares cair.

Quando entrei, aqueles que me acolheram disseram-me duas coisas: “o curso faz-se no recurso” e também “o curso não se faz sozinho”. Pois bem, a primeira é uma meia-verdade; o curso faz-se no recurso, mas também se faz na época especial. Mas a segunda é a mais pura das certezas. Se não fossem os meus amigos, não tinha feito o curso. Ou melhor, até tinha, mas não seria a mesma coisa.

Aos que me acolheram quando eu cheguei. À Carolina que, sem querer e sem se aperceber, tomou conta de mim. À Filipa, que entre saídas e gargalhadas nunca me deixou sozinha. Aos que cresceram comigo. À Rita, à Mariana A., à Mariana F., à Filipa, à Mafalda e ao João. Sem vocês não me teria dado tanto prazer viver estes 5 anos, obrigada.

À minha Carolina, pelo carinho e apoio incondicional nos dias mais cinzentos.

À farmácia Carmo e às meninas que lá trabalham, à Ana, à Inês M. e à Joana. Obrigada pela paciência que tiveram e o tempo que despenderam para me ajudar. À minha orientadora de estágio, Doutora Inês Evaristo, obrigada por me receber e por incutir em mim a vontade de marcar a diferença e o gosto pela profissão. À Oriana, por me acolher, por me ensinar e, especialmente, por me fazer sentir em casa.

À Feminis Ferventis – Tuna Académica Feminina da Universidade do Algarve, que me colocou à prova durante 5 anos, que me fez crescer e que me deu amizades que espero levar pela vida fora. Obrigada.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Margarida Grenha, e a todo o corpo docente do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve.

Resumo

Há algumas décadas, a esperança média de vida era cerca de metade da atual, devido às condições precárias em que as populações viviam. Com a evolução da ciência, esta tem aumentado de década para década. O facto de as populações viverem por mais tempo é bastante positivo, mas trouxe também o incremento das doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento natural. Estas doenças afetam as células nervosas cerebrais e, apesar de todo o avanço tecnológico, o cérebro é ainda uma área por explorar. A Doença de Alzheimer é um dos exemplos de doenças neurodegenerativas, sendo a mais prevalente a nível mundial. Crê-se que o seu mecanismo fisiopatológico tenha por base a acumulação de dois tipos de proteínas: a proteína β -amilóide e a proteína *tau* hiperfosforilada. Não existe atualmente tratamento curativo para esta doença, sendo que a terapêutica disponível tem apenas como finalidade atenuar a sintomatologia inerente à degradação neuronal. Parte da problemática da terapêutica existente prende-se com a via de administração, uma vez que os fármacos administrados por via oral sofrem efeito de primeira passagem, o que resulta na diminuição da sua biodisponibilidade. Além disso, alcançar os locais alvo, localizados no cérebro, requer atravessar a barreira hematoencefálica, o que só é possível com determinadas características físico-químicas, como o reduzido tamanho e o equilíbrio entre a lipofilia e a hidrofobia de determinado composto.

Surge assim a necessidade de desenvolver novas estratégias de tratamento que ultrapassem estas limitações. Neste contexto, a administração direta de fármacos do nariz para o cérebro emerge como uma solução bastante promissora. Esta abordagem pressupõe a administração de fármacos por via intranasal, uma vez que é a única via que possibilita a condução direta do fármaco até ao cérebro. Esta condução é possibilitada pelos nervos cranianos, o trigémeo e o olfativo, e pela absorção facilitada na mucosa nasal.

Neste contexto, a presente dissertação consiste na revisão bibliográfica de estratégias relacionadas com a administração direta de fármacos da cavidade nasal para o cérebro no âmbito do tratamento da Doença de Alzheimer. Serão focadas em particular técnicas de encapsulação em sistemas lipídicos, e a sua posterior administração pela via nasal, mitigando questões associadas ao efeito sistémico e à barreira hematoencefálica.

Palavras-chave: administração intranasal; barreira hematoencefálica; doença de alzheimer; nanopartículas; nariz para o cérebro.

Abstract

A few decades ago, average life expectancy was around half of what it is today, due to the precarious conditions in which populations lived. With the evolution of science, this has increased from decade to decade. The fact that populations live longer is very positive, but it also brought an increase in neurodegenerative disorders associated with natural aging. These diseases affect brain nerve cells and, despite all the technological advances, the brain is still an area to be explored. Alzheimer's disease is an example of one of the most prevalent neurodegenerative diseases worldwide. It is believed that its pathophysiological mechanisms involve the accumulation of two proteins: β amyloid protein and hyperphosphorylated tau protein. Currently, there is no curative treatment for this disease, and the available therapy aims only to alleviate the symptoms associated with neuronal degradation. Part of the challenge with existing therapy is related to the way medications are administered, since drugs administered orally suffer a first-pass effect, which results in a decrease in their bioavailability. Furthermore, reaching the brain, where therapeutic targets are located, requires crossing the blood brain barrier, which is only possible for certain compounds with specific characteristics, such as the reduced size and a balance between hydrophobicity and lipophilicity.

Therefore, there is a need to develop new treatment strategies that overcome these limitations. In this context, the direct administration of drugs from the nose to the brain emerges as a promising solution. This technique involves the administration of drugs through the nasal route, as it is the only route that allows the drug to be directly transported to the brain. This is made possible by cranial nerves such as the trigeminal and the olfactory nerves, as well as facilitated absorption in the nasal mucosa.

In this context, this dissertation consists of a bibliographical review of strategies related to the direct administration of drugs from the nasal cavity to the brain in the

treatment of Alzheimer's Disease. Particular focus will be on encapsulation techniques in lipidic systems and their subsequent administration via the nasal route, mitigating issues associated with the systemic effect and the blood-brain barrier.

Keywords: Alzheimer's disease; Blood-Brain Barrier; Nasal Cavity; Nanoparticles; Nose to Brain Drug Delivery.

Índice

Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xvi
Lista de Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	3
3. Métodos	5
4. Doença de Alzheimer	7
4.1 - Epidemiologia.....	9
4.2 – Fisiopatologia da Doença de Alzheimer	12
4.3- Causas e Fatores de Risco	16
5. Terapêutica da Doença de Alzheimer	19
5.1- Terapêutica Convencional da Doença de Alzheimer	20
5.1.1- Inibidores da Colinesterase.....	21
5.1.2- Antagonistas do Recetor N-metil-D-Aspartato	22
6. Cavidade nasal como via de administração de fármacos e seus mecanismos de transporte	23
7. Utilização de nanossistemas no tratamento da Doença de Alzheimer	29
7.1- Nanoemulsões	31
7.2- Lipossomas.....	36
7.3- Nanopartículas Lipídicas: SLN e NLC	44
8. Conclusão	53
9. Bibliografia	55

Índice de Figuras

Figura 4.1 - Distinção entre o cérebro saudável (a) e o cérebro com doença de Alzheimer (b). Adaptado de (7).	7
Figura 6.1 - Representação da anatomia da cavidade nasal.....	23
Figura 6.2 - Representação esquemática das vias de transporte de fármaco para o cérebro após administração intranasal. Adaptado de (49).	25
Figura 6.3 - Vias de transporte direto do epitélio olfativo para o cérebro. Adaptado de (49).	25
Figura 6.4 - Representação gráfica da inervação do nervo trigémeo na face. Adaptado de (50).	26
Figura 6.5 - Representação gráfica da veiculação indireta de fármaco para o cérebro. Adaptado de (50).....	27
Figura 7.1 - Representação gráfica do percentual de libertação de fármaco nos testes in vitro. Adaptado de (94).	33
Figura 7.2 - Representação gráfica dos resultados dos testes de libertação in vitro. Adaptado de (95).....	35
Figura 7.3 - Representação gráfica da estrutura de um lipossoma. Adaptado de (71).	36
Figura 7.4 - Comparação dos lipossomas de acordo com a lamelaridade e número de vesículas. Adaptado de (70).	37
Figura 7.5 - Libertação in vitro do donepezilo. Adaptado de (82).	39
Figura 7.6 - Permeação da solução de donepezilo e da formulação lipossomal. Adaptado de (92).	41
Figura 7.7 - Concentração no plasma e no cérebro para as diferentes formulações. Adaptado de (92).....	41
Figura 7.8 - Perfis de concentração plasmática de ambas as administrações de donepezilo. Adaptado de (93).....	42
Figura 7.9 - Representação gráfica da estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida. Adaptado de (86).....	44
Figura 7.10 -Comparação entre os tipos de nanopartículas lipídicas sólidas. Adaptado de (88).	45
Figura 7.11 - Representação gráfica dos resultados do estudo in vitro. Adaptado de (90).	49
Figura 7.12 - Representação gráfica dos resultados do estudo in vivo em ratos. Adaptado de (90).	50
Figura 7.13 - Comparação do perfil de dissolução do fármaco. Adaptado de (91).	52

Índice de Tabelas

Tabela 6.1 - Vantagens e desvantagens da via de administração intranasal. Adaptado de (50).	27
Tabela 7.1 - Descrição dos grupos de ratos utilizados. Adaptado de (68).....	32
Tabela 7.2 - Resultados dos estudos in vivo para os diferentes grupos. Adaptado de (94).	33
Tabela 7.3 - Parâmetros farmacocinéticos do donepezilo no plasma. Adaptado de (82)...	39
Tabela 7.4 - Parâmetros farmacocinéticos do donepezilo no cérebro. Adaptado de (82)..	39
Tabela 7.5 - Parâmetros farmacocinéticos relativos à amostragem. Adaptado de (93)	43
Tabela 7.6 - Características da amostragem utilizada. Adaptado de (89).....	46
Tabela 7.7 - Concentração (ng/mg) de enzima β -secretase no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).	47
Tabela 7.8 - Concentração (ng/mg) de proteína β -amilóide no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).	47
Tabela 7.9 - Concentração de acetilcolina em pg/mg no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).....	48
Tabela 7.10 - Concentração de acetilcolinesterase em ng/mg no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).	48
Tabela 7.11 - Características da amostragem. Adaptado de (90).....	50
Tabela 7.12 - Formulações de administração de cada grupo de animais. Adaptado de (91).	51

Lista de Abreviaturas

4-HNE - 4-hidroxi-2-nonenal

ADN - ácido desoxirribonucleico

APP - proteína precursora amiloide do inglês *amyloid precursor protein*

apoE - Apolipoproteína E

ARN - ácido ribonucleico

ATP - adenosina trifosfato

BHE - barreira hematoencefálica

DA - doença de Alzheimer

DN - doenças neurodegenerativas

EROs - espécies reativas de oxigénio

MAPT - proteína tau associada a microtúbulos do inglês *microtubule-associated protein tau*

mv - milivolt

NLC - transportador lipídico nanoestruturado do inglês *nanostructured lipid carrier*

Nm - nanómetro

OMS - organização mundial da saúde

PEG - polietilenoglicol

PdI - índice de polidispersão

PSEN1 - presenilina 1

PSEN2 - presenilina 2

SLN - nanopartículas lipídicas sólidas do inglês *solid lipid nanoparticles*

SNC - sistema nervoso central

1. Introdução

As doenças neurodegenerativas (DN) são um grupo de doenças cujos sintomas afetam de forma irreversível o sistema nervoso central (SNC) causando, de forma lenta e progressiva, degeneração e disfunção em determinadas células cerebrais. Além do impacto na vida dos doentes, estas patologias também afetam negativamente o quotidiano dos familiares e cuidadores dos mesmos. Este grande grupo de distúrbios neurológicos é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade da população idosa (mais de 65 anos) a nível mundial.¹ Existem diversos tipos de DN, mas, as mais comuns são a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer (DA). As causas por detrás destas doenças ainda não são completamente compreendidas nem conhecidas, pressupõe-se apenas o mecanismo fisiopatológico envolvido em cada uma delas. Sabe-se, no entanto, que o maior fator de risco para o aparecimento de DN é a idade, visto que a sua incidência tem crescido paralelamente ao aumento da esperança média de vida. Os sintomas das DN variam consoante a doença em causa, sendo os mais comuns a perda de memória, a diminuição da função cognitiva, tremores, a diminuição da coordenação motora e dificuldades na fala.²

As DN representam cada vez mais um grande desafio para a medicina e para a sociedade no geral, devido à lacuna que ainda há no que toca à existência de tratamentos direcionados especificamente para a cura destas doenças. Atualmente não existe cura para a maioria das doenças do foro neurológico; os poucos tratamentos que efetivamente existem no mercado estão direcionados apenas para o controlo dos sintomas, na tentativa de travar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida dos doentes. Assim, é com carácter urgente que a comunidade científica global trabalha para tentar compreender os mecanismos por detrás das DN, para que seja possível desenvolver terapias eficazes e curativas, bem como capacitar a sociedade para melhor lidar com patologias deste tipo.³

A DA é a forma mais comum de demência e afeta maioritariamente a população com idade igual ou superior a 65 anos, sendo que a sua prevalência aumenta com a idade. Esta patologia representa cerca de 60%-80% de todos os casos de demência a nível mundial. A doença surge no seguimento da acumulação de placas de proteína β -amilóide e, também, de emaranhados de fibra originados pela hiperfosforilação da proteína *tau*. Para além do papel da hereditariedade, outros fatores de risco para o desenvolvimento de DA são as doenças vasculares, hábitos tabágicos e a *Diabetes Mellitus*. A DA pauta-se por

uma perda de memória gradual, comum a todos os doentes, e em casos mais extremos, também se pode manifestar sob a forma de sintomas motores. Além de não existir atualmente cura para a DA, também não existe um meio de diagnóstico suficientemente rigoroso. Atualmente, a forma mais comum para a possível identificação desta patologia é a análise de biomarcadores presentes no cérebro humano, como a acumulação de placas de proteína β -amilóide e resíduos de proteína *tau* hiperfosforilada.⁴

Como já referido, atualmente não existe cura para a DA. Isto prende-se não só com o fato de não se conhecer por completo a etiologia da doença, mas também com a dificuldade em conseguir fazer com que um fármaco atravesse a barreira hematoencefálica, para que possa atingir o alvo terapêutico.⁵

A barreira hematoencefálica (BHE) tem como função proteger toda a estrutura cerebral, impedindo que fármacos, toxinas ou outras substâncias de origem exógena que estejam em circulação alcancem o cérebro. Assim, a BHE desempenha um papel fundamental na regulação do fluxo de substâncias que atinge ou não o SNC.⁶ Para que seja possível reverter ou travar a progressão da DA é então necessário que os fármacos consigam atravessar a BHE e, para tal, precisam de possuir determinadas características físico-químicas, como elevada lipofilia. Para tentar ultrapassar esta barreira, começaram a desenvolver-se estratégias com o intuito de desenhar novas formulações que permitam aos fármacos chegar diretamente ao local-alvo, conseguindo ultrapassar os obstáculos.⁷ É neste contexto que surgem abordagens de incorporação dos fármacos em nanopartículas, com o intuito de utilizar estas últimas como transportadores do fármaco até ao seu local de ação, sem que se verifique retenção na BHE, nem efeitos adversos devidos à absorção para a corrente sanguínea.

2. Objetivos

Esta monografia tem como principal objetivo apresentar uma revisão bibliográfica sobre a terapêutica da Doença de Alzheimer, revendo as informações existentes na literatura relativas a terapêuticas alternativas à via oral. Nomeadamente, será explorada a veiculação de fármacos através de uma via direta entre o nariz e o cérebro com recurso à utilização de nanossistemas como sistemas transportadores dos fármacos, realizando uma discussão sobre a utilidade das novas tecnologias para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Os sistemas descritos ao longo da presente dissertação são exclusivamente os nanossistemas lipídicos uma vez que são os mais prevalentes na literatura.

3. Métodos

A presente dissertação foi elaborada por revisão bibliográfica da literatura referente a doenças neurológicas, à patologia de Alzheimer e a sistemas de veiculação de fármacos compostos por nanopartículas. De forma restringir a informação existente, a pesquisa bibliográfica incidiu apenas nos nanossistemas lipídicos. Para a sua elaboração foram utilizadas informações de variados artigos científicos publicados em plataformas como *PubMed* e *Elsevier*. A pesquisa bibliográfica foi feita com base em alguns termos como “*alzheimer disease*”, “*nasal anatomy*”, “*drug delivery systems*” e *nanotechnology*”.

A informação recolhida e sistematizada ao longo de toda a monografia encontra-se devidamente citada e referenciada.

