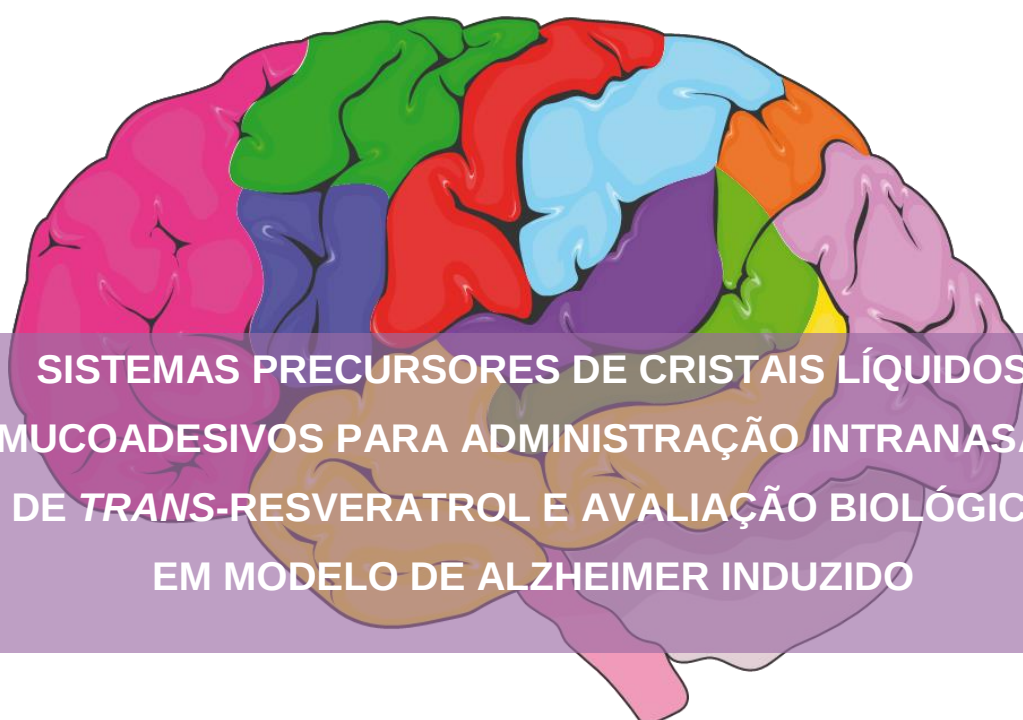


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



TESE

SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL
DE *TRANS*-RESVERATROL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
EM MODELO DE ALZHEIMER INDUZIDO

BRUNO FONSECA-SANTOS

Araraquara, SP | 2019

BRUNO FONSECA-SANTOS

**SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE
TRANS-RESVERATROL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM MODELO
DE ALZHEIMER INDUZIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara (SP)

Março de 2019

F676s Fonseca-Santos, Bruno.
Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração intranasal de trans-resveratrol e avaliação biológica em modelo de Alzheimer induzido / Bruno Fonseca-Santos. – Araraquara, 2019.
198 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Tensoativos. 2. Microemulsões. 3. Cristais líquidos liotrópicos. 4. Mucoadesão. 5. Doença de Alzheimer. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da tese: SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE TRANS-RESVERATROL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM MODELO DE ALZHEIMER INDUZIDO

AUTOR: BRUNO DA FONSECA DOS SANTOS

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem área de conhecimento, pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCFAR – UNESP – Araraquara

Prof. Dra. SÍLVIA STANISÇUASKI GUTERRES

Departamento de Produção e Controle de Medicamentos / Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / FCFAR – UNESP – Araraquara

Prof. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

Departamento de Farmácia / Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dra. Luciana Biagini Lopes

Departamento de Farmacologia / Instituto de Ciências Biomédicas – USP

Araraquara, 29 de março de 2019.

*Ao meu professor e orientador, Marlus,
por acreditar em mim, me conduzir
e me inspirar todos os dias.*

*Aos meus pais,
Margarete e Guimarães,
com todo meu amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por conduzir-me e dar-me a sabedoria e força para que eu pudesse concluir as etapas acadêmicas, profissionais e de vida.

Aos meus pais, **Margarete e Guimarães**, pelo amor, pela força e pelos valores éticos e morais transmitidos à mim.

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli** por acreditar em mim. Sou imensamente grato pelos conhecimentos transmitidos, sempre com muita paciência e carinho, e acima de tudo, grato pela nossa amizade.

Ao **Prof. Dr. Eneko Larrañeta** pela oportunidade de realizar estágio de Doutorado sanduíche na *Queen's University* em Belfast, Irlanda do Norte, Reino Unido.

Aos **colegas, professores, Maria Palmira Gremião e Anselmo Oliveira, e as técnicas, Natália Gonçalves e Margareth Modolo**, do Laboratório de Pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica pelo companheirismo e pela convivência nesses anos todos.

Aos **Marletes e agregados** que vivenciaram tudo isso comigo. Aos veteranos: **Andressa Pironi, Francesa Victorelli, Franciele Baveloni, Gilmar Hanck, Paula Scavanez, Renata Alves, Lucas Noboru e Mariza Alves**. E aos novatos: **Amanda Silvestre, Bruno Fiodi, Fernanda Almeida, Leidiana Rocha dos Reis, Leonardo di Filippo, Maurício Palmeira, Suzana Carvalho e Victor Hugo Souza**.

Aos meus estagiários, em especial a **Marília Esteves e Rodrigo Pontes**, pela oportunidade, convivência e pelo auxílio em muitos experimentos desta Tese.

À **Prof. Dra. Andreia Bagliotti Meneguim** pela sua amizade nesses anos todos. Obrigado por tudo, pelas discussões acadêmicas e também da vida. Tenho muita admiração e gratidão por ti.

À **Prof. Dra. Patrícia Bento** por me ouvir muitas vezes, meus lamentos, devaneios e pelos apoios, discussões acadêmicas e por ser minha colaboradora em muitos trabalhos. Obrigado pela amizade e tenho muita consideração por ti.

Aos amigos **Victória Moraes e Sergio Mondrzejewski** pela amizade, pelo apoio concedido e pelas boas vibrações. Eu amo vocês!

Ao meu amigo **Diogo de Souza**, Tia **Silvia**, Dona **Célia** e Seu **Zezinho** por sempre terem me recebido em sua casa, pela amizade, carinho e apoio.

Às **Prof. Dra. Márcia Maria de Souza e Camila André Cazarin** pela recepção calorosa na Universidade do Vale do Itajaí e pelo auxílio nos ensaios biológicos. Gratidão terei sempre!

Às **Universidade Estadual Paulista e Universidade do Vale do Itajaí** por serem minha *alma mater*.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Doutorado no País (2015/05394-2) e pela Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior – BEPE (2018/10760-6).

Ao **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron** (LNLS) pelo uso da linha de SAXS-1 (2016/0746).

À Seção Técnica de Pós-graduação: **Claudia Lúcia Molina, Aniele Vilella e Daniela Altieri Tita** por todo o auxílio e suporte recebido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien:
il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels
qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

Marie Curie (1867 - 1934)

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença altamente incidente na população mundial, acometendo cerca de 40 milhões de pessoas com idade igual ou superior a 65 anos, levando à perda da memória e cognição. A via nasal é uma via alternativa que pode promover a rápida absorção do fármaco, além de poder direcionar fármacos para o cérebro, e evitar o metabolismo pré-sistêmico. Porém, ela possui mecanismos de depuração mucociliar que podem eliminar rapidamente a formulação da cavidade nasal. Os sistemas nanoestruturados baseados em tensoativos (SNBT) que sofrem geleificação *in situ* demonstram ser uma opção interessante para viabilizar a administração de fármacos por esta via. O *trans*-resveratrol (RES) tem apresentado atividade no tratamento da DA, atuando sobre vias moleculares específicas, como a capacidade da inibição da formação da placa beta-amiloide (A β), despolimerização da placa A β formada durante a doença e atuando sobre o sistema colinérgico, inibindo a acetilcolinesterase e diminuindo a neuroinflamação e formação de radicais livres no cérebro. Entretanto, seu uso é limitado devido à sua insolubilidade em meio aquoso. Desta forma, a solubilização do RES em SNBT pode ser uma opção interessante para viabilizar o seu uso. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas precursores de cristais líquidos compostos pelos tensoativos álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PPG-5-CETETH-20), ácido oleílico 20 OE (OLETH-20), ácido oleílico 3 OE (OLETH-3) e polissorbato de sorbitano (PS) para administração nasal do RES no tratamento da DA. O comportamento de fases dos sistemas foi investigado pela construção de diagramas de fases binários e ternários combinando cada tensoativo com água e ácido oleico. As formulações selecionadas foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raio-x à baixo ângulo (SAXS), reologia, análise mecânica, obtenção da força mucoadesiva e perfil de absorção de líquido. Os resultados mostram que foi possível obter um sistema composto por PPG-5-CETETH-20/ácido oleico/água ou por OLETH-20/ácido oleico/água com comportamento pseudoplástico adequado para administração nasal e alta capacidade de solubilização do RES. A mistura dos sistemas com muco artificial formou uma matriz líquido-cristalina com características reológicas, perfil de textura, força mucoadesiva e capacidade de absorção de líquidos adequados para a administração na cavidade nasal. Além disso, análises de SAXS sugerem que as amostras precursoras são microemulsões e com adição de fluído nasal simulado (FNS) se tornam estruturas líquido- cristalinas. O ensaio biológico em modelo de Alzheimer induzido por estreptozotocina (STZ) em camundongos mostrou que as formulações administradas pela via intranasal ou o RES administrado em solução pela via oral demonstraram capacidade de memória nos animais. Embora, ambas as vias demonstraram potencial terapêutico, a via nasal mostrou-se superior comparada com a via oral. Por fim, as formulações desenvolvidas mostram-se adequadas para a administração intranasal e denotam de atividade biológica no modelo experimental utilizado.

Palavras-chave: Tensoativos. Microemulsões. Cristais líquidos liotrópicos. Mucoadesão. Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a highly incident illness in the world population, it affects about 40 million people aged 65 or over, and this pathology leads to memory and cognition loss. The nasal route is an alternative that can promote the rapid absorption of the drugs, besides to target drugs to the brain and to avoid the pre-systemic metabolism. However, it has mucociliary clearance that can rapidly eliminate the formulation existing under the nasal cavity. The surfactant-based nanostructured systems (SBNS) undergoes *in situ* gelling and seems to be an interesting feasible option for use by intranasal route. *Trans*-resveratrol (RES) has properties for the AD treatment, it acts on specific molecular pathways, such as the ability to inhibit the formation of amyloid-beta ($A\beta$) plaques, depolymerization of $A\beta$ plaques developed during the progressing of disease and acting on the cholinergic system, inhibiting an acetylcholinesterase, and decreasing neuroinflammation and formation of free radicals in the brain. However, its use is limited due to insolubility in aqueous medium, however RES can be solubilized in these systems and therefore it can be an interesting option to do its viable employ. The aim of this work was to develop and characterize liquid crystal precursor systems composed of polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl alcohol (PPG-5-CETETH-20), polyoxyethylene (20) oleyl alcohol (OLETH-20), polyoxyethylene (3) oleyl alcohol (OLETH- 3) and sorbitan polysorbate (PS) for nasal administration of RES. The phase behaviour of the systems was investigated by the construction of binary and ternary phase diagrams combining each surfactant with water and oleic acid. The chosen samples were characterized by polarized light microscopy (PLM), small angle scattering x-ray (SAXS), rheology, mechanical analysis, mucoadhesive force and liquid uptake profile. The results show that it was possible to obtain a system composed of PPG-5-CETETH-20/oleic acid/water or OLETH-20/oleic acid/water with pseudoplastic behaviour suitable for nasal administration and high solubilization ability of RES. The mixing of the artificial mucus and systems formed a liquid-crystalline matrix with rheological characteristics, texture profile and mucoadhesive strength for administration into the nasal cavity. In addition, the SAXS showed that the behaviour of the precursor samples are microemulsions and with the addition of simulated nasal fluid (FNS) generate crystalline liquid structures. Streptozotocin (STZ)-induced Alzheimer's model in mice showed that the formulations administered by the intranasal route or by oral solution demonstrated memory capacity in the animals. Although both routes demonstrated therapeutic potential, the nasal route was superior compared to the oral route. Finally, the formulations developed are suitable for intranasal administration and denote pharmacological activity in the animal model used.

Keywords: Surfactants. Microemulsions. Lyotropic liquid crystals. Mucoadhesion. Alzheimer's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de Alois Alzheimer (A). Notas médicas escritas por A. Alzheimer e foto da paciente A. Deter (B). Estudo publicado por Alzheimer em 1907 no <i>Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin</i> (C).....	25
Figura 2. Ocorrência das típicas de manifestações durante o percurso da doença de Alzheimer.	38
Figura 3. Estruturas químicas do <i>trans</i> -RES e <i>cis</i> -RES.	41
Figura 4. Rotas farmacocinéticas <i>in vivo</i> do resveratrol após administração oral. Ilustração esquemática baseada em dados diversos obtidos <i>in vitro</i> em culturas celulares, <i>ex vivo</i> em modelos isolados de intestino delgado e <i>in vivo</i> em animais e humanos.....	42
Figura 5. Representação esquemática das estruturas de microemulsões, ME água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), e (c) ME bicontínua podendo ser A/O ou O/A....	51
Figura 6. Representação esquemática da produção de nanoemulsão utilizando (A) técnica de sonicação e (B) homogeneizador de alta pressão.	53
Figura 7. Representação esquemática do mecanismo proposto para a emulsificação espontânea: quando a fase orgânica (óleo e anfifílico hidrofílico) e fase aquosa (água) são postas em contato (B), é formada uma ME bicontínua no limite (B), levando à turbulência interfacial e à formação de gotículas de óleo (C).....	55
Figura 8. Emulsão grosseira O/A contendo os componentes (A) é então aquecida (B) até uma temperatura acima do PIT do sistema (C). Em seguida, o sistema é arrefecido, e à medida que a temperatura diminui abaixo do PIT (D), é formada uma NE O/A (E).	57
Figura 9. Representação esquemática do mecanismo proposto para a emulsificação de baixa intensidade pelo método do ponto de inversão da emulsão. A quantidade de água adicionada a uma emulsão A/O (A) é progressivamente aumentada (B), até que uma inversão de fase ocorre (C) e uma emulsão O/A é formada (D).	58
Figura 10 –Diagrama esquemático da energia livre (ΔG) das MEs e NEs em comparação com o estado de separação de fases. MEs têm uma energia livre mais baixa do que o estado de fase separada (B), enquanto as NEs têm uma energia livre mais elevada (A). Os dois estados são separados por uma energia de ativação (ΔG^*). Fotografia de uma ME e NE, onde as áreas ampliadas mostram esquemas do tamanho das gotículas formadas (C).	60
Figura 11 – Número de publicações por ano (1959 – 2016 incluindo os termos em inglês identificados utilizando uma pesquisa indexada usando a plataforma Web of Knowledge™ (Thomson Reuters). Acesso em 18/01/2016.....	64
Figura 12. Representações esquemáticas de fases líquido-cristalinas formadas por anfifílicos em água, sendo lamelar (a), hexagonal (b) e cúbica (c).	67
Figura 13. Formação de estruturas líquido-cristalinas baseada no valor do parâmetro de empacotamento crítico (PEC) do anfifílico.	68
Figura 14. Representação das diferentes áreas da cavidade nasal e da via olfatória do epitélio nasal	73
Figura 15. As duas etapas do processo de mucoadesão.....	77
Figura 16. Ilustração do ângulo de contato de uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida (mucosa).....	80
Figura 17. Interações secundárias que geram a interpenetração das cadeias de polímeros na mucina.	81

Figura 18. Regiões para a fratura da junção mucoadesiva em uma forma farmacêutica em contato com a mucosa.	83
Figura 19. Fotografia mostrando as estruturas cranianas do camundongo e as flechas vermelhas indicam o ponto de inserção da agulha (a) e com a agulha inserida ao local (b), figura ilustrativa com a localização do SNC no crânio do animal (c) e a ampliação do cérebro com as principais estruturas cerebrais (d).....	96
Figura 20. Esquema representativo dos dias de indução, tratamento e início dos testes comportamentais.	97
Figura 21. Procedimento da administração intranasal em camundongo acordado usando micropipeta.	98
Figura 22. Esquema ilustrativo dos diagramas de fases binários resultantes das misturas de OLETH-3 / água e OLETH-20 / água, além de imagens representativas obtidas por MLP exemplificando os sistemas anisotrópicos obtidos. SLI: Sistema líquido isotrópico; L α : Lamelar; H $\parallel$: Hexagonal.....	102
Figura 23. Esquema ilustrativo dos diagramas de fases binários resultantes das misturas de POLYSORBATE-80 / água e PPG-5-CETETH-20 / água, além de imagens representativas obtidas por MLP exemplificando os sistemas anisotrópicos obtidos. SLI: Sistema líquido isotrópico.	104
Figura 24. Estruturas moleculares do ácido oleico (A), O3 com x = 3 ou O20 com x = 20 (B); PC (C) e PS (D).	105
Figura 25. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PC, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em vermelho mostrando a diluição em FNS.	107
Figura 26. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de O-20, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em vermelho mostrando a diluição em FNS.	109
Figura 27. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PS, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em vermelho mostrando a diluição em FNS.	110
Figura 28. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de O3, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em preto mostrando a região de diluição.....	112
Figura 29. Perfil cromatográfico do RES na concentração de 100 ug/mL com ou sem exposição à luz (a e b, respectivamente) e seus respectivos espectros de absorção no ultra-violeta.....	114
Figura 30. Curva de calibração obtida em função da concentração de RES pela área do pico cromatográfico.	115
Figura 31. Concentração (mg/g) solubilizada do RES nas formulações e excipientes isolados.	117
Figura 32. Aspecto visual dos sistemas precursores antes da administração nasal e a formação dos sistemas por meio do contato com o muco simulando após a administração.	119
Figura 33 – Imagens obtidas por MLP das formulações F1, F2 e F3, e de suas diluições de 30%, 50% e 100% em FNS, resultando nas amostras diluídas.	120
Figura 34. Aspecto visual dos sistemas precursores, contendo RES na concentração de 5 mg/g, antes da administração nasal e a formação dos sistemas por meio do contato com o FNS após a administração.....	121
Figura 35 – Imagens obtidas por MLP das formulações contendo resveratrol e de suas diluições de 30%, 50% e 100% em FNS, resultando nas amostras diluídas.	122

Figura 36. Difrátogramas do espalhamento de raio-X à baixo ângulo (SAXS) das amostras precursoras e suas diluições em FNS.	123
Figura 37 – Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste TPA. A1: resistência à compressão; A2: adesão; A3: segundo ciclo de compressão.....	127
Figura 38 – Gráficos das medidas obtidas pelo TPA, obtendo os parâmetros de dureza (a), adesividade (b), resistência à compressão (c) e coesão (d) das amostras diluídas em FNS.	128
Figura 39 – Gráficos de dispersão da (a) dureza em função da adesividade das amostras; e (b) da compressibilidade em função da adesividade das amostras. O gráfico no canto inferior direito mostra os dados plotados em função de uma regressão linear.	130
Figura 40. Reogramas obtidos com as medidas oscilatórias de varredura de frequência das amostras precursoras e das suas misturas com FNS. (a) Amostras sem RES, (b) amostras com RES. Símbolo fechado (G') e símbolo aberto (G''). ...	132
Figura 41. Reogramas de fluxo das amostras precursoras e das suas misturas com FNS. (a) Amostras sem RES, (b) amostras com RES. Símbolo fechado: curva ascendente; símbolo aberto: curva descendente.	135
Figura 42 – Medidas da força de destacamento e área da força de destacamento das amostras diluídas FNS, utilizando disco de mucina.	137
Figura 43. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre os parâmetros: número de cruzamentos (coluna branca) e número de postura de exploração (coluna preta). Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste Dunnett e apresentaram $p < 0.05$. SH: sham (n=8); NA: naïve (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.	142
Figura 44. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre o tempo de exploração do objeto A (coluna branca) e objeto B (coluna preta). Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de Dunnett e apresentaram $p < 0,05(*)$ e $p \leq 0.001(***)$ para a média do tempo de exploração comparada com objeto B do grupo veículo. Valores de $p < 0,05(\#)$ e $p \leq 0.01(##)$ para a diferença da média de exploração de A e B em cada grupo de tratamento (teste de Mann-Whitney). SH: sham (n=8); NA: naïve (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.....	143
Figura 45. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento de objeto. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de Dunnett e apresentaram $p < 0,05(*)$ e $p \leq 0.001(***)$ para a média do índice de reconhecimento com grupo veículo, $p \leq 0.0001(####)$ comparado com grupo F1B e $p \leq 0.01(\$)$ comparado ao grupo F2B (teste de Mann-Whitney). SH: sham (n=8); NA: naïve (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC	

(n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.....	144
Figura 46. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre a latência do tempo de descida na EI. Colunas brancas representam as sessões de treino e as colunas pretas representam sessões de teste. Em cada coluna os dados são expressos como medianas seguidas dos intervalos interquartis (25-75). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de Dunns e apresentaram $p \leq 0,01$ (##) e $p \leq 0,001$ (###) para a média do índice de descida com grupo veículo, n.s comparado entre grupo treino e teste do mesmo tratamento (teste de Mann-Whitney). SH: sham (n=8); NA: naive (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para regressão linear simples.....	115
Tabela 2. Precisão intra-corrida e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de RES.....	116
Tabela 3. Valores de espalhamento do vetor q (nm^{-1}) das amostras precursoras e suas diluições em FNS.	124
Tabela 4. Taxa de espaçamento de pico de Bragg e Índices de Miller (h , k , l) para fase lamelar (L_α), hexagonal (H_{II}), cúbica face de diamante ($Pn3m$), cúbica primitiva ($Im3m$) e cúbica giróide ($Ia3d$).....	125
Tabela 5. Razões entre as distâncias interplanares, parâmetros de rede calculados e tipo de mesofase identificadas para as amostras.....	125
Tabela 6. Valores de regressão linear (r^2), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) das amostras precursoras e das suas misturas com FNS.....	133
Tabela 7. Parâmetros de fluxo das amostras precursoras e das suas misturas com FNS.	136
Tabela 8. Resultados do potencial irritante para as formulações microemulsionadas com e sem resveratrol.....	139