4. Doença de Alzheimer

A DA – nome dado em homenagem ao psiquiatra alemão Alois Alzheimer que, em 1907, a definiu e caracterizou – é a forma mais comum e também a mais associada à demência.⁷ De acordo com a Associação Portuguesa de Alzheimer, o estado de demência é o declínio cognitivo do cérebro humano que afeta a sua capacidade de realizar tarefas diárias simples e que abrange sintomas como a perda de memória, diminuição da capacidade intelectual e do raciocínio, distúrbios nas competências sociais e oscilações emocionais.⁸

A DA é definida como uma neurodegeneração gradual de diversas áreas do cérebro, principalmente a nível da região do córtex e do hipocampo. Crê-se que esta degeneração cerebral se deve à acumulação da anormal produção de proteína β -amilóide, que é proveniente de um inadequado processo proteolítico da proteína precursora amilóide (APP) que é uma proteína transmembranar expressa principalmente nos tecidos do SNC, e de proteína *tau* hiperfosforilada. O excesso de proteína β -amilóide conduz à formação de uma estrutura denominada de placas senis, enquanto que a hiperfosforilação da proteína *tau* resulta em emaranhados de fibras. Como resultado da acumulação de ambas as estruturas, observa-se em geral uma diminuição do tamanho do cérebro, como ilustrado na figura 4.1.⁹

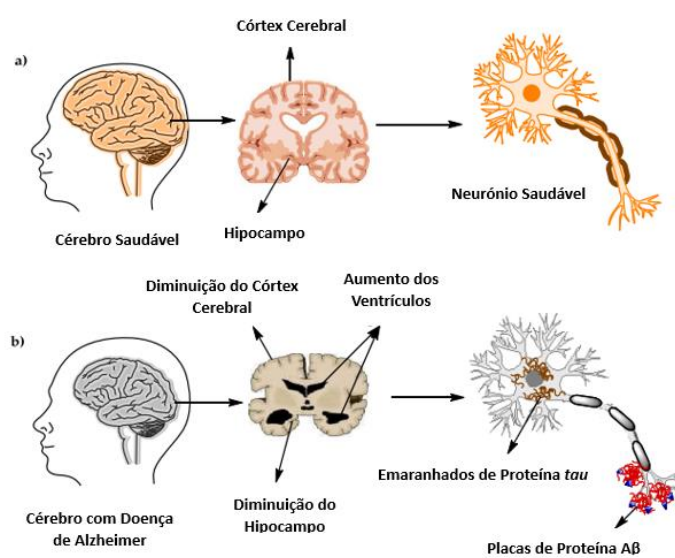


Figura 4.1 - Distinção entre o cérebro saudável (a) e o cérebro com doença de Alzheimer (b). Adaptado de (7).

O diagnóstico da DA é ainda bastante complexo e, até à data, não existem testes laboratoriais ou de imagem que permitam estabelecer um diagnóstico indiscutível. Contudo, é possível reconhecer características associadas a esta patologia através de ressonâncias magnéticas, testes neurológicos ou análises laboratoriais com doseamento da vitamina B12. Esta vitamina é importante, uma vez que o seu défice faz elevar os níveis de homocisteína, que é um aminoácido que poderá causar stress oxidativo nas células cerebrais. Além de exames, também poderá ser realizado um possível diagnóstico com base nos seguintes sintomas: afasia, apraxia e agnosia, tudo termos que remetem para a perda de capacidades em determinados campos.⁷

A DA pode ser dividida em fases distintas: a fase pré-clínica, a fase caracterizada por um ligeiro comprometimento cognitivo e, por fim, no último nível da doença, a fase tardia. A primeira fase, também denominada de pré-sintomática, pode durar vários anos e é caracterizada por ligeiras falhas de memória. A identificação de biomarcadores como a baixa quantidade de proteína amiloide e o aumento dos níveis de proteína *tau* no líquido cefalorraquidiano indicam a possibilidade da existência da DA, apesar de não serem específicos apenas dessa patologia. A segunda fase é onde surge um variado conjunto de sintomas como a falta de autonomia no dia-a-dia e um comprometimento tanto a nível da memória como do domínio da linguagem. Por fim, no último nível da doença, o córtex cerebral é totalmente abrangido pelas placas senis e pelos emaranhados de fibras desencadeando perdas funcionais e cognitivas em que os doentes deixam totalmente de conseguir fazer as necessidades básicas como engolir ou urinar e acabam por falecer.^{7,10}

4.1 - Epidemiologia

A epidemiologia é uma ciência imprescindível no ramo da Saúde Pública uma vez que permite compreender a distribuição de uma doença em determinadas populações e, ao mesmo tempo, fornece dados importantes que podem ser úteis na prevenção dessas mesmas doenças. Esta ciência recorre, principalmente, a dois conceitos fundamentais: a incidência, que permite aferir a taxa de ocorrência de novos casos de uma doença, e a prevalência, que indica a quantidade de indivíduos com determinada doença.

Como descrito no capítulo anterior, a DA é a forma mais comum de demência a nível mundial na população idosa, representando cerca de 75% dos casos de demência relatados. É uma doença em expansão uma vez que se estima que no ano de 2030 a população com idade igual ou superior a 65 anos, seja cerca de 1 bilião. O Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doença prevê que a cada ano sejam registados entre 5-7 milhões de novos casos de DA, associados à população idosa. Na realidade, com o aumento da esperança média de vida, espera-se que também a prevalência da DA aumente.¹¹

Estudos realizados em Espanha indicam que a prevalência da DA, para uma população com 65 anos ou mais, varia entre 5,5%-5,8% enquanto que, para uma população com idade igual ou superior a 70 anos, o intervalo de casos relatados será entre 8,5%-9,4%. No continente Americano foi realizado um estudo em 6 países pertencentes à América Latina, entre os anos de 1997-2007. Os resultados do estudo revelaram uma prevalência da DA de cerca de 7,1% na população com idade igual ou superior a 65 anos.¹²

Devido à estreita relação entre o aumento da população idosa e a DA, crê-se que esta patologia se torne, cada vez mais, um problema não só individual, mas também de saúde pública. Projeções demográficas realizadas nos Estados Unidos preveem que até ao ano de 2050 existam mais de 13,8 milhões de indivíduos diagnosticados com DA.¹³

No que toca à incidência, e de acordo com um estudo de meta análise a dados previamente recolhidos, constatou-se que a incidência desta patologia no sul do continente Europeu, nomeadamente na Grécia, Itália e Espanha, foi de 8,97 casos por cada 1000 pessoas no espaço de um ano, enquanto que, a norte da Europa, em países como a França, a Suécia e a Dinamarca, a incidência revelou ser maior, catapultando-se para um valor de 15,94 casos por cada 1000 pessoas, também no espaço de um ano. Tanto

no norte como no sul da Europa, foram verificados mais casos de DA no sexo feminino do que no sexo masculino.¹⁴

Dados epidemiológicos a nível mundial revelam que a demência (todos os tipos) é a quinta principal causa de morte, sendo que no ano de 2016 cerca de 4,4% das mortes globais podem ser atribuídas à demência. Com recurso a índices de cálculo específicos, verificou-se que no ano de 2013, na Europa, dos óbitos registados associados à demência, cerca de 45,2%, por cada 100000 habitantes, foram causados pela DA. Por outro lado, nos Estados Unidos da América, no ano de 2017, o valor sobe para 46,4% por cada 100000 habitantes.¹⁵

Apesar de Portugal carecer de estudos epidemiológicos relativos à demência e à própria DA, é possível retirar algumas conclusões específicas para o país com base nos dados da *Alzheimer Europe 2019*, que compara o número de pessoas com demência em 2018 e faz uma previsão desse número para os anos de 2025 e de 2050.¹⁶

Por observação direta do gráfico da figura 4.2, é possível aferir que no ano de 2018 existiam 193 516 pessoas com demência, das quais 59 989 eram do sexo masculino e 133 527 pertenciam ao sexo feminino. De salientar que o número de casos aumenta exponencialmente com o aumento da idade. Com base nas projeções realizadas estima-se que no ano de 2050, o número de casos de demência aumente mais do dobro, alcançando os 346 905 casos; como demonstrado no gráfico a abaixo onde é estabelecida uma relação entre o número de casos de demência e o número de habitantes em Portugal.¹⁶

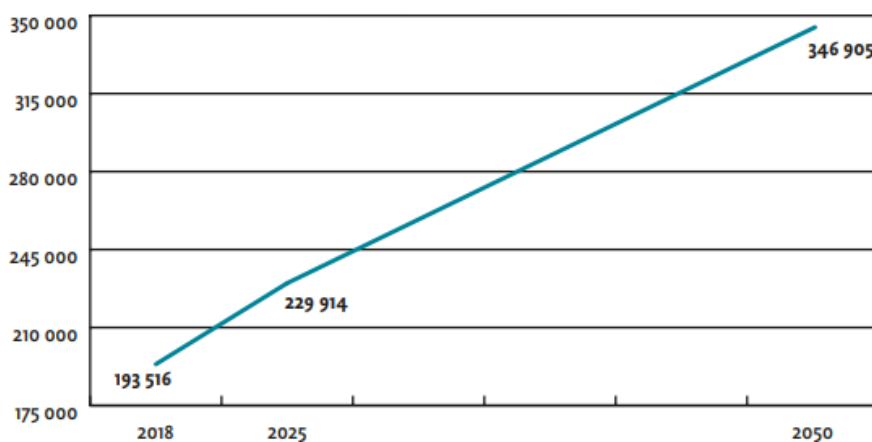


Figura 4.2 - Comparação entre o número de pessoas com demência em Portugal desde 2018 até 2050. Adaptado de (16).

Numa revisão sistemática, de estudos de prevalência da demência e da DA a nível europeu, autores portugueses tentaram adaptar à população portuguesa os valores obtidos nos países europeus vizinhos. Assim, os resultados, datados de 1994, revelaram que dos cerca de 9 milhões de habitantes em Portugal no ano de 1991, 92 470 sofriam de demência, dos quais 48 706 tinham DA.¹⁶ Por fim, de acordo com escassos dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Estatística, no ano de 2012, registaram-se cerca de 1740 óbitos associados à DA, representando 16,6 mortes por cada 100000 habitantes.¹⁷

4.2 – Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

O estudo da fisiopatologia de uma doença é bastante importante uma vez que permite perceber que tipo de mecanismos patológicos e inflamatórios ocorrem, para posteriormente se poderem estabelecer estratégias de cura ou prevenção.

Como já descrito anteriormente, a DA é uma doença crónica que afeta a parte cognitiva e comportamental do doente. O mecanismo inflamatório desta doença ainda não está completamente claro, mas atribui-se o seu desenvolvimento a um conjunto de mudanças fisiológicas e não a um único fator. Assim, os mecanismos fisiopatológicos associados à DA compreendem a acumulação de proteína β -amilóide, a formação de emaranhados de fibras e o stress oxidativo celular.¹⁸

O mecanismo patológico essencial ao desenvolvimento da DA é a acumulação de placas de proteína β -amilóide; esta proteína surge após mecanismos de clivagem que podem ser feitos através da via não amiloidogénica ou da via amiloidogénica. A via não amiloidogénica inicia-se através da metabolização da APP pela enzima α -secretase, originando o fragmento C-terminal α (CTF α) e o fragmento solúvel α da APP (sAPP α), ao invés de proteína β -amilóide. Ambos os fragmentos possuem funções neuroprotetoras e de regulação da plasticidade sináptica, não sendo tóxicos a nível cerebral.¹⁹ Por outro lado, a via amiloidogénica vai dar origem à proteína β -amilóide e, conseqüentemente, à DA. Nesta via a APP é clivada sequencialmente pelas enzimas β -secretase, também denominada de BACE-1, e γ -secretase. Após a primeira clivagem é libertado o fragmento solúvel β da APP (sAPP β) que irá, de seguida, ser metabolizado pela γ -secretase. Esta última enzima resulta do conjunto de várias proteínas, onde se destacam a presenilina 1 (PSEN 1) e a presenilina 2 (PSEN 2). A γ -secretase é menos precisa do que as enzimas descritas anteriormente e, da sua clivagem, resulta um grupo heterogéneo de péptidos a nível da cadeia terminal, onde surgem as isoformas da proteína β -amilóide com 40 aminoácidos, em maior abundância, e com 42 aminoácidos, em menor quantidade. Ora, a forma com 42 aminoácidos ao ser superior, em termos de tamanho, irá ser mais hidrofóbica e terá maior facilidade em acumular-se no cérebro sob a forma de placas senis.²⁰

Assim, a teoria da cascata amilóide surge como processo mais provável ao desenvolvimento da DA. As placas senis resultam do agregado de proteína amilóide, e

vão acumular-se em diversas regiões do cérebro impossibilitando a comunicação entre neurónios, o que resulta na diminuição de funções cognitivas, e no desencadeamento de processos inflamatórios, que poderão estar na origem da neurodegeneração.²¹

Como anteriormente referido, outro dos processos inflamatórios que origina a DA, é a formação de emaranhados de fibras provenientes da hiperfosforilação da proteína *tau*. Esta proteína tem como principais funções a formação e a estabilização dos microtúbulos, que são estruturas que constituem o citoesqueleto das células eucarióticas. Estas pequenas estruturas são de extrema importância nos neurónios uma vez que são responsáveis pela transmissão de sinais para outras células; se as funções da proteína *tau* estiverem comprometidas, também a condução da informação nas células nervosas estará. A proteína *tau* é geralmente hidrofílica, e solúvel, e é codificada pelo gene da proteína *tau* associada a microtúbulos (MAPT), que se encontra no cromossoma 17 do genoma humano.²²

Durante o processo de codificação são expressas seis formas diferentes da proteína *tau*, devido ao processo de combinação, do inglês *splicing*, do gene MAPT de forma a que exista uma maior diversidade proteica. Quando este processo causa a deleção do décimo exão do mRNA do gene MAPT, vai originar a forma 3R da proteína *tau*; por outro lado, se o processo não excluir esse décimo exão, obtém-se a forma 4R da proteína *tau*, que tem mais afinidade pelos microtúbulos do que a forma 3R. Para existir um equilíbrio funcional é importante que a expressão das formas 3R e 4R exiba um rácio de 1:1, se este equilíbrio for quebrado surgem, então, patologias associadas à proteína *tau*, como é o caso da DA.²³

Um dos processos pós-traducionais que a proteína *tau* sofre é o processo de fosforilação, realizado por quinases e fosfatases específicas para esta proteína. A *tau* quinase adiciona um grupo fosfato à proteína *tau*, enquanto que a fosfatase *tau* retira um grupo fosfato. A fosforilação é importante uma vez que permite que a proteína *tau* se solte dos microtúbulos. Assim, um desequilíbrio nos mecanismos de fosforilação culmina numa hiperfosforilação da proteína *tau*, que dá origem a um maior número de fibrilhas que se vão agregar, perdendo a sua solubilidade, e formar emaranhados de fibras, do inglês *Neurofibrillary Tangles (NFT's)*.²⁴

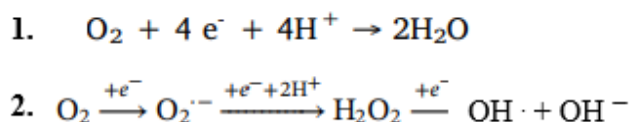
Apesar de ainda não estar devidamente comprovado, acredita-se que tanto o stress celular como a própria proteína amilóide possam induzir os processos de hiperfosforilação na

proteína *tau*. A proteína *tau* possui cerca de 441 aminoácidos e, em processos equilibrados num cérebro saudável, vão ser fosforilados apenas 3 desses aminoácidos; em contraste com o cérebro da DA, e num desequilíbrio entre os processos de fosforilação, o número de aminoácidos fosforilados sobe para 9.²⁵

Por fim, também o stress oxidativo poderá estar na origem do desenvolvimento da DA. O termo “stress oxidativo” surgiu na década de 1950, por Denham Harman, e aplica-se ao desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigénio (EROs) e a capacidade que o corpo humano tem de as neutralizar com recurso a processos e moléculas antioxidantes. Este tipo de molécula pode ter origem endógena ou exógena e atua pela inibição, ou atraso, da oxidação de um determinado substrato. Os EROs surgem como subprodutos dos normais processos metabólicos a nível celular, como é o caso dos processos oxidativos e da produção de energia pelas mitocôndrias.²⁶

As mitocôndrias são a principal fonte de EROs uma vez que são os organelos responsáveis pela produção de energia a nível celular, processo a partir do qual surge a maioria dos radicais livres. O stress oxidativo a nível destes organelos poderá conduzir a um desequilíbrio nas reações químicas de oxidação e de redução (reações redox), com uma maior produção de radicais livres que irão danificar o ácido desoxirribonucleico (ADN) das mitocôndrias, culminando numa maior produção de EROs. Esta e outras interações, vão contribuir para o desenvolvimento de inúmeras patologias como é o caso da DA.²⁷

A produção de energia, é um dos processos celulares vitais característicos de todos os seres vivos que é mediado por reações redox com o objetivo de obter adenosina trifosfato (ATP), que é a principal fonte de energia dos seres vivos. As referidas reações descrevem-se abaixo:



Na primeira reação redox (1), o O₂ vai receber 4 eletrões e 4 protões para dar origem a 2 moléculas de água. Por outro lado, na reação (2) ocorre uma redução parcial do oxigénio, dando origem ao anião O₂^{·-}, a peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e a um radical livre OH[·]. Todas estas moléculas parcialmente reduzidas pertencem ao grupo dos EROs.²⁸

Por outro lado, a oxidação molecular associa-se à DA na medida em que irá comprometer a integridade da membrana dos neurónios. Este comprometimento surge após a oxidação de lípidos, como o colesterol que está presente nas membranas, e de outros componentes como proteínas e ácidos nucleicos. A degradação das proteínas presentes no cérebro pode ocorrer nas proteínas citoplasmáticas e/ou nas proteínas membranares. Uma das proteínas mais afetadas é a proteína recetora de lipoproteínas de baixa densidade (LRP1), que se localiza na membrana celular, e que desempenha um papel importante em várias funções biológicas. Uma das suas funções é precisamente a remoção de proteína β -amilóide através de mecanismos de efluxo através da BHE. Ora, se a LRP1 se encontrar comprometida, devido aos processos de oxidação, vai existir um défice na remoção de proteína β -amilóide e a sua conseqüente acumulação.²⁹ A peroxidação lipídica, processo através do qual os EROs oxidam os ácidos gordos presentes nas membranas celulares, também contribui para o desenvolvimento da DA. Da peroxidação lipídica resultam vários produtos, nomeadamente o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), que vai causar alterações na conformação da proteína *tau*, aumentando a probabilidade desta se agregar e formar emaranhados de fibras.³⁰

Após observação e avaliação de inúmeras proteínas em cérebros de doentes de DA verificou-se que as que estavam envolvidas nos processos de metabolismo da glicose, também eram afetadas pelo stress oxidativo, resultando em anomalias no transporte e catabolismo da glicose. Assim, é importante salientar que devido ao stress oxidativo nos doentes de DA, é possível estabelecer uma relação de causa efeito entre este tipo de demência e a *Diabetes Mellitus*. Além disso, a hipótese do stress oxidativo ganhou ainda mais ênfase quando se percebeu que existiam iões metálicos (como o ferro, o zinco, o cobre e o cálcio) acoplados a placas senis. O cobre e o ferro têm propriedades que lhes permitem complexar com a proteína β -amilóide e formar complexos que vão aumentar a produção de EROs, estabelecendo assim a relação direta entre o stress oxidativo e DA.³¹

4.3- Causas e Fatores de Risco

A DA, ou o Alzheimer como é comumente designada, é uma doença transversal à população mundial e, como tal, é importante identificar e conhecer os fatores que possam aumentar o risco de desenvolvimento da patologia, de forma a tentar instituir estratégias ou terapêuticas focadas na prevenção da doença.

Até ao momento, apesar de ainda não se conhecerem totalmente as causas desta patologia, a hipótese mais credível é a da teoria da cascata amilóide, que foi explicada anteriormente. Além dos mecanismos patológicos da doença, acredita-se que existam outros fatores que possam aumentar a suscetibilidade à doença, como o estilo de vida adotado por cada indivíduo. À medida que o cérebro de um indivíduo envelhece verifica-se a diminuição do seu volume, o aumento dos seus ventrículos e a perda da capacidade sináptica entre neurónios. A questão genética também mostrou ser preponderante, uma vez que a DA pode ser causada por disfunções em vários genes, as quais poderão ser hereditárias.³²

A DA pode manifestar-se de forma precoce, antes dos 65 anos, ou de forma tardia, após os 65 anos de idade. De acordo com estudos de *Ballard et al (2011)*, cerca de 70% do risco de desenvolver DA é atribuído à genética. A forma precoce desta patologia surge devido a mutações nos genes da APP e nos genes da PSEN1 e da PSEN2. A forma tardia da doença manifesta-se devido a um polimorfismo no gene da apolipoproteína E (apoE).³³ As mutações no gene da APP levam ao aumento do rácio de equilíbrio entre as formas com 40 e com 42 aminoácidos, produzindo em maior quantidade a forma com 42 fragmentos que se acumula e origina as placas senis. Além disso, verificou-se que como o gene da APP se localiza no cromossoma 21 do genoma humano os indivíduos com trissomia 21, a comumente conhecida Síndrome de Down, têm uma maior probabilidade de desenvolver a DA. Por outro lado, mas com o mesmo resultado, as mutações nos genes da PSEN1 e da PSEN2 vão também induzir a maior produção da isoforma com 42 aminoácidos, uma vez que ambas as proteínas compõem o complexo enzimático da γ -secretase, responsável pela clivagem da APP.³⁴ A apoE desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico e no transporte de lipoproteínas no organismo humano. É codificada no cromossoma 19 do genoma humano e possui três variantes: apoE*2, apoE*3 e apoE*4. A forma apoE*2 demonstrou exercer um papel protetor a nível cerebral, apesar de não evitar a neurodegeneração. A apoE*3 é a variante neutra

desta proteína para doenças neurodegenerativas. Por fim, a forma apoE*4 aumenta o risco de desenvolvimento de doenças neurológicas, nomeadamente da DA, uma vez que tem a capacidade de se ligar às proteínas β -amilóide, promovendo a sua acumulação.³⁵

Alguns estudos e ensaios clínicos demonstraram a existência de uma correlação direta entre hemorragias cerebrais e manifestações da demência. As conclusões obtidas sugerem que as hemorragias possam diminuir o fluxo sanguíneo cerebral e causar uma disfunção na BHE. Como consequência destas disfunções, surge não só a acumulação de toxinas, pois estas ultrapassam facilmente a BHE, como também o aumento da expressão de APP, culminando no conseqüente aumento de proteína β -amilóide e sua acumulação sob a forma de placas senis no cérebro. Por conseguinte, a acumulação de proteína β -amilóide desencadeia não só uma hipoperfusão sanguínea (menor aporte de sangue) como também o processo de hiperfosforilação da proteína tau e subsequente formação dos emaranhados de fibras.³⁶

Em oposição a fatores de risco genéticos, que foram adquiridos hereditariamente, existem fatores de risco que surgem associados a determinados comportamentos e estilos de vida. Neste grupo encaixam-se todas as comorbilidades como a diabetes, a hipertensão arterial, a obesidade, doenças cerebrovasculares e dislipidemias. A hipertensão arterial cria uma pressão sanguínea superior ao normal nos vasos sanguíneos, incluindo os vasos sanguíneos cerebrais, o que culmina na diminuição da integridade da BHE. Os diabetes surgem também como um fator de risco uma vez que a resistência à insulina pode contribuir para a acumulação de proteína β -amilóide a nível cerebral.³⁷

5. Terapêutica da Doença de Alzheimer

Apesar dos largos anos de investigação e estudo da DA, a doença ainda não tem cura, existindo apenas tratamentos sintomáticos e que permitem retardar o desenvolvimento da doença.³

Estabelecer um tratamento curativo requer ultrapassar alguns obstáculos, como:

1. A necessidade de realizar um **diagnóstico o mais precocemente possível**, o que é bastante complicado dada a natureza subtil dos sintomas iniciais que podem simplesmente ser confundidos com o normal envelhecimento do indivíduo;⁷
2. A **rápida progressão da doença**, aliada a um diagnóstico tardio impossibilita grande parte dos tratamentos e faz com que a única estratégia seja apenas o alívio dos sintomas;⁷
3. A **falta de eficácia dos fármacos** atualmente utilizados para o tratamento desta patologia uma vez que não parecem ter a mesma eficácia em todos os doentes e os seus efeitos parecem ser momentâneos.⁷

Por último, o maior obstáculo que surge associado a esta patologia é a **barreira hematoencefálica** e a dificuldade que existe na passagem dos fármacos através desta barreira fisiológica, impedindo que seja alcançado o principal alvo terapêutico, o cérebro.⁵

5.1- Terapêutica Convencional da Doença de Alzheimer

As características fisiopatológicas inerentes à DA, como a formação de placas senis e de emaranhados de fibras, conduzem à perda de sinapses entre neurónios. Esta disfunção cerebral está associada a falhas no sistema colinérgico, que é um dos sistemas de neurotransmissão do SNC, que conduzem ao declínio cognitivo e à perda de memória. Neste momento existem apenas duas classes de fármacos disponíveis para indivíduos com DA; os inibidores da colinesterase e os antagonistas do recetor N-metil-D-Aspartato (NMDA).³⁸

Os inibidores da colinesterase incluem o donepezilo, a rivastigmina e a galantamina que se aplicam a doentes em qualquer fase da doença. Relativamente aos antagonistas do recetor NMDA, o único fármaco utilizado é a memantina que, além de inibir o recetor NMDA também funciona como agonista da dopamina e é utilizada em fases moderadas-severas da DA. A atual terapêutica contra a DA ainda não é curativa, permitindo apenas aliviar os sintomas experienciados pelo doente e retardar a progressão da doença. A ineficácia da terapêutica deve-se às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas inerentes aos fármacos e às vias de administração utilizadas. O equilíbrio entre a lipofilia e a hidrofobia do composto e a dificuldade na permeação da BHE após administração oral, são alguns dos fatores limitantes ao tratamento desta patologia.³⁹

5.1.1- Inibidores da Colinesterase

Os inibidores da colinesterase são uma classe farmacoterapêutica amplamente utilizada no âmbito de doenças do foro neurológico e o seu mecanismo de ação passa pela inibição da ação da enzima colinesterase, que está presente no nosso organismo e vai atuar a nível cerebral na degradação da acetilcolina. Por sua vez, a acetilcolina é um neurotransmissor de extrema importância a nível das funções cognitivas, principalmente da memória. A acetilcolina é sintetizada pelos neurónios e posteriormente libertada na fenda sináptica sempre que há a transmissão de um sinal nervoso entre células.⁴⁰

Após a sua libertação na fenda sináptica, a acetilcolina liga-se a recetores específicos do neurónio seguinte e desencadeia a transmissão do sinal nervoso. No entanto, a acetilcolina que permanece livre na fenda sináptica tem de ser degradada, pela enzima colinesterase, de forma a evitar a ativação contínua dos recetores dos neurónios.⁴¹

No cérebro de um indivíduo dito saudável, é útil que exista este mecanismo de controlo da quantidade de acetilcolina livre. Contudo, num doente com DA, devido aos danos nos neurónios e nas vias colinérgicas causados pela acumulação de placas senis e de emaranhados de fibras, já existe uma diminuição de acetilcolina na fenda sináptica, não sendo favorável a ação da colinesterase. Assim, os fármacos inibidores da colinesterase potenciam a existência de uma maior concentração de acetilcolina livre, que irá favorecer a ativação contínua dos recetores dos neurónios, contrariando os sintomas associados à DA, como a deterioração cognitiva.⁴²

5.1.2- Antagonistas do Recetor N-metil-D-Aspartato

O recetor NMDA é um dos recetores do glutamato presentes na superfície dos neurónios do organismo humano. O glutamato, além de estar associado a funções de aprendizagem e de memória, é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e encontra-se armazenado nas vesículas sinápticas dos neurónios. Durante o processo de passagem do impulso nervoso, os neurónios vão libertar o glutamato na fenda sináptica de forma a desencadear a excitação neuronal. Assim que a ligação glutamato-NMDA ocorre verifica-se o aumento da atividade neuronal. Contudo, à semelhança da acetilcolina, o excesso de glutamato leva à ocorrência de um processo de toxicidade, devido à hiperestimulação dos neurónios, e à entrada excessiva do ião cálcio (Ca^{2+}) nas células pós sinápticas.⁴³

De forma a regular o excesso de glutamato em circulação, é realizado um processo de remoção deste neurotransmissor com o principal objetivo de diminuir a toxicidade e o desenvolvimento de processos neurodegenerativos, inerentes a elevadas concentrações. Contudo, esta regulação ocorre em cérebros saudáveis, mas não em cérebros com DA.⁴⁴

Os recetores NMDA são um conjunto de substâncias que, todas juntas, formam um complexo de ligação ao glutamato. Este recetor é controlado por dois neurotransmissores: o glutamato e o ião magnésio (Mg^{2+}). O ião Mg^{2+} vai impedir a entrada de cálcio (Ca^{2+}) nas células neuronais quando estas se encontram em repouso; contudo, quando há a despolarização da membrana, o cálcio consegue entrar. O facto do ião Ca^{2+} entrar através dos recetores NMDA é de extrema importância, uma vez que essa molécula confere uma maior plasticidade sináptica aos neurónios. No entanto, e no contexto da DA, o excesso de estimulação dos recetores NMDA pelo glutamato e a conseqüente entrada de uma maior quantidade de cálcio pode causar danos neuronais. Assim, surge a necessidade de criar fármacos antagonistas destes recetores de forma a modular a sua atividade.⁴⁵

6. Cavidade nasal como via de administração de fármacos e seus mecanismos de transporte

A cavidade nasal integra o sistema olfativo e desempenha funções de extrema importância a nível fisiológico como a filtração, a humidificação, o aquecimento e o transporte do ar inspirado. As principais estruturas que compõem a cavidade nasal são os cornetos nasais, o septo nasal e o epitélio nasal. Além disso, existem duas vias estreitas e simétricas denominadas fossas nasais, separadas pelo septo nasal, que vão desde a entrada do nariz, ou seja, das narinas, até à parte mais interior da garganta. A cavidade nasal está separada da cavidade oral pelo osso palatino e é revestida por uma camada de mucosa.⁴⁶

As fossas nasais encontram-se divididas em três regiões: o vestíbulo, a zona respiratória e a zona olfatória, como representado na figura 6.1.

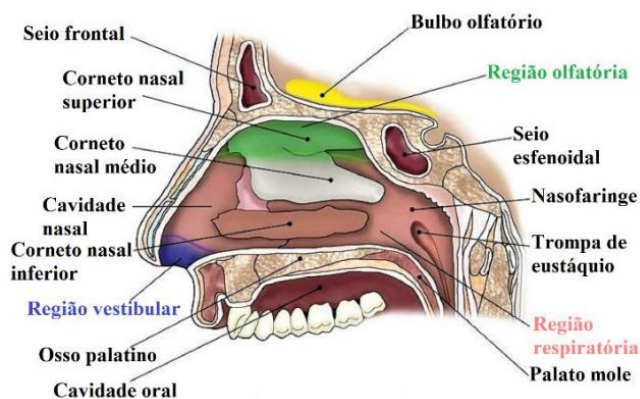


Figura 6.1 - Representação da anatomia da cavidade nasal.

O vestíbulo, ou região vestibular, é a zona mais anterior e externa das fossas nasais e localiza-se imediatamente após a abertura das narinas. É uma zona de extrema importância uma vez que é revestida por cílios nasais que têm função de proteção através da filtração do ar inspirado e de partículas indesejadas, como poeiras. A sua mucosa é composta por uma camada de células epiteliais escamosas, também com funções de proteção e, devido à pequena área de superfície, a absorção de fármacos é limitada.⁴⁷

A região respiratória abrange as paredes laterais das cavidades nasais e estende-se até aos cornetos nasais. Na parede lateral das cavidades nasais localizam-se as conchas nasais (inferior, média e superior), que são estruturas compostas maioritariamente por cartilagem com uma maior área de superfície. Tal característica, aliada ao facto de ser

uma zona bastante vascularizada, faz com que esta região seja ideal para a absorção sistêmica de fármacos e não para o sistema nervoso central. Contudo, é também na região respiratória que se localiza uma das terminações do nervo trigêmeo, que realiza uma ponte de ligação entre a cavidade nasal e o SNC. Por fim, a terceira e última região, a olfatória, localiza-se na parte superior da cavidade nasal e possui estruturas importantes, como o epitélio olfativo que desempenha um papel crucial na transmissão ao cérebro de informações relacionadas com a percepção de odores. O epitélio olfativo representa uma porta de entrada no SNC, através da cavidade nasal, uma vez que é nele que se localiza o nervo olfativo que tem conexão direta com o cérebro, através do bulbo olfatório.⁴⁸

De acordo com as características mencionadas acima, a via de administração intranasal surge em oposição à via de administração oral, uma vez que permite contornar o efeito de primeira passagem e a baixa permeabilização da BHE. Ambas as limitações fazem com que sejam necessárias administrações frequentes para garantir que a quantidade mínima de fármaco com efeito terapêutico atinge a zona desejada; a administração de uma maior quantidade de fármaco culmina num aumento dos efeitos indesejáveis. Normalmente, a administração intranasal pressupõe um tratamento local, embora a obtenção de um efeito sistémico também seja possível devido à elevada vascularização da cavidade. Contudo, a anatomia da cavidade nasal possibilita também um transporte de fármaco até ao cérebro, após absorção no epitélio olfativo ou respiratório. Após administração intranasal de uma formulação farmacêutica, ocorre absorção da mesma pela mucosa da cavidade nasal. Como se mostra na figura 6.2, se a absorção for direta, o fármaco pode seguir o trajeto do nervo olfativo ou do nervo trigêmeo para alcançar o SNC. Por oposição, se a absorção for indireta o fármaco será transportado através da circulação sistémica.⁴⁹

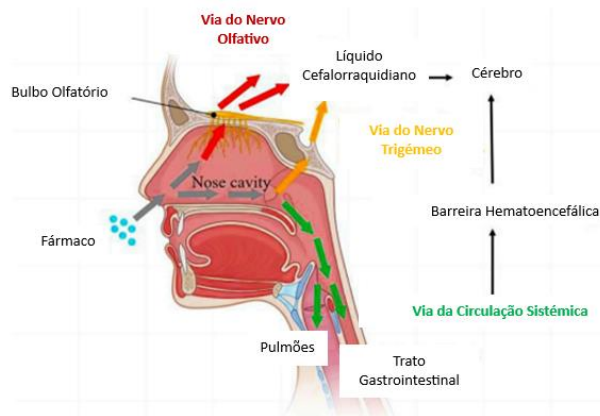


Figura 6.2 - Representação esquemática das vias de transporte de fármaco para o cérebro após administração intranasal. Adaptado de (49).