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sintomas comuns experimentados por pessoas com síndrome de demência.....	34
Quadro 2. Evolução geral das alterações cognitivas da DA.....	36
Quadro 3. Resumo dos parâmetros farmacocinéticos dos inibidores da colinesterase e da memantina.....	39
Quadro 4. Principais vantagens e desvantagens com diferentes sistemas baseados em anfifílicos para solubilização de fármacos hidrofóbicos	49
Quadro 5. Comparação e diferenças conceituais entre NEs e MEs.....	64
Quadro 6. Vantagens e desvantagens associadas à entrega intranasal (IN) de fármacos.....	71
Quadro 7. Principais características de diferentes locais da mucosa.....	75
Quadro 8. Diferentes teorias utilizadas para explicar as interações adesivas entre materiais mucoadesivos e muco / mucosa.....	78
Quadro 9. Composição centesimal das formulações desenvolvidas.....	89
Quadro 10. Graus de reatividade para teste de difusão em ágar.....	95

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- AChE: acetilcolinesterase
- APP: proteína precursora amiloide
- A β : beta-amiloide
- BuChE: butirilcolinesterase
- ChE: colinesterase
- CL: cristal líquido
- DA: Doença de Alzheimer
- F1.100: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool cetílico etoxilado (5) e propoxilado (20) e 10% de água diluída com 100% de fluído nasal simulado
- F1.30: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool cetílico etoxilado (5) e propoxilado (20) e 10% de água diluída com 30% de fluído nasal simulado
- F1.50: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool cetílico etoxilado (5) e propoxilado (20) e 10% de água diluída com 50% de fluído nasal simulado
- F1: Formulação precursora (microemulsão) composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool cetílico etoxilado (5) e propoxilado (20) e 10% de água
- F2.100: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool oleílico etoxilado (20) e 10% de água diluída com 100% de fluído nasal simulado
- F2.30: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool oleílico etoxilado (20) e 10% de água diluída com 30% de fluído nasal simulado
- F2.50: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool oleílico etoxilado (20) e 10% de água diluída com 50% de fluído nasal simulado
- F2: Formulação precursora (microemulsão) composta de 30% de ácido oleico, 60% de álcool oleílico etoxilado (20) e 10% de água
- F3.100: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de polissorbato 80 e 10% de água diluída com 100% de fluído nasal simulado
- F3.30: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de polissorbato 80 e 10% de água diluída com 30% de fluído nasal simulado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- F3.50: Formulação composta de 30% de ácido oleico, 60% de polissorbato 80 e 10% de água diluída com 50% de fluído nasal simulado
- F3: Formulação precursora (microemulsão) composta de 30% de ácido oleico, 60% de polissorbato 80 e 10% de água
- FNS: Fluido nasal simulado
- G': módulo de armazenamento
- G'': módulo de perda
- H_{II}: mesofase hexagonal
- LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
- L_α: mesofase lamelar
- ME: Microemulsão
- MPL: microscopia de luz polarizada
- nAChR: receptor nicotínico
- NE: nanoemulsão
- NMDA: antagonista do N-metil-D-aspartato
- O20: Brij® O20 ou álcool oleílico etoxilado (20)
- O3: Brij® O3 ou álcool oleílico etoxilado (3)
- OLETH-20: Brij® O20 ou álcool oleílico etoxilado (20)
- OLETH-3: Brij® O3 ou álcool oleílico etoxilado (3)
- PC: Procetyl® ou álcool cetílico etoxilado (5) e propoxilado (20)
- PS: polisorbato 80
- RES: resveratrol
- SAXS: do inglês *Small-angle X-ray scattering*, Espalhamento de raio-X à baixo ângulo
- SF: separação de fase
- SLI: sistema líquido isotrópico
- SNC: Sistema Nervoso Central
- SVAT: sistema de alta viscosidade transparente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	Doença de Alzheimer	23
2.1.1	Histórico	24
2.1.2	Fisiopatologia da DA.....	26
2.1.2.1	<i>Hipótese da cascata amiloide</i>	26
2.1.2.2	<i>Hipótese da proteína tau</i>	28
2.1.2.3	<i>Hipótese colinérgica</i>	29
2.1.2.4	<i>Hipótese da metalobiologia</i>	31
2.1.3	Sinais e sintomas da DA	33
2.1.4	Tratamento e terapia farmacológica da DA.....	38
2.2	<i>Trans-resveratrol</i> : aspectos farmacocinéticos, biofarmacêuticos, e farmacodinâmicos na DA.....	40
2.3	Sistemas baseados em anfifílicos para a liberação de fármacos	48
2.3.1.1	Microemulsões e nanoemulsões	50
2.3.1.2	Dispersões líquido-cristalinas	65
2.4	Liberação nasal como estratégia para vetorização de fármacos para o SNC	69
3	OBJETIVOS.....	84
3.1	Objetivo geral	84
3.2	Objetivos específicos	84
4	MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.1	Materiais.....	85
4.1.1	Reagentes.....	85
4.1.2	Equipamentos	85
4.2	Métodos	86
4.2.1	Comportamento de fases dos tensoativos em água	86
4.2.2	Construção dos diagramas de fases ternários dos sistemas	86
4.2.3	Validação do método analítico por CLAE.....	87
4.2.4	Estudos de solubilidade do RES	88
4.2.5	Seleção dos sistemas para caracterização físico-química.....	89
4.2.6	Preparo do fluido nasal simulado (FNS)	90
4.2.7	Incorporação RES nas formulações	90
4.2.8	Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MPL) ...	91
4.3	Espalhamento de Raio-X à Baixo Ângulo (SAXS)	91
4.4	Análise do perfil de textura e análise por reologia.....	92

SUMÁRIO

4.4.1	Análise do perfil de textura.....	92
4.4.1.1	Reologia oscilatória	92
4.4.1.2	Reologia de fluxo	93
4.5	Análise das propriedades mucoadesivas	93
4.6	Avaliação da citotoxicidade em agarose <i>overlay</i> em células L929.....	93
4.7	Avaliação farmacológica das formulações em modelo animal de DA	95
4.7.1	Animais	95
4.7.2	Indução da DA através da administração estreptozotocina	95
4.7.3	Aleatorização e tratamento dos grupos experimentais	97
4.7.4	Campo aberto	98
4.7.5	Teste de reconhecimento objeto	99
4.7.6	Teste de esquiva inibitória	99
4.7.7	Análise estatística	100
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1	Comportamento de fases dos anfifílicos em água	101
5.2	Construção do diagrama de fases ternário	106
5.3	Validação do método analítico por CLAE	113
5.4	Estudos de solubilidade do RES	116
5.5	Seleção dos sistemas para caracterização físico-química	118
5.6	Incorporação do resveratrol nas formulações	121
5.7	Espalhamento de Raio-X à Baixo Ângulo (SAXS)	122
5.8	Análise do perfil de textura e análise por reologia.....	126
5.8.1	Análise do perfil de textura.....	126
5.8.2	Reologia oscilatória.....	131
5.8.3	Reologia de fluxo	134
5.9	Análise das propriedades mucoadesivas	136
5.10	Avaliação da citotoxicidade em agarose <i>overlay</i> em células L929	138
5.11	Avaliação biológica das formulações em modelo animal de DA	140
6	CONCLUSÃO	150
	REFERÊNCIAS.....	151
	ANEXO A – CÓPIA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UNIVALI)	195

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença que leva ao comprometimento, à longo prazo e progressivo, das funções cognitivas e comportamentais (DUBOIS *et al.*, 2010). Na DA, as placas amilóides se desenvolvem no hipocampo, uma estrutura no cérebro que tem o papel na codificação de memórias e em outras áreas do córtex cerebral, as quais têm um papel no processo do pensamento e na tomada de decisões (QUERFURTH e LAFERLA 2010).

Nos EUA, estima-se que 5,5 milhões de pessoas de todas as idades tenham DA (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2017). Esta doença é a sexta principal causa de morte nos EUA e, em geral, é a quinta causa de morte para aqueles de 65 anos ou mais. Em 2050, o número de pessoas com idade igual ou superior a 65 anos com DA deve triplicar, sendo projetado de 5 milhões para 13,8 milhões, ao menos que avanços médicos sejam feitos para prevenir, atrasar ou interromper a progressão da doença (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2017).

Os sistemas de liberação de fármacos baseados em tensoativos são sistemas em que as moléculas anfifílicas estão autoagregadas, geralmente na presença de água, para formar estruturas supramoleculares (MALMSTEN, MARTIN, 2002b). Esses agregados tornam-se mais organizados, mesmo quando os óleos ou outros componentes, como outros anfifílicos, estão presentes ao sistema tensoativo-água (EZRAHI *et al.*, 1999). Assim, esta mistura pode formar sistemas organizados, como as micelas, microemulsões (MEs), nanoemulsões (NEs), até sistemas com organização estrutural, como os cristais líquidos (CLs) liotrópicos (EZRAHI *et al.*, 1999; MALMSTEN, MARTIN, 2002a).

CLs consistem em matéria em um estado com propriedades de um líquido e um sólido (GARTI *et al.*, 2012; MEZZENGA, 2012). Em outras palavras, as CLs têm o comportamento estrutural e a rigidez de um sólido combinado com a mobilidade, desordem e a fluidez de um líquido isotrópico (KATO, 2008). Geralmente, ao aumentar a concentração de um dado anfifílico, podem ser geradas estruturas líquido-cristalinas do tipo lamelares, hexagonais e cúbicas (MALMSTEN, MARTIN, 2002a).

Os sistemas de auto-agregação exibem transformações de fase e espessamento *in situ* notável após a administração (MALMSTEN, 2007). A administração intranasal de CLs pode ser de interesse, pois a diluição destes no fluido nasal promove a transição para mesofase mais organizada. Devido ao fato em que

estes sistemas aumentam a sua viscosidade *in situ* e alteram as propriedades reológicas, além de apresentar propriedades mucoadesivas. Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que MEs e fases lamelares podem ser usados como precursor das fases hexagonais ou cúbicas após administração *in situ* em cavidades, como a nasal, bucal, vaginal, intra-articular ou ocular (SHAH *et al.*, 2001; SPICER *et al.*, 2002; CHAN *et al.*, 2007; BRUSCHI *et al.*, 2008; CARVALHO, F. C. *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013b; BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

O *trans*-resveratrol (RES) mostrou atividade no tratamento da DA, atuando em vias moleculares específicas, como a capacidade de inibir a formação da placa amilóide, despolimerização da placa formada durante a doença, atuando sobre o sistema colinérgico, inibindo a acetilcolinesterase, e também sobre a neuroinflamação pela diminuição da formação de radicais livres no cérebro (VINGTDEUX *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2014; REGE *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2017; WANG, R. *et al.*, 2017; WAŞIK e ANTKIEWICZ-MICHALUK, 2017). No entanto, seu uso clínico tem muitos desafios porque as características físico-químicas resultam em baixa solubilidade sendo pouco biodisponível (ATANACKOVIĆ *et al.*, 2012; ROBINSON *et al.*, 2015) pela via oral (WALLE *et al.*, 2004; WALLE, 2011). Assim, a sua incorporação em sistemas nanoestruturados baseados em tensoativos e a utilização de vias alternativas de administração, como a nasal, mostram ser uma ferramenta interessante e promissora (AMRI *et al.*, 2012; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015).