De forma que o fármaco alcance o SNC de forma direta, após a administração intranasal da formulação farmacêutica, é necessário que este seja absorvido pela camada epitelial da cavidade nasal, no caso o epitélio olfativo, com posterior transporte do epitélio para o SNC. A via do nervo olfativo é de absorção direta uma vez que permite que os fármacos sejam transportados desde a cavidade nasal até ao cérebro, sem a limitação da BHE. Conforme representado na figura 6.3, para alcançar o SNC, o fármaco pode seguir uma via direta, onde é internalizado e transportado através do neurónio (1), um processo mais lento, ou uma via exterior ao neurónio onde atravessa o epitélio olfativo (2 e 3) que é mais rápida e pressupõe transporte paracelular ou transcelular pelo próprio epitélio.⁴⁹ As características do fármaco e o tipo de formulação vão ditar a via de transporte. Por exemplo, a via do nervo olfativo é mais adequada a moléculas de maiores dimensões e com características mais hidrofóbicas, enquanto que para as vias paracelular e transcelular, as moléculas com menores dimensões e características mais hidrofílicas são preferenciais.⁵⁰

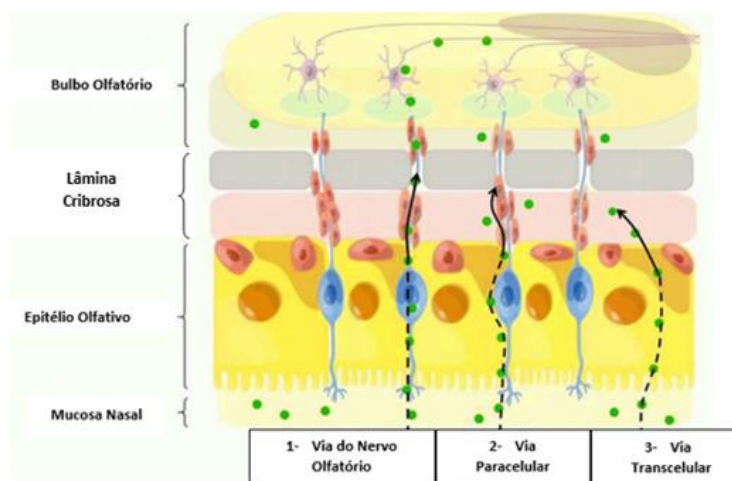


Figura 6.3 - Vias de transporte direto do epitélio olfativo para o cérebro. Adaptado de (49).

Ainda dentro da absorção direta, o fármaco também pode seguir a via do nervo trigêmeo. Este nervo apresenta três ramificações, como se mostra na figura 6.4, o nervo oftálmico (V1), o nervo maxilar (V2) e o nervo mandibular (V3). Estas ramificações inervam tanto a região respiratória como a olfatória. Assim, existe uma outra porta de entrada para o SNC através das ramificações do nervo maxilar e do nervo oftálmico, que se estendem até às células epiteliais da região olfatória e respiratória; o outro extremo do nervo trigêmeo localiza-se no tronco cerebral, como mostra a figura 6.4.⁵¹

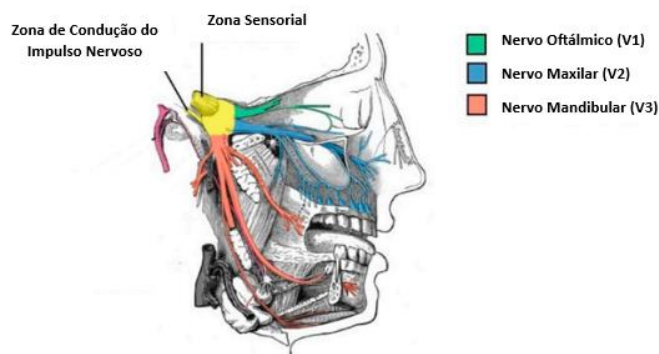


Figura 6.4 - Representação gráfica da inervação do nervo trigêmeo na face. Adaptado de (50).

À semelhança da via do nervo olfativo, também aqui o fármaco pode percorrer dois caminhos diferentes até chegar ao SNC. Após atravessar a membrana epitelial da zona respiratória, o fármaco pode ser transportado de forma intracelular, onde é internalizado pelas células do próprio nervo trigêmeo, ou de forma extracelular onde atravessa a membrana da mucosa nasal. Esta via tem sido menos abordada em detrimento da via do nervo oftálmico.⁵¹

Por fim, o tipo de absorção indireta pressupõe o transporte via circulação sistémica. Devido à elevada vascularização da mucosa nasal, o fármaco é absorvido e incorporado na corrente sanguínea e transportado ao longo de todo o sistema circulatório, até chegar ao cérebro, conforme representado na figura 6.5. Contudo, antes de integrar a corrente sanguínea, o fármaco tem de superar os processos de eliminação inerentes à cavidade nasal, como os movimentos mucociliares. Assim, a quantidade de fármaco que chega ao local desejado pode não ser a necessária para exercer efeito terapêutico, uma vez que sofre metabolização hepática e encontra limitações, como a BHE que é de difícil permeabilização, principalmente a fármacos com elevada hidrofília ou elevado peso

molecular. A esta via está também associado um maior número de efeitos adversos, devido ao aumento da exposição sistémica ao fármaco administrado.⁵²

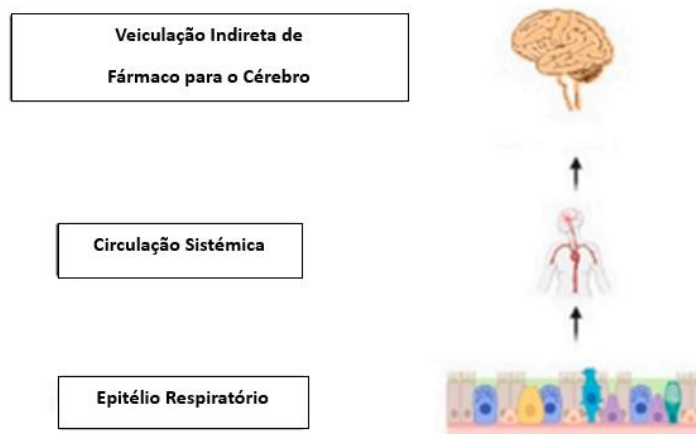


Figura 6.5 - Representação gráfica da veiculação indireta de fármaco para o cérebro. Adaptado de (50).

Como descrito ao longo deste capítulo, a via intranasal possibilita, não só a utilização de estratégias não invasivas de contorno da BHE como também uma veiculação direta do fármaco para o cérebro. Esta via de administração permite acelerar o início de ação do fármaco, evitar a metabolização do mesmo e diminuir os efeitos adversos associados à exposição sistémica, característica da via de administração oral. Contudo, existem alguns obstáculos, inerentes à cavidade nasal, que podem ser fatores limitantes à absorção de fármacos.⁵³ A tabela 6.1 resume, e compara, as vantagens e desvantagens do uso da via de administração intranasal.

Tabela 6.1 - Vantagens e desvantagens da via de administração intranasal. Adaptado de (50).

Vantagens	Desvantagens
Não invasiva, segura e indolor	Apenas fármacos com larga margem terapêutica
Veiculação direta do fármaco para o cérebro	Pequenos volumes de administração
Evita metabolismo hepático e BHE	Sistema mucociliar e degradação enzimática
Menor risco de efeitos adversos	Alterações do equilíbrio do ambiente nasal
Aumenta adesão do doente à terapêutica	Dificuldade da técnica de administração

BHE - Barreira Hematoencefálica

Assim, é necessário perceber as limitações impostas por esta via de forma a que seja possível desenvolver estratégias para as ultrapassar. Uma das restrições da via reside nos

mecanismos de eliminação e proteção da cavidade nasal, como o sistema mucociliar e a degradação enzimática. Ambos os processos limitam a absorção e a estabilidade do fármaco, uma vez que limitam o tempo de residência do mesmo, diminuindo a sua absorção.⁵⁴ Contudo, a principal dificuldade prende-se com o tamanho da cavidade nasal e consequentemente a sua área diminuta, fazendo com que exista uma limitação acentuada no volume e na quantidade de fármaco passíveis de administração. Esta limitação torna-se mais relevante quando o objetivo é a administração de moléculas com pouca solubilidade.⁵⁰ É neste contexto que têm surgido estratégias que envolvem a utilização de sistemas de veiculação de fármacos que permitem ultrapassar as limitações da via intranasal e, assim, otimizar o tratamento da DA e de outras patologias do SNC. Uma estratégia que tem acolhido bastante popularidade é a utilização de nanomedicamentos, sob várias formas, a qual vai ser detalhada nos capítulos seguintes.

7. Utilização de nanossistemas no tratamento da Doença de Alzheimer

O conceito de nanotecnologia surgiu pela primeira vez em 1959 pelo prémio nobel da física, Richard Feynman, e é uma das tecnologias mais promissoras do século XXI, com aplicação em várias áreas. Esta ciência tem a capacidade de converter moléculas e estruturas à escala nanométrica, aumentando a sua capacidade de interação.⁵⁵

É importante fazer a distinção entre os conceitos de nanociência e de nanotecnologia. A nanociência ocupa-se do estudo das moléculas à escala nanométrica enquanto que, a nanotecnologia, transpõe e aplica esse mesmo estudo para aplicações mais práticas, de âmbito tecnológico. É nesse contexto que surgem os sistemas de veiculação de fármacos à escala nanométrica.⁵⁶ Estabelecendo uma comparação, um nanómetro (nm) é o equivalente a 10^{-9} metros. O recurso às nanotecnologias tem vindo a aumentar, uma vez que permitem abrir novas portas no que toca a métodos de diagnóstico, de prevenção e de tratamento de inúmeras patologias, revolucionando áreas como a medicina e permitindo o uso de sistemas de veiculação de fármacos.^{55,56}

Apesar de tentativas anteriores de veiculação de fármaco até ao SNC, como por exemplo utilizando a via subaracnoideia, é com recurso à nanotecnologia que surgem as aplicações mais promissoras de administração de fármacos que beneficiam de uma via direta entre o nariz e o cérebro. Como discutido anteriormente, esta via direta, permite contornar obstáculos como a BHE e a baixa biodisponibilidade de alguns fármacos.⁵⁷ A possibilidade de ultrapassar essas limitações é atribuída às propriedades oferecidas pelos nanossistemas no que se refere ao seu reduzido tamanho e também a outras características físicas e químicas necessárias para alcançar o alvo, o SNC.⁵⁸

Os nanossistemas são produzidos e manipulados através de técnicas que associam a nanotecnologia à tecnologia farmacêutica. As nanopartículas são manipuladas na escala atómica e, por definição, possuem diâmetros compreendidos entre 1-100 nm; contudo, é frequente encontrar na literatura trabalhos que reportam partículas de diâmetro superior (até ao limite de 1 μm) e onde os sistemas são igualmente considerados nanopartículas. As abordagens de produção dos nanossistemas que estão descritas incluem que, de forma a ser transportado até ao local de ação, o fármaco pode ser encapsulado ou ligado à matriz da nanopartícula.⁵⁹

Existem vários tipos de materiais utilizados na produção de nanossistemas, sendo os mais frequentemente empregues atualmente os lípidos e os polímeros, originando sistemas lipídicos ou poliméricos, sendo que na presente dissertação apenas serão descritos os sistemas lipídicos. Os primeiros têm ganho bastante popularidade, utilizando lípidos tanto de origem endógena como sintética.⁶⁰ Alguns lípidos são de particular interesse, nomeadamente os de natureza biodegradável, uma vez que apresentam baixa toxicidade, e são relativamente fáceis de manipular para a produção de nanossistemas. Além disso, a possibilidade de incorporar fármacos em nanossistemas permite não só a permeação da BHE como a proteção do fármaco contra a degradação enzimática, sofrida na cavidade nasal.⁶¹

Os nanossistemas englobam diferentes estruturas, que dependem do método de produção utilizado. Na presente dissertação serão abordados os seguintes tipos de nanossistemas lipídicos: nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas.⁶¹

Os estudos que se apresentam de seguida foram escolhidos por terem chegado a ensaios *in vivo*, pela data de publicação recente e por utilizarem o donepezilo ou a memantina como fármaco.

7.1- Nanoemulsões

As nanoemulsões são formulações coloidais, termodinamicamente estáveis, de dois líquidos imiscíveis entre si. Existem dois tipos de emulsões: as de óleo-em-água (O/A) e as de água-em-óleo (A/O). As gotículas lipídicas dispersas numa fase aquosa (O/A) são de extrema importância uma vez que grande parte dos fármacos são de natureza lipofílica e, assim, terão uma melhor solubilidade e maior biodisponibilidade.⁶²

Os principais constituintes destas formulações são óleos, tensioativos e componentes aquosos. Numa emulsão uma das fases é então dispersa na outra sob a forma de pequenas gotículas, e é aqui que surge a importância de incorporar tensioativos. Os tensioativos, também conhecidos como surfactantes, possuem propriedades que lhes permitem diminuir a tensão superficial que existe entre dois líquidos imiscíveis entre si, uma vez que possuem uma parte com afinidade pela fase aquosa e uma parte mais lipofílica com afinidade oleosa; os tensioativos desempenham funções emulsificantes ao facilitarem a estabilização de determinada formulação.^{63, 64}

A produção de nanoemulsões pode ser feita através de dois processos distintos, envolvendo alta energia ou baixa energia. Os processos de alta energia envolvem ciclos sucessivos de homogeneização em alta pressão, em oposição aos métodos que envolvem menor aporte energético, em que a nanoemulsão surge após uma inversão de fases, também denominado de auto-nanoemulsificação.⁶⁵

Os fármacos utilizados atualmente na DA, como a memantina ou o donepezilo, apesar do potencial farmacológico na doença, apresentam dificuldades de permeação da BHE. As nanoemulsões têm sido utilizadas para veicular diretamente os fármacos até ao local desejado, o cérebro, através de uma administração intranasal.⁶⁶

O donepezilo é, atualmente, o tratamento de primeira linha na DA uma vez que aumenta a concentração de acetilcolina. Por ser um fármaco hidrofílico não consegue permear de forma eficiente a BHE após alcançar a circulação sistémica, chegando em pouca concentração ao local de ação após administração oral.⁶⁷ Um estudo propôs uma nanoemulsão de donepezilo para administração intranasal. A solubilidade do donepezilo foi testada em vários óleos, surfactantes e co-surfactantes, pretendendo-se a maior solubilidade possível e ausência de precipitação. Os excipientes selecionados foram um derivado do óleo de ricínio, constituído por cadeias polietilenoglicol (PEG) de

polioxi-etileno e polioxi-propileno, com propriedades emulsificantes; utilizou-se também o cloreto de cetilpiridínio que atuou como surfactante, e o glicerol que apesar de ser classificado como um álcool, complementa as funções do surfactante já que tem a capacidade de promover a retenção de água. A nanoemulsão foi produzida por homogeneização de alta pressão.⁶⁸

Numa formulação coloidal, um potencial zeta de 30 mV de valor absoluto, ou mais, considera-se atribuir estabilidade por repulsão eletrostática.⁶⁹ A nanoemulsão revelou um tamanho de 65 nm, com um PdI de 0,084 e um potencial zeta de -10,7 mv. Ensaio de libertação do fármaco realizados *in vitro* em solução salina tamponada com fosfato, fluido cerebrospinal artificial e fluido nasal artificial, indicaram libertação bastante rápida do fármaco, acima dos 96% após 2 h.⁶⁸ Nos ensaios *in vivo*, foi administrada nanoemulsão de diferentes formas para os quatro grupos de ratos estabelecidos, em quantidade equivalente a 0,09 mg de fármaco (tabela 7.1).⁶⁸

Tabela 7.1 - Descrição dos grupos de ratos utilizados. Adaptado de (68).

Grupo 1	Administração intranasal da nanoemulsão
Grupo 2	Administração intranasal de solução aquosa de fármaco
Grupo 3	Administração oral de nanoemulsão
Grupo 4	Administração intravenosa de nanoemulsão

Os resultados obtidos demonstraram que apenas os animais que receberam a nanoemulsão por via nasal tiveram fármaco distribuído para a zona cerebral, tendo permanecido 24 h no local-alvo.

A memantina, como descrito anteriormente, é um fármaco antagonista dos recetores NMDA e, como tal, ajuda a proteger as células nervosas cerebrais, atrasando a progressão da DA. Pode ser prescrita tanto em monoterapia como em concomitância com outros fármacos, como o donepezilo; é frequentemente utilizada em pacientes que se encontrem em fases moderadas a avançadas da DA. Um outro estudo descreveu uma nanoemulsão para administração de memantina por via intranasal, em ratos, também para aferir a sua eficácia no tratamento da DA na estratégia nariz para o cérebro. A nanoemulsão foi preparada através de métodos de homogeneização e ultrasonicação. Após a sua preparação foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo*. Ao avaliar as características da

nanoemulsão, verificou-se um tamanho de 11 nm, um PdI de 0,08 e um potencial zeta de $-19,6$ mV.⁹⁴

Os estudos de libertação *in vitro* foram realizados em bolsas de diálise com três soluções diferentes, tampão fosfato-salino, fluido cérebroespinal artificial e fluido nasal artificial. Os resultados encontram-se representados na figura 7.1. Por observação direta, é possível aferir que as condições que mimetizam o ambiente da cavidade nasal foram as que obtiveram maior índice de libertação de memantina.⁹⁴

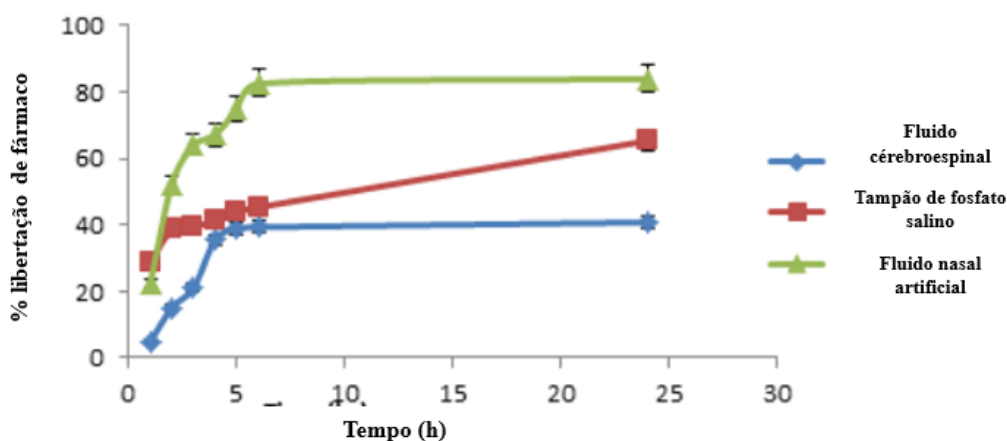


Figura 7.1 - Representação gráfica do percentual de libertação de fármaco nos testes *in vitro*. Adaptado de (94).

Relativamente aos estudos *in vivo*, os ratos foram divididos em 4 grupos:

- I. Administração de nanoemulsão de memantina por via intranasal;
- II. Administração de solução aquosa de memantina por via intranasal;
- III. Administração de nanoemulsão de memantina por via oral;
- IV. Administração de nanoemulsão de memantina por via intravenosa.

O grupo I alcançou um valor de concentração cerebral de memantina superior ao dos outros grupos; a tabela 7.2 mostra os resultados obtidos para cada grupo.⁹⁴

Tabela 7.2 - Resultados dos estudos *in vivo* para os diferentes grupos. Adaptado de (94).

	Concentração máxima cerebral (%/g)	T _{máx} (h)
Grupo I	3.6	1.5
Grupo II	2.32	1.5
Grupo III	1.14	3
Grupo IV	2.12	3

Assim, é possível afirmar que mais uma vez se verificou a eficácia das nanoformulações associadas à via de administração direta entre o nariz e o cérebro. O tamanho de 11 nm e o PdI indicam a natureza monodispersa da formulação. Os estudos farmacocinéticos demonstraram a maior concentração de memantina na região cerebral para o grupo onde se administrou o fármaco através da via intranasal e veiculado por nanoemulsão.⁹⁴

Um estudo posterior também fez uso da encapsulação de memantina numa nanoemulsão, recorrendo a uma técnica de nanoprecipitação seguida de homogeneização e ultrasonicação. Além do potencial zeta, do tamanho e PdI, existem outros parâmetros importantes de caracterizar, como a eficiência de encapsulação (EE). A EE é uma medida, calculada sob a forma de percentagem, que permite comparar a quantidade de fármaco encapsulado e a quantidade total de fármaco utilizada no processo de formulação.⁷⁴

Os resultados obtidos indicam a obtenção de uma nanoemulsão com 58 nm, potencial zeta de - 23 mV, PdI de 0,204 e EE de 89%.⁹⁵

Os estudos de libertação *in vitro* foram realizados durante 24 h em fluido cerebrospinal artificial, em fluido nasal artificial e em solução de tampão fosfato-salino. Os resultados obtidos, conforme representado na figura 7.2, demonstram que nos primeiros 30 min, a libertação de fármaco no fluido nasal foi inferior quando comparada com a libertação nos outros dois meios. Cerca de 5 h depois verificou-se a libertação máxima de fármaco, de 98-100% nos meios que mimetizavam o fluido nasal e o fluido cerebrospinal. Os resultados de libertação verificados para estes meios permitem afirmar que a nanoemulsão poderia, efetivamente, servir de meio de veiculação da memantina da cavidade nasal para o cérebro.⁹⁵

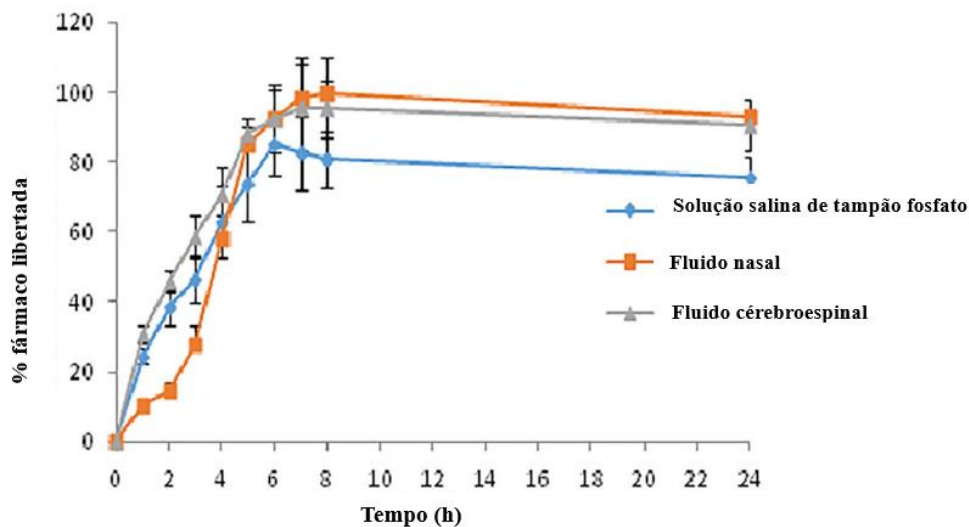


Figura 7.2 - Representação gráfica dos resultados dos testes de libertação *in vitro*. Adaptado de (95).

Os estudos farmacocinéticos *in vivo* foram realizados em ratos, em que se estabeleceram os seguintes grupos:

- I. Nanoemulsão de memantina por via intranasal;
- II. Solução aquosa de memantina por via intranasal;
- III. Nanoemulsão de memantina por via oral;
- IV. Nanoemulsão de memantina por via intravenosa.

A nanoemulsão de memantina foi radiomarcada de forma a perceber o trajeto da formulação. Após cada administração, foram selecionados tempos específicos de avaliação. Os resultados demonstraram com clareza que os ratos do grupo I tiveram uma maior concentração de memantina no local alvo, o cérebro.⁹⁵

7.2- Lipossomas

Os lipossomas são estruturas vesiculares esféricas que se formam através do auto-arranjo de componentes lipídicos como os fosfolípidos.⁷⁰ Os lipossomas podem ser constituídos por uma bicamada lipídica (unilamelar) ou várias bicamadas lipídicas (multilamelar), que envolvem um núcleo aquoso interno.⁷¹ As bicamadas lipídicas são frequentemente chamadas lamelas. A bicamada lipídica é formada por duas camadas paralelas de fosfolípidos onde as cabeças polares dos mesmos se encontram orientadas para a parte exterior e para o núcleo aquoso interno e, as caudas polares, para o interior da bicamada, conforme representado na figura 7.3. Esta organização estrutural é de extrema importância uma vez que possibilita a estes sistemas a encapsulação e o transporte de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e também anfipáticas.^{70,71}

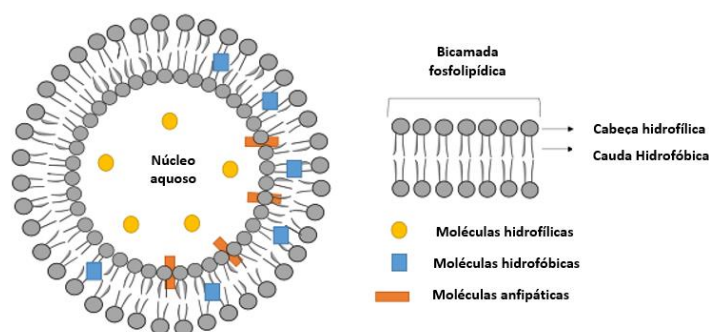


Figura 7.3 - Representação gráfica da estrutura de um lipossoma. Adaptado de (71).

Os lipossomas são sistemas de veiculação de fármacos bastante promissores devido ao facto de, dependendo dos fosfolípidos selecionados para a sua composição, poderem apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, conferem proteção ao fármaco contra eventos da cavidade nasal, como a degradação enzimática, melhorando a biodisponibilidade do mesmo.⁷²

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o número de bicamadas lipídicas: unilamelares (ULV's), oligolamelares (OLV's) e multilamelares (MLV's); ou de acordo com o número de vesículas dentro de uma única bicamada lipídica: multivesiculares (MVL's).⁷⁰ Na figura 7.4 é feita a comparação entre os tipos de lipossomas. Verificou-se que os ULV's tinham maior capacidade de encapsulação de compostos hidrofílicos, uma vez que possuem apenas uma bicamada fosfolipídica. Por outro lado, os MLV's, graças às suas múltiplas lamelas, são mais favoráveis à

encapsulação de fármacos lipofílicos. Quanto aos MVL's, o facto de possuírem várias vesículas permite-lhes a encapsulação de um maior volume de moléculas hidrofílicas.⁷³

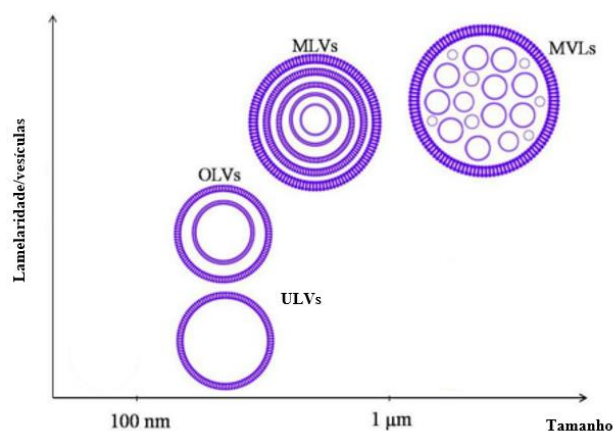


Figura 7.4 - Comparação dos lipossomas de acordo com a lamelaridade e número de vesículas. Adaptado de (70).

A maioria das técnicas de produção de lipossomas envolvem a dissolução de fosfolípidos num solvente orgânico com posterior remoção desse mesmo solvente, com formação de um filme lipídico seco.⁷⁵ A adição de uma solução aquosa (do fármaco, por exemplo), origina a formação instantânea de estruturas vesiculares, os lipossomas.⁷⁶ As técnicas mais utilizadas são a hidratação de filme lipídico fino e a evaporação em fase reversa.⁷⁵ Posteriormente, a encapsulação do fármaco pode ser feita através de métodos ativos ou passivos.⁷⁷ O método de carga ativo consiste em estabelecer um gradiente de pH ou de cargas iónicas, através da membrana do lipossoma, que impulsiona o fármaco através da bicamada lipídica.⁷³ Por outro lado, o método de carga passiva pressupõe a encapsulação do fármaco durante a produção do lipossoma, utilizando apenas as características físico-químicas do fármaco.⁷⁷ O método de hidratação de filme lipídico aproveita as próprias características dos fármacos, ou seja, se o fármaco tiver maior afinidade pela fase oleosa vai ser incorporado com os lípidos num solvente orgânico, onde há a posterior evaporação desse mesmo solvente, resultando na formação de um filme fino. Se o fármaco for mais solúvel em água, é então incorporado na fase aquosa. Por outro lado, o método de fase reversa é preferencial quando o objetivo é encapsular fármacos com propriedades hidrofílicas; esta técnica pressupõe a mistura da fase oleosa com a aquosa, de forma a criar uma emulsão, com posterior evaporação do solvente orgânico que conduz à formação de estruturas vesiculares, os lipossomas. A inversão de fases permite a incorporação da fase aquosa no interior do lipossoma, tornando-o ideal para acomodar substâncias hidrofílicas.⁷⁸

No entanto, a utilização de lipossomas como sistemas de veiculação de fármacos, tem algumas limitações como a baixa EE, a difícil produção em larga escala e o défice de homogeneidade entre os tamanhos obtidos.⁷⁶⁻⁷⁸ O maior problema deste sistema vesicular é, contudo, o baixo tempo de circulação inerente a partículas tão pequenas. De forma a evitar mecanismos de depuração da cavidade nasal e aumentar o potencial terapêutico do lipossoma, desenvolveram-se estratégias como a adição de polímeros sintéticos, mais especificamente o PEG.⁷⁹ A adição de PEG origina uma camada de proteção na superfície dos lipossomas e impede que estes sejam fagocitados por células nasais, aumenta a estabilização da formulação e melhora a sua biodisponibilidade, uma vez que permite uma maior absorção pelas mucosas devido ao aumento do tempo de permanência na cavidade nasal.⁸⁰

Um estudo que reporta uma formulação lipossomal de donepezilo para administração intranasal, utilizou diestearoilfosfatidilcolina e o método de hidratação de filme fino. Foi ainda incluído PEG e moléculas de colesterol. As moléculas de colesterol são frequentemente adicionadas a formulações lipossomais devido aos benefícios que lhes conferem. O colesterol permite uma maior estabilização da membrana uma vez que se intercala com os fosfolípidos, aumentando a sua rigidez, permitindo assim um maior controlo da libertação do fármaco.⁸³ Foram obtidos lipossomas com 102 nm, PdI de 0,28, potencial zeta de -28 mV e EE de 84,9%.

Os valores obtidos encontram-se dentro do ideal para a formulação em causa. O donepezilo é um fármaco hidrofílico, o que pode explicar o alto valor de EE. Ensaios de libertação *in vitro* realizados em fluido nasal artificial, indicaram rápida libertação do fármaco durante as primeiras 2 h que poderá estar relacionada com as moléculas de fármaco que aderiram à superfície dos lipossomas, seguido de uma estabilização da

libertação de fármaco até ao final do período de 8 h do ensaio. A figura 7.5 mostra os resultados de libertação do fármaco.

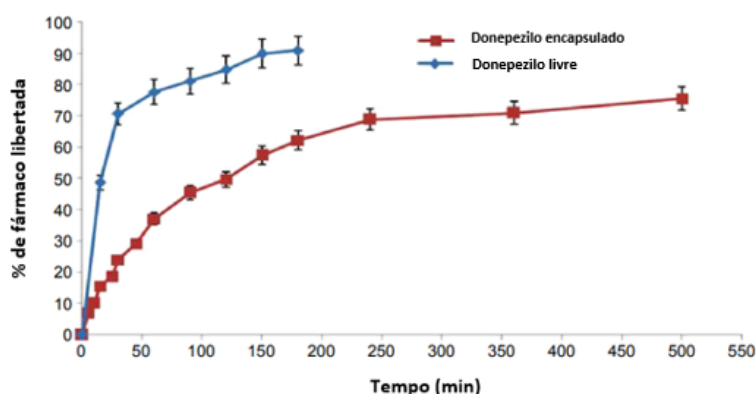


Figura 7.5 - Libertação *in vitro* do donepezilo. Adaptado de (82).