A administração nasal apresenta vantagens como a alta permeabilidade, alta irrigação sanguínea e ausência de metabolismo de primeira passagem, passando a barreira hematoencefálica através de bulbo olfativo, otimizando sua ação no sistema nervoso central (SNC) (ILLUM, 2002; 2003; DJUPESLAND, 2013; WARNKEN *et al.*, 2016). Entretanto, existem alguns desafios que podem limitar a absorção de fármacos, como o mecanismo de depuração mucociliar que pode remover a formulação da cavidade nasal (MARTTIN *et al.*, 1998; ARMSTRONG *et al.*, 2014). Uma estratégia para superar esses obstáculos é o uso de sistemas de geleificação *in situ*, uma vez que podem aumentar o contato entre a formulação e sua absorção na cavidade nasal, diminuindo a depuração mucociliar, aumentando assim a absorção sistêmica da RES e/ou sua vetorização para o cérebro.

Neste contexto, estudos vinculados ao nosso grupo de pesquisa, têm buscado o desenvolvimento de sistemas de geleificação *in situ* baseados em anfifílicos com

potencial aplicação para administração em vias não-invasivas. Estes estudos mostram aplicabilidade na administração destas formulações, em sua maioria utilizando álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PPG-5-CETETH-20), destacando o potencial na administração bucal (BERNEGOSSI *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2018; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2019), vaginal (SALMAZI *et al.*, 2015; RODERO *et al.*, 2018; DE ARAUJO *et al.*, 2019) e nasal (CARVALHO, F. C. *et al.*, 2010; CARVALHO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013b; SANTOS, 2018). Dentre a via nasal, destaca-se o potencial do controle da liberação e capacidade de absorção de fármacos através da mucosa da via nasal (CARVALHO *et al.*, 2013b; SANTOS, 2018).

Em estudos anteriores, a rifampicina foi carregada em sistemas precursores de cristais líquidos e os resultados sugeriram que nos ensaios farmacocinéticos, a absorção nasal da rifampicina carregada por tais sistemas é de 2 a 4 vezes maior utilizando a via nasal quando comparada à administração oral (SANTOS, 2018). Zidovudina foi carregada em sistemas precursores de cristais líquidos e foi evidenciado que através de estudos pré-clínicos, o sistema precursor de cristal líquido administrado via nasal resultou em um perfil de concentração plasmática do fármaco semelhante à administração intravenosa de uma solução aquosa do mesmo (CARVALHO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013b). Estes dados são promissores, uma vez que esta plataforma tecnológica representa uma potencial ferramenta para liberação na terapia antirretroviral e bacteriana.

Neste sentido, no presente estudo prosseguiu-se com os estudos de delineamento de um sistema para geleificação *in situ* para a cavidade nasal contendo resveratrol, com a realização de estudos tecnológicos, de eficácia e segurança das formulações. Para tanto, desenvolveu-se dois tipos de formulações baseadas em álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP e álcool oleílico etoxilado 20 OE, esta última sendo inovadora e inédita. Por fim, proceder-se-á avaliação citotóxica e biológica em modelo de Alzheimer induzido pela administração intra-nasal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença crônica neurodegenerativa progressiva causando de 60% a 70% dos casos de demência (BURNS e ILIFFE, 2009; WHO, 2016), bem como uma das principais causas de mortalidade (KATZMAN, 1976; KATZMAN, 2008), sendo a sexta causa de morte para indivíduos com 65 anos ou mais (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). O sintoma mais comum é a dificuldade em lembrar eventos recentes ou perda de memória de curto prazo (BALLARD *et al.*). Entretanto, com o avanço da doença, os sintomas podem incluir problemas com a linguagem, desorientação espacial, mudanças de humor, perda de motivação, e problemas comportamentais (SPALLETTA *et al.*, 2010; REITZ *et al.*, 2011). Embora a velocidade de progressão da DA possa variar, a expectativa de vida média após o diagnóstico é de três a nove anos (QUERFURTH e LAFERLA 2010; TODD *et al.*, 2013). É a quinta causa de morte para aqueles com 65 anos ou mais. Independentemente da causa da morte, entre as pessoas de 70 anos, 61% das pessoas com Alzheimer são esperados para morrer antes dos 80 anos, em comparação com 30% das pessoas sem Alzheimer (ARRIGHI *et al.*, 2010).

As características neuropatológicas do cérebro com a DA são a presença de placas amiloides extracelulares neuríticas e difusas – que são frequentemente cercadas por neurites distróficos – e emaranhados neurofibrilares intracelulares (BALLARD *et al.*, 2011; REITZ *et al.*, 2011). Também são, muitas vezes, acompanhadas pela presença de microgliose reativa e perda de neurônios, da substância branca e de sinapses (STREIT, 2004; AVILA, 2007; REITZ *et al.*, 2011; ROBAKIS).

Na AD, as placas desenvolvem-se no hipocampo, estrutura localizada no córtex cerebral, importante para converter a memória a curto prazo em memória a longo prazo (SQUIRE *et al.*, 2004; PRESTON e EICHENBAUM, 2013; ZAREI *et al.*, 2013). Os mecanismos etiológicos subjacentes às alterações neuropatológicas na DA permanecem obscuros, mas são provavelmente afetados por fatores ambientais e genéticos (HARDY *et al.*, 2004; CRAFT, 2007; REITZ e MAYEUX, 2014; BARTOLOTTI e LAZAROV, 2016; UCHOA *et al.*, 2016).

Não existem tratamentos farmacológicos que parem ou revertam sua progressão, embora alguns fármacos possam melhorar a fase sintomática da doença (MASSOUD e LÉGER, 2011; WINSLOW *et al.*, 2011; BISHARA *et al.*, 2015). O tratamento de problemas comportamentais ou psicose devido à demência com antipsicóticos é uma prática comum (MADHUSOODANAN *et al.*, 2007; MADHUSOODANAN e SHAH, 2008; WANG *et al.*, 2014).

DA é uma das principais causas de morte nos EUA, sabe-se que enquanto as mortes por outras causas importantes vêm diminuindo, as mortes de AD vêm aumentando (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Nos países desenvolvidos, a DA é uma das doenças mais financeiramente dispendiosas (WIMO *et al.*, 2010). Os custos associados com a demência estão correlacionados com o aumento da idade e são de crescente preocupação para os políticos, profissionais de saúde e familiares de pacientes com demência (BONIN-GUILLAUME *et al.*, 2005; HURD *et al.*, 2013). As estimativas atuais são aproximadas, mas a demência parece ser a doença mais cara para a sociedade após a idade de 65 anos na França, nos Países Baixos, na Suécia ou nos Estados Unidos (BONIN-GUILLAUME *et al.*, 2005).

O total estimado de custos mundiais de demência foi de US\$ 604 bilhões em 2010. Aproximadamente 70% dos custos ocorreram na Europa Ocidental e na América do Norte. Nessas regiões de alto rendimento, os custos dos cuidados informais e os custos diretos dos cuidados sociais contribuem para proporções semelhantes dos custos totais (WIMO *et al.*, 2010). Em 2016, nos EUA, para todos os indivíduos com doença de Alzheimer e outras demências são estimados em US \$ 236 bilhões (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

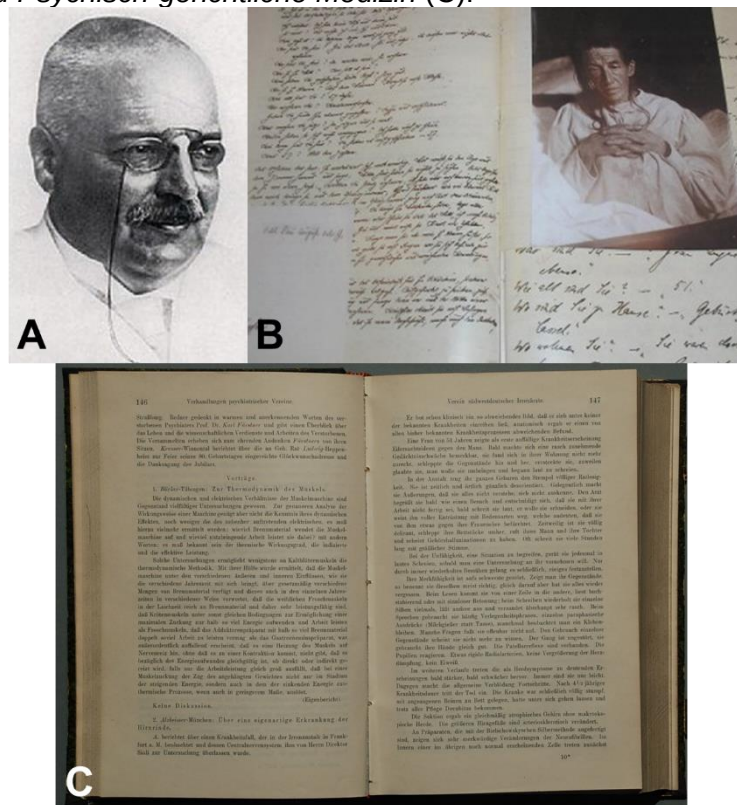
2.1.1 Histórico

Em 1901, Alois Alzheimer, um psiquiatra alemão, observou uma paciente, no Asilo de Frankfurt, chamada Sra. Auguste Deter. Essa mulher de 51 anos sofria de uma perda de memória de curto prazo, além de desorientação, depressão e alucinações (HOLSTEIN, 1997). Cinco anos depois, em abril de 1906, a paciente faleceu e então Alzheimer enviou cérebro da paciente e os registros médicos para Munique, onde trabalhava no laboratório do Dr. Emil Kraepelin. Ao colorir seções do

cérebro no laboratório, ele foi capaz de identificar placas amiloides e os emaranhados neurofibrilares (HOLSTEIN, 1997; HIPPIUS e NEUNDÖRFER, 2003).

Um discurso dado pelo Dr. Alzheimer em 3 de novembro de 1906, foi a primeira vez que a doença e os sintomas clínicos do transtorno, que na época era denominada de demência pré-senil, foram apresentados em conjunto (HOLSTEIN, 1997; HIPPIUS e NEUNDÖRFER, 2003). ALZHEIMER (1907) publicou suas descobertas para o comunidade científica da época. A Figura 1 mostra imagens históricas baseadas nessa descoberta.

Figura 1. Fotografia de Alois Alzheimer (A). Notas médicas escritas por A. Alzheimer e foto da paciente A. Deter (B). Estudo publicado por Alzheimer em 1907 no *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* (C).



Fonte: Esquema elaborado pelo autor.

Nos últimos 20 anos, ocorreu um progresso substancial na compreensão da neurogenética e fisiopatológica da DA (GOEDERT e SPILLANTINI, 2006; HOLTZMAN *et al.*, 2011). Os mecanismos pelos quais a proteína amiloide alterada, metabolismo das proteínas tau, a (neuro)inflamação, o estresse oxidativo, novos alvos moleculares no processo degeneração neuronal na DA estão sendo elucidadas e as intervenções farmacológicas racionais baseadas nessas descobertas estão sendo desenvolvidas (BEHL, 1999; CITRON, 2002; LAHIRI *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2011; ANSARI e

KHODAGHOLI, 2013; ATTA-UR-RAHMAN e CHOUDHARY, 2015; ROBERT *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2016).