Um ensaio *in vivo* em ratos comparou a administração intranasal com a oral, com o intuito de comparar a biodisponibilidade no plasma e no cérebro para três tipos de administração: solução oral, solução intranasal e intranasal através de lipossomas. Nas tabelas 7.3 e 7.4 encontram-se resumidos os parâmetros farmacocinéticos relativos às três administrações, para o plasma e para o cérebro, respetivamente.

Tabela 7.3- Parâmetros farmacocinéticos do donepezilo no plasma. Adaptado de (82).

	Administração oral	Administração intranasal	Lipossomas
Tempo de semi-vida (horas)	4,3	4,18	5,79
Concentração máxima (ng/mL)	55,27	88,78	139,25

Tabela 7.4- Parâmetros farmacocinéticos do donepezilo no cérebro. Adaptado de (82).

	Administração oral	Administração intranasal	Lipossomas
Tempo de semi-vida (horas)	5,66	5,55	6,9
Concentração máxima (ng/mL)	111,23	146,91	214,92

Os resultados permitem afirmar que a formulação lipossomal administrada de forma intranasal é estável e aumentou significativamente a biodisponibilidade cerebral do fármaco em detrimento, por exemplo, da administração da solução intranasal. Os lipossomas conferem proteção contra os mecanismos de excreção, possibilitando um

transporte mais direcionado do fármaco e diminuindo a quantidade de efeitos tóxicos devido à reduzida exposição sistémica.⁸²

Uma formulação lipossomal de donepezilo foi proposta, com os lipossomas produzidos pelo método de injeção de solvente orgânico, onde a solução lipídica é injetada numa solução aquosa, criando um gradiente de concentração e conseqüente formação dos lipossomas. De forma a obter MLV's agitou-se a solução lipossomal durante cerca de 1 h a uma temperatura de cerca de 65 °C. De forma a facilitar a administração da formulação, os lipossomas foram incorporados num gel *in situ*, isto é, numa formulação que passa por uma transição física ou química (alteração de pH ou mudanças de temperatura) no local de aplicação e transforma-se em gel, que neste caso, irá proporcionar uma libertação mais controlada e prolongada da substância ativa, melhorando a absorção da mesma. Um hidrogel é um veículo que possui uma enorme capacidade de retenção água e é bastante semelhante aos tecidos biológicos. O tamanho de partícula obtido foi de 103 nm, com um PDI de 0,108, potencial zeta de - 30 mV e E.E de 93%.⁹²

Os testes *in vitro* foram efetuados em tecido nasal de ovelha de forma a aferir a capacidade de permeação do gel *in situ* e as vantagens que traria à formulação de lipossomas. Colocaram-se duas amostras de mucosa nasal de ovelha, numa foi administrada uma solução de donepezilo e noutra administrou-se o donepezilo encapsulado em lipossomas e veiculado através do gel. Após observação direta dos dados obtidos, pode aferir-se que tanto a encapsulação lipossomal como o gel trazem vantagens à absorção da formulação, conforme representado na figura 7.6.

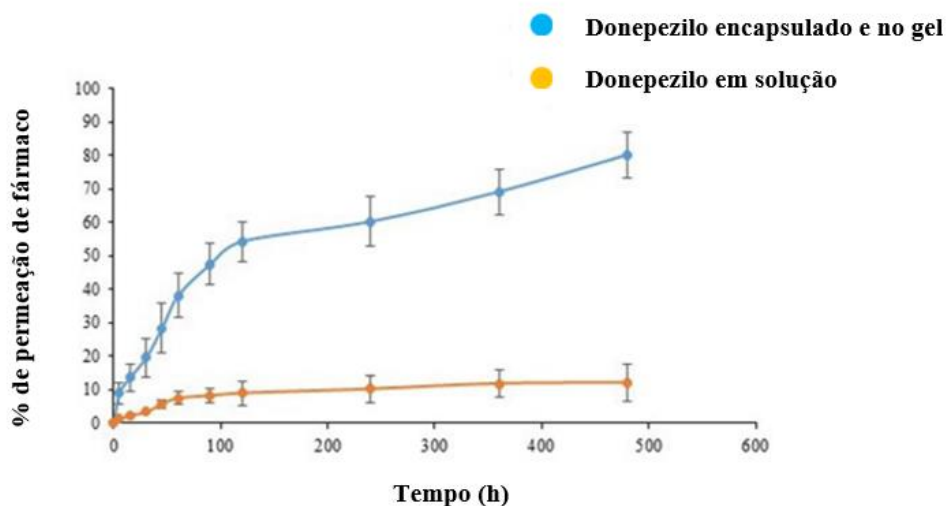


Figura 7.6 - Permeação da solução de donepezilo e da formulação lipossomal. Adaptado de (92).

Os estudos farmacocinéticos foram realizados *in vivo* em ratos divididos em dois grupos diferentes, de acordo com o tipo de administração realizada. Os ratos do grupo 1 receberam uma formulação lipossomal de donepezilo num gel *in situ* através da via nasal, enquanto os ratos do grupo 2, receberam uma formulação de donepezilo em solução, através da via oral. Aferiu-se e comparou-se os perfis de concentração *versus* tempo no cérebro e no plasma para ambos os grupos de ratos; os resultados demonstraram que a administração intranasal foi substancialmente mais direcionada para o cérebro do que a solução administrada por via oral, conforme representado na figura 7.7.⁹²

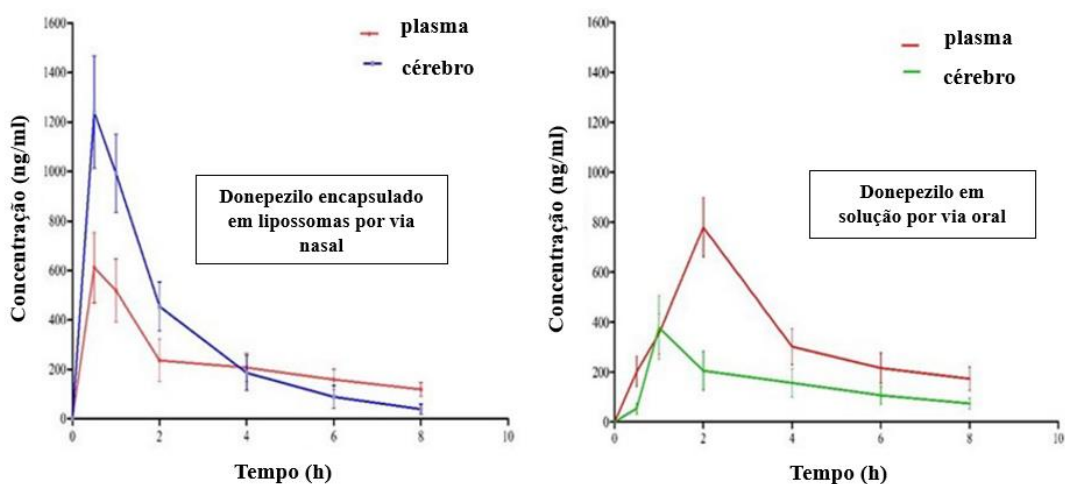


Figura 7.7 - Concentração no plasma e no cérebro para as diferentes formulações. Adaptado de (92).

Mais uma vez verificou-se não só eficácia das formulações administradas por via intranasal, como também as vantagens que o gel *in situ* pode aportar a estas formulações.

Um estudo semelhante reportou a utilização de lipossomas carregados com donepezilo e por sua vez colocados num hidrogel de quitosano. A finalidade do gel é conferir uma libertação de fármaco mais controlada. Relativamente à caracterização dos lipossomas, obteve-se um tamanho de partícula de 438 nm e uma E.E de 62,5%, não havendo referência a potencial zeta nem a PDI.⁹³

Os estudos *in vivo* foram realizados em 7 coelhos brancos da Nova Zelândia, divididos Zelândia, divididos em dois grupos: grupo 1 com 4 coelhos que receberam por via intranasal a formulação lipossomal de donepezilo dispersa no hidrogel; o grupo 2, composto por 3 coelhos, que receberam uma administração por via oral de um comprimido de donepezilo. Após ambas administrações, foram recolhidas amostras de sangue de ambos os grupos em intervalos de tempo pré-definidos. Os perfis de concentração plasmática foram traçados e encontram-se representados na figura 7.8.⁹³

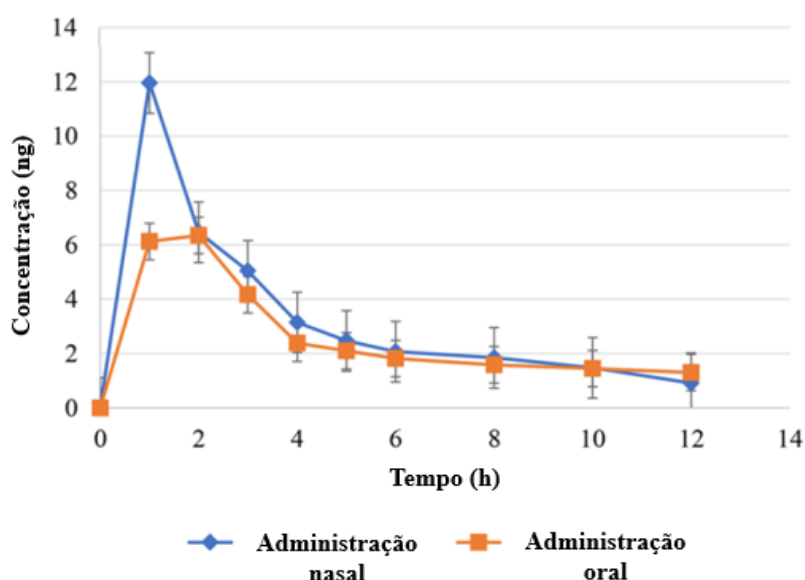


Figura 7.8 - Perfis de concentração plasmática de ambas as administrações de donepezilo. Adaptado de (93)

A concentração plasmática máxima de donepezilo provém da formulação administrada por via nasal e ocorreu apenas 1 h após a administração, alcançando um valor de 12 ng/mL, indicando a eficácia da formulação lipossomal. Avaliaram-se também alguns parâmetros farmacocinéticos para ambas as administrações e para cada um dos coelhos de cada grupo, conforme descrito na tabela 7.5. A média das concentrações do grupo que recebeu a administração intranasal foi de 37.5 ng/mL, enquanto que o grupo que recebeu administração oral, obteve apenas um valor de 18,1 ng/mL.⁹³

Tabela 7.5 - Parâmetros farmacocinéticos relativos à amostragem. Adaptado de (93)

Coelhos	Administração intranasal				Administração oral		
	1	2	3	4	1	2	3
Tempo de semi-vida (horas)	8.4	1.1	7.4	6.2	8.4	9.5	5.3
Concentração máxima cerebral (ng/mL)	29.1	52.8	34.4	33.5	4.7	16.6	33.1

7.3- Nanopartículas Lipídicas: SLN e NLC

As nanopartículas lipídicas surgem da necessidade de melhorar os problemas associados aos sistemas de veiculação de fármacos descritos anteriormente, como a baixa capacidade de carga associada aos lipossomas.⁸⁴ Dentro deste grande grupo de partículas lipídicas, existem as nanopartículas lipídicas sólidas, do inglês *solid lipid nanoparticles* (SLN) e os transportadores lipídicos nanoestruturados, do inglês *nanostructured lipid carriers* (NLC).⁸⁵ Relativamente aos métodos de produção de nanopartículas lipídicas, as técnicas mais comuns englobam processos de homogeneização a alta velocidade, tanto a frio como a quente, e métodos de injeção de solvente.⁸⁶

As SLN surgiram na década de 1990 e representam uma nova geração de sistemas de administração de fármacos, que têm encontrado bastantes aplicações para via nasal. A fase oleosa que constitui as formulações descritas anteriormente é substituída por um lípido com características sólidas à temperatura ambiente e corporal.⁸⁷ O lípido a utilizar é selecionado de acordo com a solubilidade do fármaco em causa e são também adicionados surfactantes para melhorar a estabilidade das SLN.⁸⁴ A figura 7.9 representa a estrutura de uma SLN.

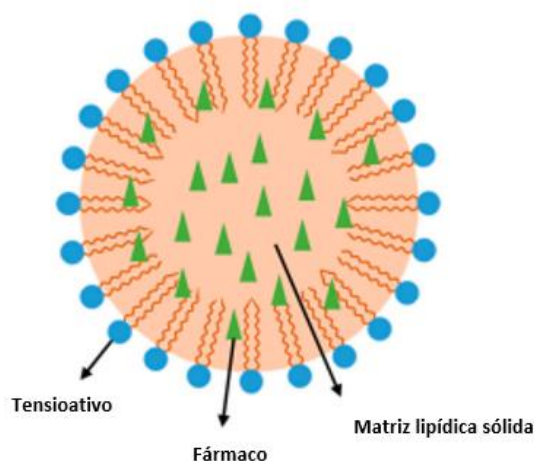


Figura 7.9 - Representação gráfica da estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida. Adaptado de (86).

Existem três tipos de SLN's, representados na figura 7.10, que dependem do processo de produção.⁸⁶ A SLN de matriz homogénea, como o próprio nome indica, possui uma matriz uniforme e é mais adequada para fármacos com propriedades lipofílicas. A SLN com uma elevada concentração de fármaco na sua camada mais externa pressupõe uma baixa concentração de fármaco no núcleo. Por fim, o último tipo de SLN, possui um

núcleo rico em fármaco. Contudo, apresentam algumas limitações como a possibilidade de agregação entre SLN's.^{87, 88}

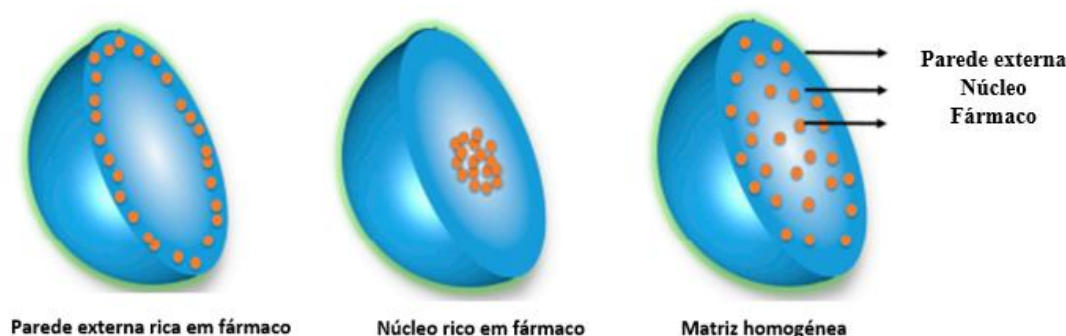


Figura 7.10-Comparação entre os tipos de nanopartículas lipídicas sólidas. Adaptado de (88).

As NLC surgem da necessidade de melhorar as desvantagens associadas às SLN, nomeadamente a sua baixa capacidade de carga. Estas partículas são compostas por uma mistura de lípidos no estado sólido e no estado líquido, o que lhes confere maior flexibilidade relativamente às SLN.⁸⁶ Este tipo de nanopartículas também se divide em três categorias: as de matriz sólida e imperfeita, as de matriz sólida amorfa e sem estrutura e, por fim, as de transporte múltiplo.⁸⁶ Estas categorias não serão aprofundadas nesta dissertação.

Um estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de NLC carregadas com donepezilo e com astaxantina, um carotenóide com funções anti-inflamatórias. A formulação foi administrada a ratos por via intranasal, diariamente por um período de 30 dias. De forma a avaliar a eficácia desta técnica de veiculação de fármaco na redução de fatores inflamatórios na DA, foi administrado oralmente cloreto de alumínio hidratado aos ratos, de forma a mimetizar a disfunção colinérgica característica da DA.⁸⁹ A composição dos grupos da amostragem encontra-se resumida na tabela 7.6.

Tabela 7.6 - Características da amostragem utilizada. Adaptado de (89).