2.1.2 Fisiopatologia da DA

AD é caracterizada pela perda sináptica e pela morte neuronal nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, hipocampo, córtex entorrinal e o corpo estriado ventral (SELKOE, 2001). Presença de atrofia cortical difusa (SERRANO-POZO *et al.*, 2011) e no parênquima cerebral de pacientes com DA, os depósitos fibrilares amilóides localizados nas paredes dos vasos sanguíneos estão associadas a uma variedade de tipos diferentes de placas senis, à acumulação de filamentos anormais da proteína tau e à formação subsequente de emaranhados neurofibrilares, além de perda neuronal e sináptica, ativação das células gliais e a inflamação (SELKOE, 2001; CREWS e MASLIAH, 2010).

Duas hipóteses principais têm sido propostas para a etiologia e fisiopatologia da DA: a primeira hipótese refere-se à neurodegeneração em cascata amiloide (HARDY e SELKOE, 2002; PIMPLIKAR, 2009), enquanto a segunda refere-se à disfunção do sistema colinérgico (KÁSA *et al.*, 1997; FRANCIS *et al.*, 1999). Outras hipóteses têm sido propostas como a agregação da proteína tau (MUDHER e LOVESTONE, 2002; IQBAL *et al.*, 2005), toxicidade mediada por metais alterando a homeostase cerebral (BUSH, 2003; ROBERT *et al.*, 2015), estresse oxidativo (SMITH *et al.*, 2000; CHAUHAN e CHAUHAN, 2006), hipótese da inflamação (ZOTOVA *et al.*, 2010; WYSS-CORAY e ROGERS, 2012), hipótese glutamatérgica (MARAGOS *et al.*, 1987; FRANCIS, 2005; DANYSZ e PARSONS, 2012) e a hipótese da resistência à insulina (WATSON e CRAFT, 2003; RASGON e JARVIK, 2004; CRAFT, 2007).

2.1.2.1 Hipótese da cascata amiloide

De acordo com a hipótese de neurodegeneração em cascata amiloide, a DA inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição de β -amilóides ($A\beta$) e placas $A\beta$ (HARDY e ALLSOP, 1991; HARDY e SELKOE, 2002; FINDER e GLOCKSHUBER, 2007).

Na DA ocorre o acúmulo da proteína A β anormalmente e pela proteína do tau no cérebro (HASHIMOTO *et al.*, 2003). As placas são compostas de peptídeos pequenos, 39 a 43 unidades, sendo um fragmento da APP. APP é uma proteína transmembrana presente nos neurônios tendo um papel no crescimento de neurônios, sobrevivência e reparação pós-lesão (TURNER *et al.*, 2003; PRILLER *et al.*, 2006; GRALLE e FERREIRA, 2007). Na DA, a gama-secretase e beta-secretase agem em conjunto num processo proteolítico que faz com que a APP seja dividida em fragmentos menores e solúveis (HOOPER, 2005), a polimerização gera agregados fibrilares de A β , que então formam aglomerados insolúveis que se depositam fora dos neurônios em formações densas conhecidas como placas senis (OHNISHI e TAKANO, 2004; TIRABOSCHI *et al.*, 2004).

A estrutura em grampo do A β pode rearranjar-se em diferentes conformações, o que explicaria a variedade de espécies oligoméricas observadas dependentes do ambiente celular (GU *et al.*, 2013). A agregação de monômeros de A β é passível de ocorrer por meio de diferentes mecanismos. Inicialmente, pode haver a dimerização do peptídeo formando oligômeros fibrilares que, em seguida, polimerizam-se para formar fibrilas amiloides maduras (HANE *et al.*, 2013; HANE e LEONENKO, 2014). O mesmo dímero pode formar oligômeros pré-fibrilares, gerando em seguida protofibrilas que podem sofrer uma mudança conformacional em bloco para formar fibrilas amiloides (NILSBERTH *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2011).

Na presença de a β ₁₋₄₂, os neurônios do córtex e do hipocampo também sofrem modificações, resultando na indução de déficits cognitivos, não ocorrendo a morte neuronal (DANYSZ e PARSONS, 2012). O acúmulo progressivo do A β , verificado experimentalmente por meio da administração repetida de A β em ratos, e a série de eventos que levam à formação das placas são, portanto, considerados importantes mecanismos nas fases iniciais de perda da memória (YAMADA *et al.*, 2005).

Apesar da presença notável de placas senis em cérebros de indivíduos afetados pela DA, o grau de demência nos pacientes se correlaciona melhor com os níveis cerebrais de A β solúvel do que com a quantidade de A β agregada (MCLEAN *et al.*, 1999). Esta importante observação neuropatológica suporta a noção de que as espécies responsáveis pela disfunção sináptica em pacientes com DA podem ser oligômeros solúveis, que interferem com a plasticidade sináptica (WANG *et al.*, 2002) e induzem rapidamente a falha desta (WALSH *et al.*, 2002; BIESCHKE *et al.*, 2012),

além de danificar imediatamente as sinapses neuronais, levando à morte celular (LAMBERT *et al.*, 1998).

Resultados e evidências têm sido publicados através dos anos, tanto a partir de estudos *in vitro* quanto com modelos animais, corroborando a hipótese de que a forma oligomérica é a que melhor explica a neurotoxicidade do A β (LUE *et al.*, 1999; KNOBLOCH *et al.*, 2007; PUZZO *et al.*, 2008; FERREIRA e KLEIN, 2011).

Os distúrbios de produção e agregação do peptídeo A β na origem da patologia da DA não é totalmente conhecido (VAN BROECK *et al.*, 2007; HUANG e MUCKE, 2012). A hipótese de amilóide tradicionalmente aponta para a acumulação de peptídeos A β como o evento central que desencadeia a degeneração dos neurônios. A acumulação de fibrilas A β agregadas, que acredita ser a forma tóxica responsável pela interrupção da homeostase do íon cálcio da célula, induz apoptose neuronal (YANKNER *et al.*, 1990), acumula-se seletivamente nas mitocôndrias nas células dos cérebros, inibe funções enzimáticas e a utilização da glicose pelos neurônios (CHEN e YAN, 2006).

2.1.2.2 Hipótese da proteína tau

As proteínas tau são proteínas que estabilizam os microtúbulos que estão abundantes nos neurônios e células gliais do SNC, sendo expressos em níveis muito baixos nos astrócitos e oligodendrócitos (GOEDERT *et al.*, 1989; FERRER *et al.*, 2005).

A presença de A β na patologia da DA, hiperfosforilar na serina da proteína que faz ligação com os microtúbulos nos neurônios. O aumento de fosforilação faz com que a tau se redistribua no interior do neurônico, agrega-se em aglomerados, chamados de emaranhados neurofibrilares, e resulta em disfunção do citoesqueleto da célula nervosa e consequentemente a morte celular (SENGUPTA *et al.*, 1998).

A fosforilação da tau nos resíduos de serina contidos nos domínios da cadeia da proteína induzir a alteração conformacional da tau e atenua sua ligação aos microtúbulos (GENDRON e PETRUCCELLI, 2009). A desestabilização do citoesqueleto pela fosforilação de tau nestes resíduos de serina leva a ruptura de funções celulares dependentes de tau, incluindo o crescimento axonal, o transporte de vesículas e

organelas, bem como a propagação do sinal nervoso ao longo da rede nervosa formada por microtúbulos (GENDRON e PETRUCCELLI, 2009; LAPOINTE *et al.*, 2009).

Entre 85 locais de fosforilação de tau, 28 são exclusivamente fosforilados em cérebros com DA, 16 são fosforilados tanto em DA como em cérebros controles, 31 são fosforilados em condições fisiológicas e 10 são sítios de fosforilação putativos sem uma enzima quinase identificada (MARTIN *et al.*, 2013).

Estudos indicam que o acúmulo de A β pode ser o evento ativador da hiperfosforilação da proteína tau, porém os fatores que desencadeiam este desequilíbrio ainda não são bem entendidos (SELKOE, 1996; SELKOE *et al.*, 2012). Emaranhados neurofibrilares que contêm proteínas tau hiperfosforiladas são encontrados também em outras doenças neurológicas, sugerindo fortemente que estas alterações do citoesqueleto possam ser uma resposta secundária, embora de importância, para as diversas lesões cerebrais (MUDHER e LOVESTONE, 2002; BLENNOW *et al.*; SERGEANT *et al.*, 2008; LEI *et al.*, 2010).

2.1.2.3 Hipótese colinérgica

A presença de placas senis, emaranhados neurofibrilares e morte neuronal extensa caracterizam a patologia da DA. Entretanto, as anormalidades colinérgicas, como a perda de marcadores colinérgicos pré-sinápticos no córtex cerebral, também são encontradas em cérebros acometidos pela DA (KIHARA e SHIMOHAMA, 2004).

As colinesterases (ChE) são uma classe de hidrolases de serina que hidrolisam ésteres de colina e ocorrem duas formas de ChE, codificadas por dois genes distintos, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) (MASSOULIÉ *et al.*, 1993). A principal função da AChE é a hidrólise rápida de acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas (TAYLOR e RADIC, 1994).

No SNC, ACh tem uma variedade de efeitos como um neuromodulador sobre plasticidade, excitação e recompensa (RASMUSSEN, 2000; PICCIOTTO *et al.*, 2012). ACh tem um papel importante no aumento das percepções sensoriais quando acordamos (JONES, 2005), na sustentação da atenção, memória e aprendizado (HASSELMO e BOWER, 1993; HASSELMO, 2006; MITSUSHIMA *et al.*, 2013). Subsequentemente, a hipótese colinérgica da DA obteve uma aceitação considerável e afirmou que uma perda grave da função colinérgica no sistema nervoso central

contribui para os sintomas cognitivos (BARTUS *et al.*, 1982; TERRY *et al.*, 1991; TERRY e BUCCAFUSCO, 2003).

Uma das principais características neuroquímicas da DA é a inervação reduzida de todas as partes do córtex cerebral por fibras colinérgicas originadas no núcleo basal de Meynert (BARTUS *et al.*, 1982; WENK, 1997). O déficit cognitivo resultante é mais provável agravado por uma perda da ligação dos receptores nicotínicos de aproximadamente 40% de receptores nicotínicos (nAChR) no córtex cerebral (BURGHAUS *et al.*, 2000). Os estudos de ligação realizados com o uso de [3H]-nicotina e [3H]-ACh mostraram uma redução significativa nos locais de ligação à nicotina e ACh no córtex cerebral de pacientes que sofrem de AD, demonstrando uma diminuição das populações nAChR e mAChR (SHIMOHAMA *et al.*, 1986; PATERSON e NORDBERG, 2000; GOTTI *et al.*, 2006).

Além dos receptores de ACh, a enzima colina-acetiltransferase (ChAT), envolvida na produção de ACh, também é afetada na DA. A atividade enzimática da ChAT, e consequentemente a síntese de ACh, está diminuída nos cérebros de portadores da DA. Além disso, vários autores observaram uma redução na atividade da AChE, a enzima que metaboliza a ACh após sua liberação na fenda sináptica (AULD *et al.*, 2002; SCHLIEBS e ARENDT, 2011).

Um aumento no fluxo de colina através das membranas de células neuronais expostas ao $\text{A}\beta$ tem sido hipotetizada para contribuir para a vulnerabilidade seletiva dos neurônios seletivos na DA (D. ALLEN *et al.*, 1997). Os resultados dos experimentos por KAR *et al.* (1998) utilizando fatias de hipocampo de rato indicaram que em condições agudas, os peptídeos podiam inibir a absorção de colina e diminuir a liberação endógena de acetilcolina sem apresentar efeitos na atividade de ChAT. Curiosamente, em estudos anteriores, detectaram um déficit na liberação de acetilcolina provocada pelo potássio no tecido cortical *post mortem* de pacientes com DA. As reduções nos receptores nicotínicos centrais em indivíduos idosos e aqueles que sofreram de AD ou outra doença relacionada com a idade em que a demência estava presente (PERRY *et al.*, 2000). Na AD, os receptores nicotínicos contendo $\alpha 4$ de alta afinidade parecem ser mais significativamente reduzidos do que os receptores contendo $\alpha 3$ ou $\alpha 7$, embora tenham sido observadas reduções nos locais de ligação $\alpha 7$ na doença de Corpo de Lewy (PICCIOTTO e ZOLI, 2002). Esta descoberta sugere

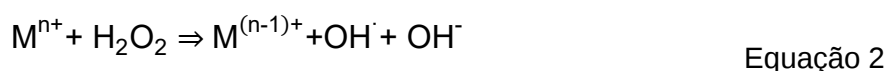
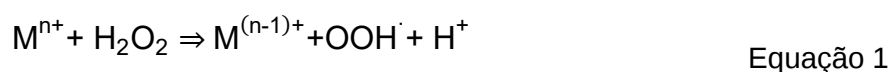
que os subtipos de receptores nicotínicos podem ser diferencialmente reduzidos em diferentes formas de demência.

A correlação dos índices clínicos de demência com as reduções de marcadores colinérgicos corticais, como a ligação ChAT, mAChR e nAChR, bem como níveis de acetilcolina (BIERER *et al.*, 1995; WIELAND *et al.*, 2004), sugeriram associação de hipofunção colinérgica com déficits cognitivos, o que levou à formulação da hipótese colinérgica da disfunção da memória na DA (BARTUS *et al.*, 1982; BARTUS, 2000; CRAIG *et al.*, 2011).

2.1.2.4 Hipótese da metalobiologia

A deposição de A β está aumentada em pacientes com DA quando há mutações em genes da APP e presenilina (PS) (HARDY e SELKOE, 2002; MATTSON, 2004) e o aumento na neurotoxicidade mediada por metais também está associado à deposição de A β (BUSH, 2013). Concentrações elevadas de A β é alta no cérebro levam a formação de fibras amiloides insolúveis que podem ser complexadas com zinco e cobre, agravando assim a toxicidade neuronal (GOURAS e BEAL, 2001). O cobre pode mediar a dimerização dos monômeros de A β , formando pequenos oligômeros de A β -Cu e, eventualmente, levando à formação de agregados maiores (HANE *et al.*, 2013; HANE e LEONENKO, 2014).

A interação de íons metálicos com A β e seus efeitos na agregação e toxicidade de A β têm sido relativamente bem caracterizadas (KEPP, 2012; SVELIEFF *et al.*, 2013). As espécies de A β ligadas ao cobre ou ferro, juntamente com íons metálicos redox ativos, podem gerar ROS por meio de reações semelhantes à Fenton (Equação 1 e Equação 2) (SVELIEFF *et al.*, 2013; TIIMAN *et al.*, 2013). As fibrilas de A β também poderiam atuar como um possível coletor para íons metálicos, promovendo a descompartimentalização dos íons metálicos (KEPP, 2012; TIIMAN *et al.*, 2013).



O cobre mostrou a capacidade de aumentar a agregação de A β e um estudo *in vitro* mostrou que a complexação de A β -cobre resultou na formação de peróxido de hidrogênio com propriedades neurotóxicas (HUANG *et al.*, 1999). Além disso, metais como cobre, ferro e zinco foram encontrados nos depósitos amilóides no cérebro de pacientes com DA (LOVELL *et al.*, 1998). A β quando coordenada com o cobre leva à geração de ROS envolvendo a redução do estado de oxidação do Cu²⁺ para Cu⁺ e esta redução deve ser acompanhada pela oxidação de outras moléculas endógenas como tióis, ascorbatos, lipídios ou cadeias laterais de A β (BUTTERFIELD *et al.*, 2001; BARNHAM *et al.*, 2003; PUGLIELLI *et al.*, 2005).

O mecanismo principal baseia-se na dishomeostase local de íons (Zn²⁺ ou Cu²⁺) que causa a formação de agregados de A β induzidos, os quais se transformam em fibrilas amiloides contendo o íon metálico correspondente. Estas fibrilas iniciais iniciam a fibrilação autocatalítica do A β que se reflete na concentração diminuída de A β no fluido cérebro espinhal, pois os monômeros de A β são adicionados às fibrilas e as placas amilóides são formadas. Nesta fase, os íons de cobre, bem como os íons de ferro que estão principalmente ligados à ferritina, podem também ligar-se às fibrilas e ser incorporados nas placas. Durante os processos de maturação, os cátions redox ativos de cobre e ferro tornam-se cineticamente presos dentro das placas e estão assim fora de alcance para sequestro por proteínas ou enzimas de ligação ao metal. Os íons aprisionados são capazes de ciclos redox, catalisando assim a produção de ROS e causando estresse oxidativo (TILMAN *et al.*, 2013).

O uso de quelantes nos tecidos *post-mortem* de pacientes com DA foi capaz de dissolver essas placas amiloides (CHERNY *et al.*, 1999) e um estudo *in vivo* usando modelo animal de DA mostrou que agentes quelantes possuem capacidade de solubilizar placas amiloides nos cérebros de ratos (CHERNY *et al.*, 2001). A degradação *in vitro* de A β adicionado ao líquido cefalorraquidiano foi acelerada em presença de zinco e cobre. Enquanto a interação excessiva com cobre e zinco pode induzir a precipitação neural de A β na DA, por outro lado a degradação de A β é normalmente promovida por concentrações fisiológicas de cobre e zinco (STROZYK *et al.*, 2009) evidenciando o papel desses íons na homeostase do SNC.

Em resumo, a hipótese do metal na DA, com a adição do conceito de que os efeitos (neuro)patogênicos de A β na AD são promovidos pela conjugação do peptídeo com metais parece ser uma hipótese viável (BARNHAM e BUSH, 2008; ZATTA *et al.*,

2009). As abordagens farmacêuticas cada vez mais sofisticadas são agora implementadas para atenuar interações anormais entre A β e metais sem causar uma perturbação em níveis sistêmicos. O tratamento da dishomeostase do metal pode ter um forte potencial terapêutico na DA (ZATTA *et al.*, 2009).

2.1.3 Sinais e sintomas da DA

A diferença entre sintoma e sinal é que o sinal é aquilo que pode ser percebido por outra pessoa sem o relato ou comunicação do paciente; e o sintoma é a queixa relatada pelo paciente, mas que só ele consegue perceber. Sintomas são subjetivos, sujeitos à interpretação do próprio paciente (NIH, 2017b; 2017a).

A demência é uma síndrome caracterizada por perturbação de múltiplas funções cerebrais, incluindo memória, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento. Os prejuízos da função cognitiva são comumente acompanhados, e ocasionalmente precedidos, pela deterioração do controle emocional, comportamento social ou motivação (PRINCE *et al.*, 2013).

A DA é a forma mais comum de demência e, possivelmente, contribui para 60-70% dos casos. Outros tipos de demências incluem demência vascular, demência com corpos de Lewy e um grupo de doenças que contribuem para a demência frontotemporal (ADI, 2009).

A demência pode afetar um paciente de diferentes maneiras, e a progressão da doença depende do impacto da doença em si e da personalidade da pessoa e do estado de saúde. A demência pode ser dividida em três etapas: (1) fase inicial – até 2 anos; (2) fase intermédia – 3 a 4 anos e; (3) fase tardia – 5 anos ou mais. Estes períodos são dados como uma orientação aproximada e nem todos os pacientes com demência irão apresentar os mesmos sintomas (JOTHEESWARAN *et al.*, 2010). O Quadro 1 ilustra os sintomas comuns de pacientes com demência.

Quadro 1. Sintomas comuns experimentados por pessoas com síndrome de demência.

Fase inicial	Fase intermediária	Fase tardia
Parentes e amigos podem ver o esquecimento como “velhice”, sendo uma parte normal do processo de envelhecimento. Porque o início da doença é gradual e é difícil ter certeza exatamente quando começa. - Pode ter alguma dificuldade com a comunicação, como dificuldade em encontrar palavras - Tornar-se perdido em lugares familiares - Perder a pista do tempo, incluindo a hora do dia, mês, ano, estação - Têm dificuldade em tomar decisões e lidar com as finanças pessoais - Têm dificuldade em realizar tarefas domésticas complexas - Humor e comportamento: - pode tornar-se menos ativo e motivado e perder o interesse em atividades e <i>hobbies</i> - Pode mostrar mudanças de humor, incluindo depressão ou ansiedade - Pode reagir de forma agressiva	À medida que a doença progride, as limitações tornam-se claras e mais restritivas. - Tornar-se muito esquecido, especialmente eventos e nomes de pessoas - Tem dificuldade em compreender o tempo, a data, o local e os eventos; - Podem se perder em casa, assim como na comunidade - Tem dificuldade crescente com a comunicação (fala e compreensão) - Precisa de ajuda com cuidados pessoais - Incapaz de preparar com sucesso a comida, cozinhar ou limpar - Incapaz de viver sozinho em segurança sem um apoio considerável - Alterações comportamentais podem incluir perguntas errantes, repetidas, gritando, apego, sono perturbado, alucinações (ver ou ouvir coisas que não existem) - Pode exibir comportamento inapropriado em casa ou na comunidade (ex. desinibição, agressão).	A última etapa é de dependência quase total e inatividade. Os distúrbios de memória são muito graves e o lado físico da doença torna-se mais óbvia. - Geralmente desconhece o tempo e o lugar - Tem dificuldade em entender o que está acontecendo à sua volta - Incapaz de reconhecer parentes, amigos e objetos familiares - Incapaz de comer sem ajuda, pode ter dificuldade em deglutir - Aumento da necessidade de autoatendimento assistido (banhos e necessidades fisiológicas) - Pode ter incontinência urinária e intestinal - Mudança na mobilidade, pode ser incapaz de caminhar ou ser confinado a uma cadeira de rodas ou cama - As mudanças de comportamento, podem escalar e incluir a agressão para o cuidador - Agitação não verbal (chutar, bater, gritar ou gemer) com o cuidador

Adaptado de: (WHO, 2016)

Os sintomas da DA variam entre os indivíduos. O sintoma inicial mais comum é um gradualmente piorar a capacidade de se lembrar de novas informações. Isso ocorre porque os primeiros neurônios a serem danificados e destruídos são geralmente em regiões do cérebro envolvidas na formação de novas memórias. Como neurônios em outras partes do cérebro são danificados e destruídos, os indivíduos experimentam outras dificuldades referentes com as áreas envolvidas (ALZHEIMER-ASSOCIATION, 2016).