Grupo A	Saudável
Grupo B	Doente não tratado
Grupo C	Donepezilo em solução intranasal
Grupo D	Donepezilo e astaxantina em solução intranasal
Grupo E	NLC vazias
Grupo F	NLC só com donepezilo
Grupo G	NLC com donepezilo e astaxantina

Os parâmetros de caracterização da formulação revelaram valores de potencial zeta de +33.7 mv, um PI de 0.224, uma EE de 81% para o donepezilo e de 93% para a astaxantina, e um tamanho de partícula de 149.9 nm. Ao fim dos 30 dias de tratamento foram avaliados os marcadores fisiopatológicos da DA, como o rácio entre as isoformas 40 e 42 da proteína β -amilóide e a quantidade de acetilcolina cerebral.⁸⁹

Como referido no capítulo 4, a inadequada clivagem da APP resulta no aumento da quantidade da isoforma 42 da proteína β -amilóide, que tem maior propensão a agregar e formar as placas senis. O tratamento através de NLC's carregadas com donepezilo e astaxantina demonstrou uma redução significativa na produção e acumulação de proteína β -amilóide.⁸⁹ As tabelas 7.7 e 7.8 relacionam as concentrações de enzima β -secretase e de proteína β -amilóide.

Tabela 7.7 - Concentração (ng/mg) de enzima β -secretase no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).

	Enzima β-secretase no córtex cerebral	Enzima β-secretase no hipocampo
Grupo A	1	1
Grupo B	2,98	7,95
Grupo C	2,81	7,58
Grupo D	1,96	5,32
Grupo F	2,35	5,94
Grupo G	1,14	2,60

Tabela 7.8 - Concentração (ng/mg) de proteína β -amilóide no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).

	Proteína β-amilóide no córtex cerebral	Proteína β-amilóide no hipocampo
Grupo A	2,48	2,63
Grupo B	12,54	13,57
Grupo C	11,35	12,79
Grupo D	6,15	8,16
Grupo F	7,19	9,14
Grupo G	2,62	3,90

Assim, é fácil verificar as consequências positivas do uso de NLC's carregadas com donepezilo comparativamente à solução de donepezilo. O grupo A apresenta os valores considerados normais tanto para a enzima β -secretase como para a proteína β -amilóide. O grupo B já apresenta valores alterados para ambos os parâmetros. O grupo F apresentou uma menor expressão de proteína β -amilóide, face ao grupo C, tratado apenas com solução oral. O grupo D, solução oral de donepezilo com astaxantina, demonstrou melhores resultados do que o grupo F, NLC's apenas com donepezilo, contudo, foi ao encapsular o donepezilo e a astaxantina em NLC's que os valores de ambos os parâmetros se aproximaram mais dos de referência, demonstrando mais uma vez a importância da relação entre a via direta entre o nariz e o cérebro e a nanotecnologia.

O outro marcador biológico observado foi a quantidade de acetilcolina e de acetilcolinesterase cerebral. Os resultados obtidos para cada grupo estão resumidos nas tabelas 7.9 e 7.10, para cada marcador, respetivamente.

Tabela 7.9 - Concentração de acetilcolina em pg/mg no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).

	Acetilcolina no córtex cerebral	Acetilcolina no hipocampo
Grupo A	23,86	35,38
Grupo B	7,58	8,38
Grupo C	10,98	11,77
Grupo D	15,32	18,73
Grupo F	14,84	17,25
Grupo G	22,17	32,90

Tabela 7.10 - Concentração de acetilcolinesterase em ng/mg no córtex e no hipocampo cerebral. Adaptado de (89).

	Acetilcolinesterase no córtex cerebral	Acetilcolinesterase no hipocampo
Grupo A	7,48	8,56
Grupo B	21,86	25,62
Grupo C	18,46	22,37
Grupo D	13,70	14,29
Grupo F	14,20	15,45
Grupo G	8,13	8,76

Os resultados obtidos corroboraram os resultados esperados, uma vez que a indução da disfunção colinérgica, através da administração de cloreto de alumínio hidratado, diminuiu as concentrações de acetilcolina e aumentou as de acetilcolinesterase no grupo B, quando comparado com o grupo A. Relativamente ao uso de NLC como meio de transporte de donepezilo, verificou-se que o grupo F obteve valores mais baixos de acetilcolinesterase e valores mais altos de acetilcolina, quando comparado com os valores do grupo B. Assim, os grupos onde se utilizaram NLC como meio de veiculação, foram aqueles onde os níveis de acetilcolina e de acetilcolinesterase se aproximaram mais dos valores normais, exibidos pelo grupo A. Ao comparar os grupos onde foram utilizadas NLC, grupos F e G, verificam-se as consequências positivas de acoplar astaxantina ao donepezilo, uma vez que as suas propriedades anti-inflamatórias culminaram em concentrações mais altas de acetilcolina e mais baixas de acetilcolinesterase.

Um outro estudo com NLC's carregadas com donepezilo apresentou a particularidade de exibir um revestimento de quitosano, de forma a proporcionar uma veiculação mais eficaz até ao cérebro, através da via nasal. A preparação das partículas envolveu homogeneização e sonificação. Os excipientes utilizados foram uma mistura de ácidos gordos, que originou a fase oleosa e um polióxido de etileno e propileno, como agente surfactante. Da dissolução do polioxietileno-propileno surge, assim, a fase aquosa à qual se adicionou a fase oleosa obtida anteriormente.

De forma a avaliar a eficácia não só dos transportadores como também do revestimento de quitosano, realizaram-se testes *in vitro* e *in vivo*, sendo que estes últimos foram em ratos albinos. As NLC tinham um tamanho de 192,5 nm, um PDI de 0,298, um potencial zeta de + 38,9 mv e uma E.E. de 89,85%. O ensaio de libertação *in vitro* foi realizado por diálise numa solução de tampão fosfato-salino, tendo-se observado (figura 7.11) que durante a primeira hora, as NLC carregadas com donepezilo e revestidas com quitosano, exibiram uma libertação mais rápida, seguida de uma estabilização, atingindo um pico máximo de libertação às 24 h, de 84,82%. Quanto à solução de donepezilo, a dissolução de 97% de fármaco ocorreu decorridas 3 h, dada a elevada solubilidade do donepezilo.⁹⁰

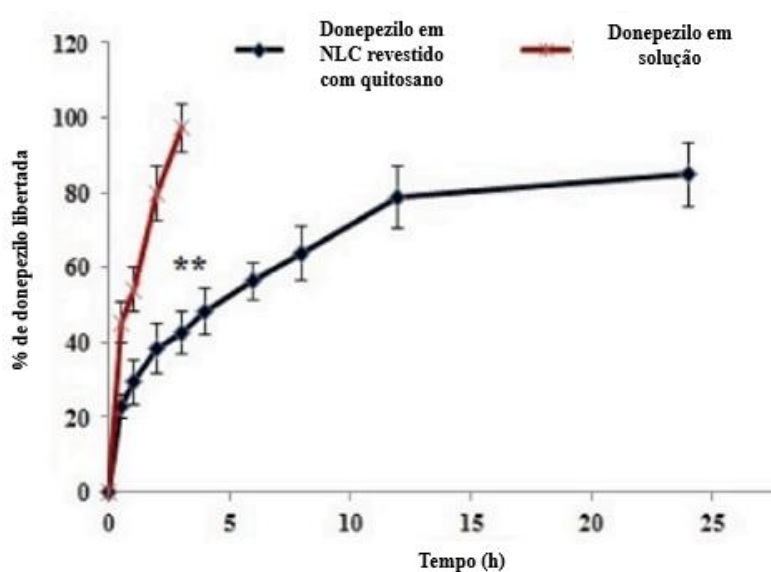


Figura 7.11 - Representação gráfica dos resultados do estudo *in vitro*. Adaptado de (90).

Foi realizado um estudo *in vivo* em ratos, em que estes foram divididos em 3 grupos, com formulações e formas de administração distintas (tabela 7.11).⁹⁰

Tabela 7.11 - Características da amostragem. Adaptado de (90)

Grupo A	Donepezilo em solução por via intranasal
Grupo B	Donepezilo em NLC com revestimento de quitosano por via intranasal
Grupo C	Donepezilo em NLC com revestimento de quitosano por via intravenosa

O estudo *in vivo* permitiu aferir a concentração cerebral de donepezilo após administração intranasal e intravenosa das formulações, conforme referido inicialmente na tabela 7.10. Este ensaio revelou resultados que suportam a eficiência da veiculação de fármacos através de nanossistemas desde o nariz até ao cérebro uma vez que, conforme representado na figura 7.12, a maior concentração de fármaco, 218,93 ng/mL, a nível cerebral foi possibilitada pela nanoformulação de donepezilo administrada por via nasal e revestida por quitosano, demonstrando também a eficiência e a importância deste mesmo revestimento, derivado da quitina, com propriedades mucoadesivas que aumentam a permeabilidade da mucosa nasal à formulação. A biodisponibilidade do donepezilo encapsulado em NLC's revestidas por quitosano foi 2 vezes superior à biodisponibilidade do donepezilo em solução e 2,4 vezes maior que a biodisponibilidade do donepezilo encapsulado em NLC's revestido por quitosano, mas administrado por via intravenosa.⁹⁰ Mais uma vez é demonstrada a viabilidade desta via direta entre a cavidade nasal e o cérebro e a importância de explorar não só formulações e técnicas de administração, como também excipientes que possam potenciar a veiculação do fármaco.

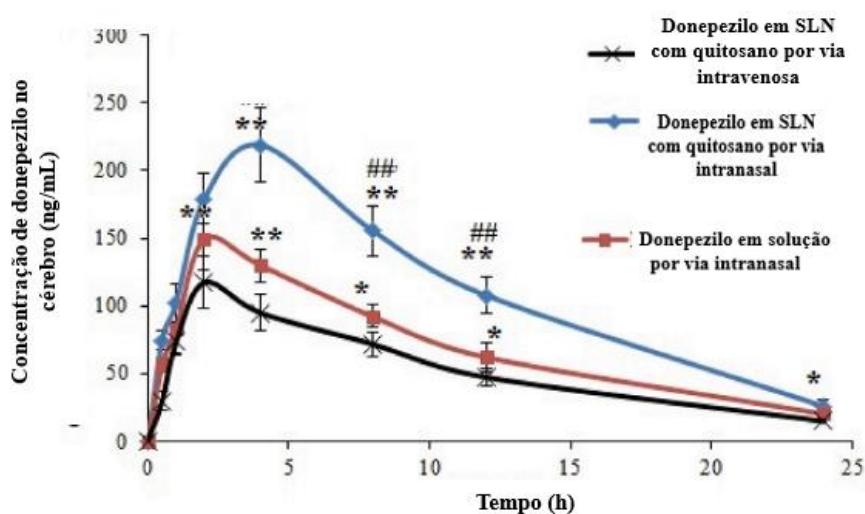


Figura 7.12 - Representação gráfica dos resultados do estudo *in vivo* em ratos. Adaptado de (90).

Um outro estudo avaliou a eficácia da veiculação de donepezilo, igualmente na abordagem nariz-cérebro, através de SLN.⁹⁰ Os transportadores foram preparados através da técnica de evaporação do solvente, que pressupõe a dissolução de um lípido num solvente orgânico que, posteriormente, emulsifica com uma fase aquosa, onde se encontram os surfactantes. Finalmente, faz-se a remoção do solvente, que resulta na formação de nanopartículas sólidas, as SLN. Além do donepezilo, utilizou-se também um derivado do glicerol na fase lipídica e o polissorbato 80 como surfactante. O estudo foi realizado *in vitro* e *in vivo*, em ratos. Relativamente a parâmetros de análise da formulação de SLN carregada com donepezilo, obtiveram-se valores de tamanho de partícula de 121 nm, um PI de 0,194 e um potencial zeta de -24,1 mV. A E.E foi de 67,95% e capacidade de carga do fármaco foi de 12,15%. O percentual máximo de libertação *in vitro* ocorreu decorridas 24 h, numa bolsa de diálise contendo tampão fosfato-salino, tendo atingido um valor de 89,35%. Para efeitos de análise de biodistribuição e farmacocinética os ratos foram divididos em 3 grupos, conforme descrito na tabela 7.12.⁹¹

Tabela 7.12 - Formulações de administração de cada grupo de animais. Adaptado de (91).

Grupo A	Donepezilo em solução por via intravenosa
Grupo B	Donepezilo em solução por via intranasal
Grupo C	Donepezilo em SLN por via intranasal

A figura 7.13 mostra o perfil de libertação do donepezilo a partir das SLN, bem como o perfil de dissolução do fármaco. Os resultados obtidos revelaram uma libertação inicial rápida do fármaco encapsulado seguida de uma estabilização gradual da libertação. Conforme descrito anteriormente, a libertação inicial mais rápida pode dever-se a resíduos de fármaco existentes na superfície das SLN. Por observação direta do gráfico, pode verificar-se que as SLN apresentaram uma libertação máxima de fármaco de 89,35% em 24 h enquanto a dissolução (97,49%) ocorreu em 5 h.

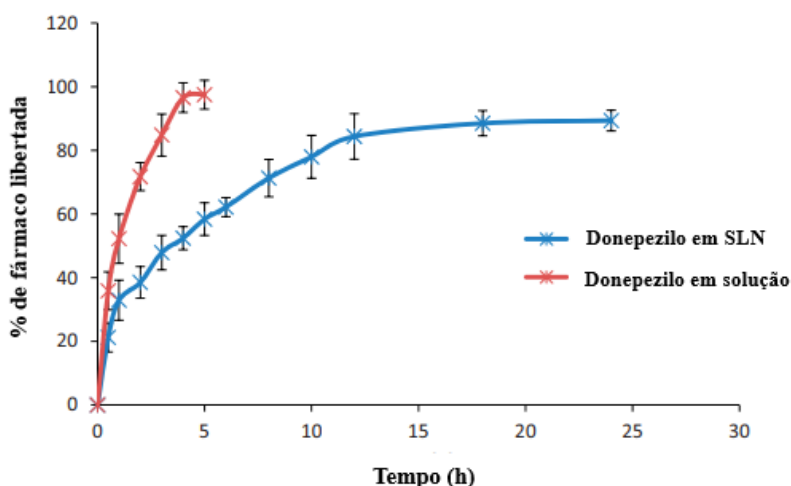


Figura 7.13 - Comparação do perfil de dissolução do fármaco. Adaptado de (91).

Os estudos *in vivo*, realizados em ratos, proporcionaram uma caracterização farmacocinética. Verificou-se uma concentração máxima cerebral de 133 ng/mL para o donepezilo encapsulado nas SLN, comparativamente a um valor de concentração máxima de 24,15 ng/mL para a solução de donepezilo administrada também pela via nasal. A administração por via intravenosa de donepezilo foi a que obteve um valor mais baixo de concentração cerebral, apenas de 17,19 ng/mL.⁹¹

Em última análise, a veiculação de nanopartículas através da via intranasal apresenta várias vantagens, em comparação com outras formulações e outras vias de administração. Nos estudos apresentados anteriormente, verificou-se não só o aumento da neurotransmissão colinérgica e a diminuição significativa da quantidade de proteína β -amilóide, o principal mecanismo de indução da DA, como também se verificou uma concentração significativa de fármaco no local alvo.

8. Conclusão

Nesta revisão bibliográfica, cujo principal objetivo foi perceber e aferir a eficácia da veiculação de fármaco de forma direta entre o nariz e o cérebro, aplicado à DA, verificou-se que as abordagens nanotecnológicas acima referidas apresentavam um enorme potencial terapêutico.

Ainda há um longo caminho a percorrer no que respeita ao tratamento e, principalmente, à cura das doenças neurológicas. Contudo, destacam-se os avanços tecnológicos na área das nanoformulações descritas nesta dissertação. Os fármacos atualmente utilizados na doença de Alzheimer mostram algum efeito terapêutico, embora seja apenas na atenuação dos sintomas. No entanto, todos eles são administrados por via oral, e uma das dificuldades nestes tratamentos prende-se com a questão da dosagem terapêutica. Quando administrada a dose recomendada, verifica-se que apenas uma pequena parte do fármaco consegue efetivamente exercer o seu efeito terapêutico, devido à sua metabolização e à dificuldade de atravessar a BHE. Ao aumentar a dose administrada com o intuito de aumentar a quantidade de fármaco que alcança o local alvo para exercer o efeito pretendido, também se aumentam os efeitos adversos, podendo ocorrer toxicidade. Aqui surge a maior relevância dos sistemas nanotecnológicos, uma vez que permitem a encapsulação de quantidades terapêuticas mínimas de fármaco, ultrapassando a barreira hematoencefálica, sem necessidade de aumento de doses, eliminando a problemática da toxicidade inerente.

Atualmente ainda existem algumas limitações a estas técnicas de formulação, nomeadamente a dificuldade de produção em larga escala, a complexidade das próprias formulações e a reduzida capacidade de carga das nanopartículas. O próprio local de administração apresenta alguns obstáculos; apesar da via intranasal mostrar ser bastante promissora e permitir a absorção e condução direta de fármacos até ao cérebro, os movimentos mucociliares, cuja função é a eliminação de substâncias exógenas, e a degradação enzimática, são limitações que necessitam de ser contornadas. É de salientar a importância da utilização de excipientes, focada na diminuição das barreiras encontradas na cavidade nasal, como descrito anteriormente.