Os testes neuropsicológicos detalhados podem revelar dificuldades cognitivas suaves até oito anos antes que uma pessoa preencha os critérios clínicos para o diagnóstico da DA (BÄCKMAN *et al.*, 2004). Estes primeiros sintomas podem afetar as atividades mais complexas da vida diária (NYGÅRD, 2003). O déficit mais notável é a perda de memória de curto prazo, que se mostra como dificuldade em lembrar fatos recentemente aprendidos e incapacidade de adquirir novas informações (ARNÁIZ e ALMKVIST, 2003; BÄCKMAN *et al.*, 2004). Apatia pode ser observada nesta fase de pré-demência, e continua a ser o sintoma neuropsiquiátrico mais persistente ao longo do curso da doença (LANDES *et al.*, 2001).

A disfunção da linguagem pode ocorrer como uma característica precoce na demência da DA e pode interferir consideravelmente com a comunicação à medida que o vocabulário e a compreensão do paciente tornam-se empobrecidos. Desorientação espacial leva a objetos perdidos e dificuldade de orientação espacial. Apraxia é uma incapacidade de realizar tarefas motoras praticadas, como escovar os dentes ou usar um controle remoto, por exemplo. Embora estes sintomas clássicos da DA sejam atribuíveis à disfunção cerebral posterior, a demência da AD normalmente causa alguma disfunção frontal mesmo no início da doença. Algumas variantes da DA apresentam sintomas predominantes de não-memória, incluindo disfunção visual-espacial grave (atrofia cortical posterior ou variante de Benson), problemas de linguagem (afasia semântica) ou disfunção comportamental (variante frontal) (DUBOIS *et al.*, 2007; BALLARD *et al.*, 2011).

A maioria dos pacientes com DA apresentam problemas comportamentais durante o curso da doença (SAVVA *et al.*, 2009). Depressão, distúrbios do sono ou apatia podem estar presentes precocemente. Sintomas psicóticos, agitação psicomotora, agressão verbal e física e comportamento sexual inapropriado tendem a aparecer durante estágios posteriores de demência (BALLARD

et al., 2009). Alterações de comportamento, desde apatia até delírios, alucinações, agitação e agressividade, são comuns no curso da doença, ocorrendo em cerca de 80% dos casos (TATSCH *et al.*, 2006). Um resumo das alterações da capacidade cognitiva está disposto no Quadro 2.

Quadro 2. Evolução geral das alterações cognitivas da DA.

Domínio cognitivo	Estágio		
	Inicial	Intermediário	Avançado
Memória	Evocação prejudicada para fatos recentes. Preservação relativas da memória remota	Memória remota afetada	Déficit grave
Funções executivas	Dificuldade em planejar atividades complexas	Planejamento alterados nas atividades	Déficit grave
Linguagem	Anomia leve e discreta redução da fluência	Redução maior da fluência; prejuízo da compreensão	Quase mutismo; possível repetição das palavras simples
Habilidades visuoespaciais	Dificuldade para dirigir; pode guardar objetos em locais inapropriados	Desorientação espacial; dificuldade na cópia de desenhos	Déficit grave
Gnosia visual	Relativamente preservada	Dificuldade em reconhecer familiares	Déficit grave
Praxias	Relativamente preservadas	Apraxia em vestir-se e usar utensílios	Déficit grave

Fonte: CHAVES *et al.* (2008)

O prejuízo crescente da aprendizagem e da memória eventualmente leva a um diagnóstico definitivo em pacientes na fase inicial. As dificuldades com a linguagem, as funções executivas, agnosia ou a apraxia são mais proeminentes do que os problemas de memória (FÖRSTL e KURZ, 1999). DA não afeta todas as capacidades de memória igualmente, as memórias mais antigas da vida da pessoa, chamada de memória episódica, os fatos aprendidos, chamados de memória semântica, e memória implícita, ou seja aquelas aprendidas de modo mecânico, são afetadas (CARLESIMO e OSCAR-BERMAN, 1992; JELICIC, 1995).

Nesta fase, os problemas de linguagem caracterizam-se principalmente por um vocabulário encolhido e uma diminuição da fluência das palavras, levando a um empobrecimento geral da linguagem oral e escrita (FÖRSTL e KURZ, 1999; TALER e PHILLIPS, 2008). Durante a execução de tarefas motoras finas, tais como escrever, desenhar ou vestir, certas coordenação de movimento e dificuldades de planejamento (apraxia) podem estar presentes, mas geralmente são despercebidas (FÖRSTL e KURZ, 1999).

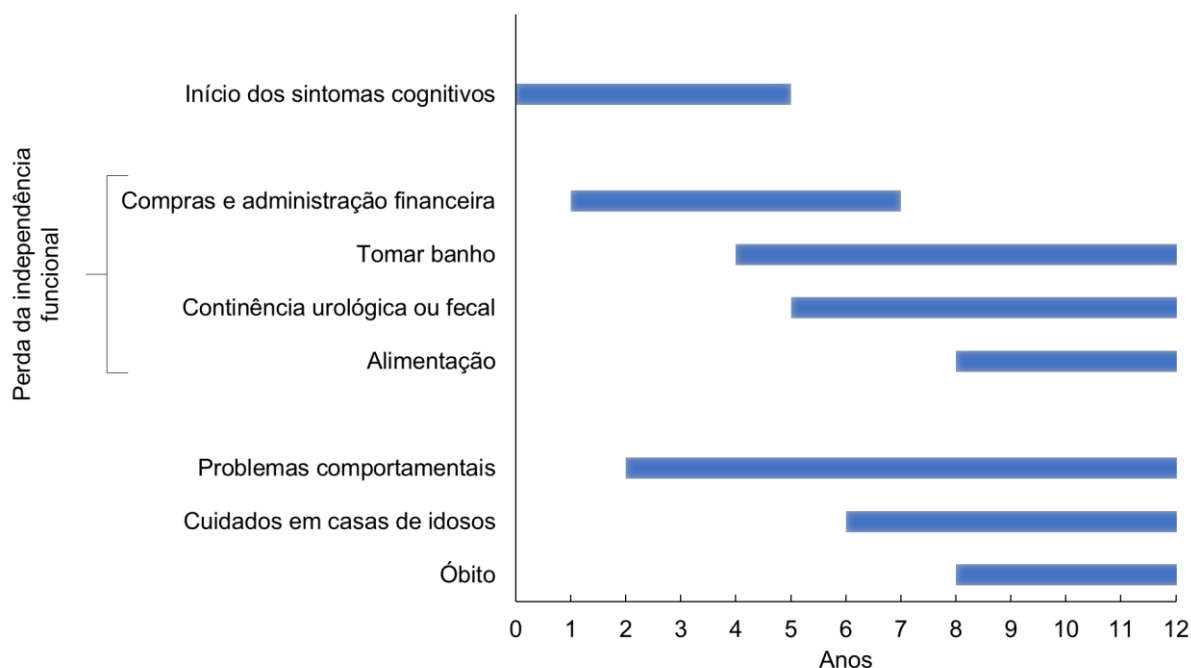
Na fase intermediária, a deterioração progressiva eventualmente impede a independência, com os pacientes sendo incapazes de realizar as atividades mais comuns da vida diária (FÖRSTL e KURZ, 1999). Dificuldades de fala tornam-se evidentes devido a uma incapacidade de lembrar o vocabulário, o que leva a frequentes substituições de palavras incorretas (parafases). As habilidades de leitura e escrita também são progressivamente perdidas (FRANK, 1994; MAHENDRA *et al.*, 2011). Durante esta fase, os problemas de memória pioram, e a pessoa pode deixar de reconhecer parentes próximos (agnosia) (FÖRSTL e KURZ, 1999; MINATI *et al.*, 2009). A memória de longo prazo, que era previamente intacta, torna-se prejudicada nesta fase (FÖRSTL e KURZ, 1999). Aproximadamente 30% das pessoas com AD desenvolvem ilusões e outros sintomas delirantes (BURNS e ILIFFE, 2009). Os pacientes também perdem a percepção do processo e das limitações da doença (anosognosia) (FÖRSTL e KURZ, 1999).

Durante o estágio avançado, o paciente é completamente dependente de cuidadores (ALZHEIMER-ASSOCIATION, 2016). A linguagem é reduzida a frases simples ou mesmo a palavras isoladas, levando eventualmente à completa perda da fala (FRANK, 1994). Apesar da perda de habilidades de linguagem verbal, as pessoas muitas vezes podem entender e retornar sinais emocionais. Embora a agressividade ainda possa estar presente, extrema apatia e exaustão são sintomas muito mais comuns. A massa muscular e a mobilidade deterioram-se até o ponto em que são acamadas e incapazes de se alimentar. A causa da morte é geralmente um fator externo, como a infecção de úlceras de pressão ou pneumonia, e não a própria doença (FÖRSTL e KURZ, 1999).

Clinicamente, as pessoas com doença de Alzheimer demonstram um declínio lento e progressivo em várias áreas, incluindo a cognição e a capacidade de realizar atividades da vida diária. Distúrbios de comportamento, variando em severidade de

questionamento repetido a violência física, são comuns. A duração média da doença é de 10 anos, durante o qual os pacientes progridem de perda leve de memória para a necessidade de supervisão de um cuidador para total dependência (SLOANE, 1998). Esses dados estão dispostos na Figura 2.

Figura 2. Ocorrência das típicas de manifestações durante o percurso da doença de Alzheimer.



Adaptado de: SLOANE (1998)

2.1.4 Tratamento e terapia farmacológica da DA

A atual abordagem farmacológica do tratamento da DA é baseada na prevenção vascular e na terapêutica sintomática com inibidores da colinesterase e antagonistas de N-metil-d-aspartato (NMDA). Os inibidores da colinesterase são incluídos em fármacos como donepezil, rivastigmina, galantamina (MASSOUD e LÉGER, 2011) e tacrina (WINSLOW *et al.*, 2011). Esses fármacos atuam inibindo a ação da AChE e otimizando os níveis de acetilcolina disponíveis para estimulação pós-sináptica (BENTLEY *et al.*, 2009).

Os inibidores da AChE estão associados com efeitos adversos gastrointestinais como náuseas e vômitos que mais comumente levam à descontinuação do tratamento (MEHTA *et al.*, 2012; ČOLOVIĆ *et al.*, 2013). A tacrina tem uma meia-vida biológica

curta e necessita de quatro administrações por dia (JANN *et al.*, 2002). Além disso, os pacientes que usam este fármaco necessitaram de monitorização periódica devido à hepatotoxicidade (WATKINS *et al.*, 1994). Além disso, a galantamina e a rivastigmina exibem uma meia-vida de 7 e 2 horas, respectivamente. O uso de memantina pode causar efeitos adversos como tonturas, confusão, constipação e vômito (RAINA *et al.*, 2008). Rivastigmina na forma transdérmica podem ser melhor tolerados do que a rivastigmina pela via oral (WENTRUP *et al.*, 2008). A tacrina não está mais disponível devido a preocupações de segurança e tolerabilidade (WINSLOW *et al.*, 2011). Um resumo dos parâmetros farmacocinéticos dos fármacos usados na DA está mostrado no Quadro 3.