Em última instância, o doente é o maior beneficiário desta tecnologia, uma vez que poderá ser possível a administração de formulações terapêuticas através de vias

alternativas à oral (neste caso, através da via nasal). Além disso, é uma via de administração muito pouco invasiva e é, particularmente no paciente com doença de Alzheimer, importante a existência de uma alternativa à via oral, visto que em estadios mais avançados da doença, o próprio ato de deglutição pode encontrar-se comprometido.

Assim, conclui-se que a alternativa terapêutica da administração de fármacos através da cavidade nasal, utilizando abordagens nanotecnológicas descritas nesta dissertação, apresenta-se bastante promissora no futuro. No entanto, é imperativa a realização de mais estudos e ensaios clínicos, nomeadamente a nível dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença de Alzheimer e, assim, arranjar novas terapêuticas ou melhorar as já existentes. Também os obstáculos inerentes às técnicas de formulação e administração, bem como da própria cavidade nasal, devem ser melhor compreendidos, de forma a que seja possível contorná-los e, assim, melhorar a eficácia da administração e terapia.

9. Bibliografia

1. Dugger Bn, Dickson Dw. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor Perspectives In Biology. 2017;9(7):A028035.
2. Sheppard O, Coleman M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology And Pathogenesis. Huang X, Editor. Brisbane (AU): Exon Publications; 2020.
3. Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology And Epidemiology of The Major Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor Perspectives In Biology. 2018;10(4):A033118.
4. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Et Al. The Amyloid-B Pathway In Alzheimer's Disease. Molecular Psychiatry. 2021;26(10).
5. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology To Disease And Back. Physiological Reviews. 2019;99(1):21–78.
6. Pires PC, Santos AO. Nanosystems In Nose-To-Brain Drug Delivery: A Review of Non-Clinical Brain Targeting Studies. Journal of Controlled Release. 2018 ;270:89–100.
7. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review On Alzheimer's Disease: Causes And Treatment. Molecules. 2020;25(24):5789.
8. A Doença De Alzheimer – Associação Alzheimer Portugal [Internet]. Available From: <https://Alzheimerportugal.Org/A-Doenca-De-Alzheimer/>
9. Rabbito A, Dulewicz M, Kulczyńska-Przybik A, Mroczko B. Biochemical Markers In Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(6):1989.
10. Kumar A, Tsao JW. Alzheimer Disease. Statpearls Publishing; 2019.
11. Qiu C, Kivipelto M, Von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's Disease: Occurrence, Determinants, And Strategies Toward Intervention. Alzheimer's Disease And Mild Cognitive Impairment. 2009;11(2):111–28.
12. Garre-Olmo J. Epidemiology of Alzheimer's Disease And Other Dementias. Revista De Neurologia. 2018;66(11):377–86.
13. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress In Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics And Epidemiology. Journal of Alzheimer's Disease. 2017;57(2):317–30.

14. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalencia E Incidência De La Enfermedad De Alzheimer En Europa: Metaanálisis. *Neurología*. 2017;32(8):523–32.
15. Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q. Alzheimer's Disease: Epidemiology And Clinical Progression. *Neurology And Therapy*. 2022;11(2).
16. Georges, J., Miller, O., & Bintener, C. (2020). Estimating The Prevalence of Dementia In Europe. *Alzheimer Europe*.
17. Santana I, Farinha F, Freitas S, Rodrigues V, Carvalho Á. Epidemiologia Da Demência E Da Doença De Alzheimer Em Portugal: Estimativas Da Prevalência E Dos Encargos Financeiros Com A Medicação. *Acta Médica Portuguesa*. 2015;28(2):182–8.
18. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative Stress, And The Amyloid Beta Peptide In Alzheimer's Disease. *Redox Biology*. 2018;14:450–64.
19. Murphy MP, Levine H. Alzheimer's Disease, And The Amyloid-B Peptide. Lovell MA, Editor. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;19(1):311–23.
20. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's Disease: Pathogenesis, Diagnostics, And Therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14(1):5541–54.
21. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP Processing In Alzheimer's Disease. *Molecular Brain*. 2011;4(1):3.
22. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W. The Complexity of Tau In Alzheimer's Disease. *Neuroscience Letters*. 2019;705:183–94.
23. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, Laferla FM. The Role of Tau In Alzheimer's Disease And Related Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2010;17(5):514–24.
24. Arnsten AFT, Datta D, Tredici KD, Braak H. Hypothesis: Tau Pathology Is An Initiating Factor In Sporadic Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2020;17(1).
25. Rawat P, Sehar U, Bisht J, Selman A, Culberson J, Reddy PH. Phosphorylated Tau In Alzheimer's Disease And Other Tauopathies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):12841.

26. Ionescu-Tucker A, Cotman CW. Emerging Roles of Oxidative Stress In Brain Aging And Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*. 2021;107:86–95.
27. Forman HJ, Zhang H. Targeting Oxidative Stress In Disease: Promise And Limitations of Antioxidant Therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(9):689–709.
28. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator In Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019;24(8):1583.
29. Su Q, Guo JH, Zhang YL, Wang J, Zhang ZN. The Relationship Between Amyloid-Beta And Brain Capillary Endothelial Cells In Alzheimer's Disease. *Neural Regeneration Research*. 2022;17(11):2355.
30. Li Y, Zhao T, Li J, Xia M, Li Y, Wang X, Et Al. Oxidative Stress And 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE): Implications In The Pathogenesis And Treatment of Aging-Related Diseases.
31. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative Stress, Dysfunctional Glucose Metabolism And Alzheimer Disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019;20(3):148–60.
32. A. Armstrong R. Risk Factors For Alzheimer's Disease. *Folia Neuropathologica*. 2019;57(2):87–105.
33. Silva MVF, Loures C De MG, Alves LCV, De Souza LC, Borges KBG, Carvalho M Das G. Alzheimer's Disease: Risk Factors And Potentially Protective Measures. *Journal of Biomedical Science*. 2019;26(1).
34. Selkoe DJ, Hardy J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease At 25 Years. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8(6):595–608.
35. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E And Alzheimer Disease: Pathobiology And Targeting Strategies. *Nature Reviews Neurology*. 2019;15(9):501–18.
36. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, Et Al. Emerging Concepts In Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy. *Brain*. 2017;140(7):1829–50.
37. Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's Disease Prevention: From Risk Factors To Early Intervention. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2017;9(1).
38. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Et Al. The Cholinergic System In The Pathophysiology And Treatment of Alzheimer's Disease. *Brain*. 2019;141(7):1917–33.

39. J W, A B. Current Understanding of Alzheimer's Disease Diagnosis And Treatment. F1000Research. 2018.
40. Müller T. Rivastigmine In The Treatment of Patients With Alzheimer's Disease. Neuropsychiatric Disease And Treatment. 2007;3(2):211–8.
41. Ferreira-Vieira T, Guimaraes I, Silva F, Ribeiro F. Alzheimer's Disease: Targeting The Cholinergic System. Current Neuropharmacology. 2016;14:101–15.
42. Sam C, Bordoni B. Physiology, Acetylcholine. Pubmed. Treasure Island (FL): Statpearls Publishing; 2020.
43. Stallard CN, Abdolreza Saadabadi. Biochemistry, Glutamate. Nih.Gov. Statpearls Publishing; 2018.
44. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate And NMDA Receptors In Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease. 2017;57(4):1041–8.
45. Jewett BE, Thapa B. Physiology, NMDA Receptor. Pubmed. Treasure Island (FL): Statpearls Publishing; 2020.
46. Freeman SC, Karp DA, Kahwaji CI. Physiology, Nasal. Pubmed. Treasure Island (FL): Statpearls Publishing; 2020.
47. Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of Intranasal Delivery Route of Drug Administration For Brain Targeting. Brain Research Bulletin. 2018;143:155–70.
48. Alberto M, Ana Cláudia Santos, Veiga F, Pires PC. Lipid And Polymeric Nanoparticles: Successful Strategies For Nose-To-Brain Drug Delivery In The Treatment of Depression And Anxiety Disorders. 2022;14(12):2742–2.
49. Xinchen Y, Tan Jinqun, Guan Jiaoqiong. Lipid-Based Nanoparticles Via Nose-To-Brain Delivery: A Mini Review. Frontiers In Cell And Developmental Biology. 2023;11.
50. Taléns-Visconti R, De Julián-Ortiz JV, Vila-Busó O, Diez-Sales O, Nácher A. Intranasal Drug Administration In Alzheimer-Type Dementia: Towards Clinical Applications. Pharmaceutics. 2023;15(5):1399.
51. Bahadur S, Pardhi DM, Rautio J, Rosenholm JM, Pathak K. Intranasal Nanoemulsions For Direct Nose-To-Brain Delivery of Actives For CNS Disorders. Pharmaceutics. 2020;12(12):1230.
52. Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. Recent Advances In Carrier Mediated Nose-To-Brain Delivery of Pharmaceutics. European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics. 2018;128:337–62.

53. Bonferoni M, Rossi S, Sandri G, Ferrari F, Gavini E, Rassa G, Et Al. Nanoemulsions For “Nose-To-Brain” Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(2):84.
54. Keller LA, Merkel O, Popp A. Intranasal Drug Delivery: Opportunities And Toxicologic Challenges During Drug Development. *Drug Delivery And Translational Research*. 2021.
55. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience And Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications To Nanomedicine. *Molecules*. 2019;25(1):112.
56. Sim S, Wong N. Nanotechnology And Its Use In Imaging And Drug Delivery (Review). *Biomedical Reports*. 2021;14(5).
57. Sarma A, Das MK. Nose To Brain Delivery of Antiretroviral Drugs In The Treatment of Neuroaids. *Molecular Biomedicine*. 2020;1(1).
58. Hamimed S, Jabberi M, Chatti A. Nanotechnology In Drug And Gene Delivery. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. 2022;395(7):769–87.
59. Mazayen ZM, Ghoneim AM, Elbatanony RS, Basalious EB, Bendas ER. Pharmaceutical Nanotechnology: From The Bench To The Market. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;8(1).
60. Cunha S, Forbes B, Sousa Lobo JM, Silva AC. 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*. 2021;Volume 16:4373–90.
61. Fonseca-Santos B, Chorilli M, Palmira Daflon Gremião M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems For The Treatment of Alzheimer’s Disease. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;4981.
62. Kumar M, Bishnoi RS, Shukla AK, Jain CP. Techniques For Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive Nutrition And Food Science*. 2019;24(3):225–34
63. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: An Advanced Mode of Drug Delivery System. *3 Biotech*. 2014;5(2):123–7.
64. Preeti, Sambhakar S, Malik R, Bhatia S, Al-Harrasi A, C. Indu Rani, Et Al. Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology For Improving The Bioavailability of Drugs. *Scientifica*. 2023;2023:1–25.

65. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Et Al. Nanoemulsion: Concepts, Development, And Applications In Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*. 2017;252:28–49.
66. Misra SK, Pathak K. Nose-To-Brain Targeting Via Nanoemulsion: Significance And Evidence. *Colloids And Interfaces*. 2023;7(1):23.
67. Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, Et Al. Nose-To-Brain Drug Delivery: An Update On Clinical Challenges And Progress Towards Approval of Anti-Alzheimer Drugs. *Journal of Controlled Release*. 2018;281:139–77.
68. Kaur A, Nigam K, Bhatnagar I, Sukhpal H, Awasthy S, Shankar S, Et Al. Treatment of Alzheimer’s Diseases Using Donepezil Nanoemulsion: An Intranasal Approach. *Drug Delivery And Translational Research*. 2020;10(6):1862–75.
69. Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. *Methods In Molecular Biology*. 2010;63–70.
70. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes As A Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, And Future Perspectives. *Molecules*. 2022;27(4):1372.
71. Liu G, Hou S, Tong P, Li J. Liposomes: Preparation, Characteristics, And Application Strategies In Analytical Chemistry. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*. 2020;1–21.
72. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes As Nanomedical Devices. *International Journal of Nanomedicine*. 2015; 10:975.
73. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of Liposomes As Drug Delivery System For Therapeutic Applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021; 601:120571.
74. Yun P, Devahastin S, Chiewchan N. Microstructures of Encapsulates And Their Relations With Encapsulation Efficiency And Controlled Release of Bioactive Constituents: A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 2021;20(2):1768–99.
75. Pandian SRK, Vijayakumar KK, Murugesan S, Kunjiappan S. Liposomes: An Emerging Carrier For Targeting Alzheimer’s And Parkinson’s Diseases. *Heliyon*. 2022;8(6):E09575.

76. Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS, Perrie Y. Liposomes: Advancements And Innovation In The Manufacturing Process. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020.
77. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Et Al. Liposome: Classification, Preparation, And Applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013;8(1).
78. Pauli G, Tang WL, Li SD. Development And Characterization of The Solvent-Assisted Active Loading Technology (SALT) For Liposomal Loading of Poorly Water-Soluble Compounds. *Pharmaceutics*. 2019;11(9):465.
79. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles As Drug Delivery Systems. *Pharmacological Reports*. 2012;64(5):1020–37.
80. Biswas S, Dodwadkar NS, Sawant RR, Torchilin VP. Development of The Novel PEG-PE-Based Polymer For The Reversible Attachment of Specific Ligands To Liposomes: Synthesis And In Vitro Characterization. *Bioconjugate Chemistry*. 2011;22(10):2005–13.
81. Hong SS, Oh KT, Choi HG, Lim SJ. Liposomal Formulations For Nose-To-Brain Delivery: Recent Advances And Future Perspectives. *Pharmaceutics*. 2019;11(10):540.
82. Ullah Z, Al-Asmari A, Tariq M, Fatani A. Preparation, Characterization, And In Vivo Evaluation of Intranasally Administered Liposomal Formulation of Donepezil. *Drug Design, Development And Therapy*. 2016;205.
83. Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G. Effect of The Cholesterol Content of Small 61Nilamellar Liposomes On Their Stability In Vivo And In Vitro. *Biochemical Journal*. 1980;186(2):591–8.
84. Mukherjee S, Ray S, Thakur R. Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach In Drug Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;71(4):349.
85. Duong VA, Nguyen TTL, Maeng HJ. Preparation of Solid Lipid Nanoparticles And Nanostructured Lipid Carriers For Drug Delivery And The Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*. 2020;25(20):4781.
86. Nguyen Ttl, Duong Va. Solid Lipid Nanoparticles. *Encyclopedia*. 2022;2(2):952–73.

87. Cláudia Marina Viegas, Patrício Ab, João Nuno Prata, Akhtar Nadhman, Pavan Kumar Chintamaneni, Fonte P. Solid Lipid Nanoparticles Vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. *Pharmaceutics*. 2023;15(6):1593–3.
88. Mishra V, Bansal K, Verma A, Yadav N, Thakur S, Sudhakar K, Et Al. Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(4):191.
89. Shehata Mk, Ismail Aa, Kamel Ma. Combined Donepezil With Astaxanthin Via Nanostructured Lipid Carriers Effective Delivery To Brain For Alzheimer's Disease In Rat Model. *International Journal of Nanomedicine*. 2023; Volume 18:4193–227.
90. Yasir, Mohd, Et Al. “Nose To Brain Delivery of Donepezil Through Surface Modified Nlcs: Formulation Development, Optimization, And Brain Targeting Study.” *Journal of Drug Delivery Science And Technology*, Vol. 75, 2022, P. 103631.
91. Yasir, Mohd, Et Al. “Solid Lipid Nanoparticles For Nose To Brain Delivery of Donepezil: Formulation, Optimization By Box–Behnken Design, In Vitro And In Vivo Evaluation.” *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, 2017, Pp. 1–14.
92. Rajput, Amarjitsing, And Shital Butani. “Donepezil Hcl Liposomes: Development, Characterization, Cytotoxicity, And Pharmacokinetic Study.” *Aaps Pharmscitech*, Vol. 23, No. 2, 2022.
93. Al Harthi, Sitah, Et Al. “Nasal Delivery of Donepezil Hcl-Loaded Hydrogels For The Treatment of Alzheimer's Disease.” *Scientific Reports*, Vol. 9, No. 1, 2019.
94. Kaur, Atinderpal, Et Al. “Memantine Nanoemulsion: A New Approach To Treat Alzheimer's Disease.” *Journal of Microencapsulation*, Vol. 37, No. 5, 2020, Pp. 355–365.
95. Kaur, Atinderpal, Et Al. “A Preliminary Pharmacodynamic Study For The Management of Alzheimer's Disease Using Memantine-Loaded Plga Nanoparticles.” *Aaps Pharmscitech*, Vol. 23, No. 8. 2022.