Quadro 3. Resumo dos parâmetros farmacocinéticos dos inibidores da colinesterase e da memantina.

Fármaco	Bd (%)	t _{max} (h)	LPP (%)	t _{1/2} (h)	Metabolismo hepático
Tacrina [†]	17-37	0,5-3	75	1,3-7	CYP1A2 CYP2D6
Donepezila [•]	100	3-5	96	60-90	CYP2D6 CYP3A4
Galantamina [†]	85-100	0,5-1,5	18	5-7	CYP2D6 CYP3A4
Risvastigmina [†]	40	0,8-1,7	40	2	Não hepática
Memantina [‡]	100	3-7	45	60-80	ND

Abreviaturas: CYP, citocromo P450; t_{max}, tempo até à concentração sérica; máxima; h, horas; LPP, ligação às proteínas plasmáticas; Bd, biodisponibilidade; t_{1/2}, meia-vida; ND, não disponível. [†] Utilizado em estágio inicial a moderada; [‡] Para doença moderada a grave associado ou não com IChEs. [•] Todos os estágios. **Adaptado de:** FONSECA-SANTOS *et al.* (2015)

A memantina é um antagonista de NMDA que atua como um antagonista não competitivo do receptor de glutamato (STUART, 2005; KAVIRAJAN, 2009). A excitotoxicidade relacionada ao glutamato resultante de uma ativação excessiva de receptores de aminoácidos neuronais (MARK *et al.*, 2001) está envolvida na fisiopatologia de AD (MOLINUEVO *et al.*, 2005). A memantina atua no sistema glutamatérgico bloqueando os receptores de NMDA e este bloqueando os efeitos sobre a redução da atividade do glutamato nas células cerebrais e bloqueando a atividade do neurotransmissor (CACABELOS *et al.*, 1999; XIA *et al.*, 2010). Em níveis

normais, o glutamato está ligado com os processos de memória e aprendizado, mas em níveis muito altos, o glutamato parece estimular as células nervosas, matando-as por excitotoxicidade (RAMMES *et al.*, 2008). A interação da memantina com os receptores de NMDA desempenha um papel importante na melhoria sintomática na DA. Além disso, ainda não há provas de que a capacidade da memantina para proteger contra a excitotoxicidade mediada pelo receptor NMDA tenha um efeito modificador da doença na DA, embora isto tenha sido sugerido em modelos animais (PARSONS *et al.*, 2007).

Nenhum dos tratamentos farmacológicos disponíveis hoje para a DA retarda ou reverte o dano e a destruição de neurônios que causam sintomas e levam a mortalidade e morbidade. Os seis medicamentos aprovados¹ pela FDA para o tratamento da DA melhoram temporariamente os sintomas, aumentando a quantidade de neurotransmissores no cérebro. A eficácia destes fármacos varia de pessoa para pessoa (ALZHEIMER-ASSOCIATION, 2016).

De 2002-2012, foram testados 244 fármacos para a DA em ensaios clínicos registrados pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA, sendo estudos clínicos públicos e privados (CUMMINGS *et al.*, 2014). Apenas um dos 244 protótipos concluiu com sucesso ensaios clínicos e recebeu a aprovação do FDA. Muitos fatores contribuem para a dificuldade de desenvolver tratamentos eficazes para a DA (CUMMINGS *et al.*, 2014). Estes fatores incluem o alto custo do desenvolvimento de fármacos (RAWLINS, 2004), o tempo relativamente longo para observar se um tratamento em investigação afeta a progressão da doença e a estrutura do cérebro (SCHNEIDER *et al.*, 2014), erros nas diretrizes das fases pré-clínica e clínica do desenvolvimento de fármacos (SCHNEIDER *et al.*, 2014), baixa permeabilidade pela BHE, através da qual apenas as moléculas específicas podem atravessá-la (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2005; BANKS, 2008; CHEN e LIU, 2012; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015), resultam em falhas nas etapas clínicas.

2.2 *Trans*-resveratrol: aspectos farmacocinéticos, biofarmacêuticos, e farmacodinâmicos na DA

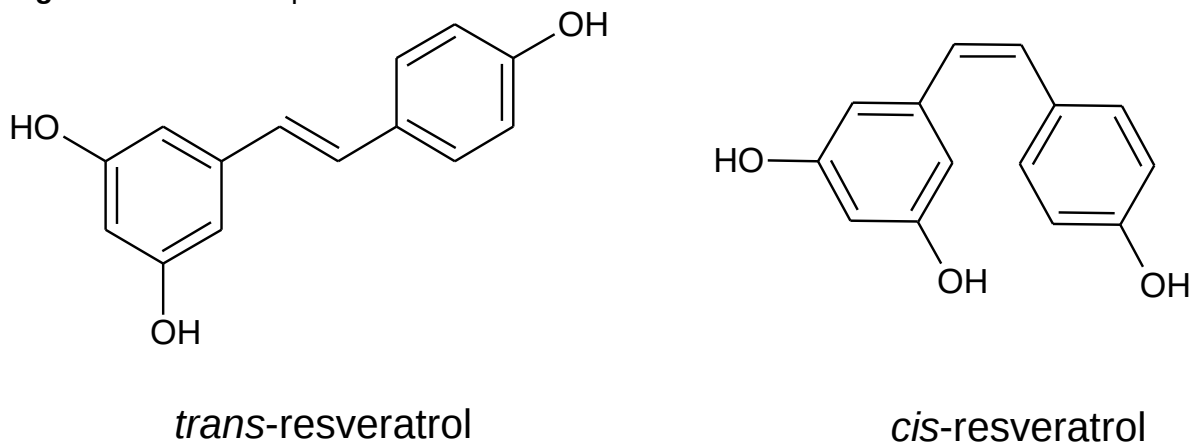
¹ Tacrina (descontinuado nos Estados Unidos devido aos efeitos colaterais potencialmente graves), galantamina, rivastigmina, donepezila, memantina e um medicamento que combina memantina e donepezil.

O *trans*-RES (3, 5, 4'-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno) é um tipo de polifenol produzido em várias plantas, especialmente na cascas e sementes de uvas (YILMAZ e TOLEDO, 2004). Devido à alta concentração dessa substância na casca das uvas, há uma quantidade significativa de RES no vinho tinto (GUERRERO *et al.*, 2009).

O RES apresenta-se como um pó esbranquiçado, com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, peso molecular igual a 228,25 g mol⁻¹ (O'NEIL *et al.*, 2006), solubilidade em água de 0,03 g/L, solubilidade em DMSO de 16 g/L, solubilidade em etanol igual a 50 g/L, ponto de fusão entre 253 e 255 °C (AMRI *et al.*, 2012) e um de log P igual a 3,1 (KRISTL *et al.*, 2009). Apesar de apresentar baixa solubilidade em água, o RES exibe alta permeabilidade da membrana e pode ser considerado um componente classe-II (AMRI *et al.*, 2012) no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON *et al.*, 1995).

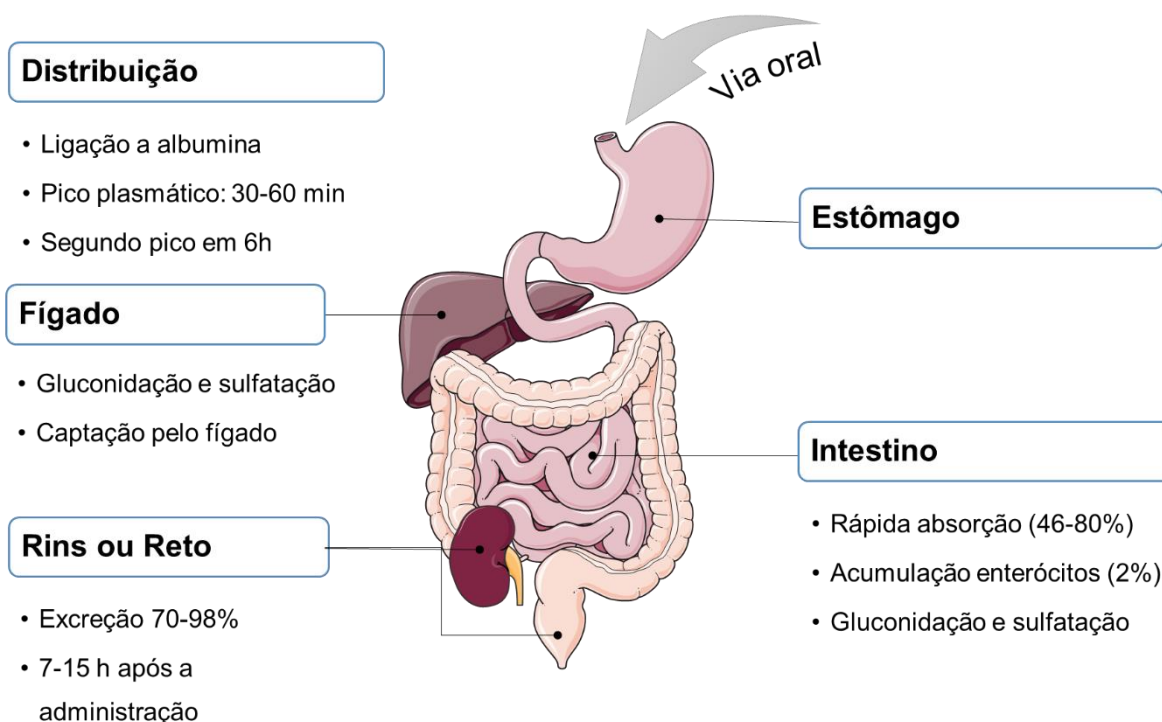
O RES exibe duas formas isoméricas estruturais: *cis*- (Z) e *trans*- (E) (Figura 3). O isômero *trans* é biologicamente mais ativo do que o isômero *cis*, provavelmente devido à sua conformação não planar (ANISIMOVA *et al.*, 2011). O *cis*-RES foi relatado como instável e, portanto, não está disponível comercialmente (FRANCIOSO *et al.*, 2014). Na verdade, quando protegido da luz, o *trans*-RES é estável por pelo menos 42 h (DPR ≤ 1%) e em 28 dias (DPR ≤ 4,7%) em tampões variando o pH de 1-7, enquanto que a forma *cis* é apenas estável em pH neutro e quando completamente protegido da luz (TRELA e WATERHOUSE, 1996). Por outro lado, VIAN *et al.* (2005) demonstraram que 80-90% do *trans*-RES em solução foi convertido em *cis*-RES se exposto à luz durante 1 h .

Figura 3. Estruturas químicas do *trans*-RES e *cis*-RES.



O destino *in vivo* do RES após administração oral foi reconstituído com base em dados diversos obtidos *in vitro* em culturas celulares em modelos de intestino delgado *ex vivo* e em modelos animais *in vivo* e em seres humanos (Figura 4).

Figura 4. Rotas farmacocinéticas *in vivo* do resveratrol após administração oral. Ilustração esquemática baseada em dados diversos obtidos *in vitro* em culturas celulares, *ex vivo* em modelos isolados de intestino delgado e *in vivo* em animais e humanos.



Adaptado de: AMRI *et al.* (2012).

Estudos farmacocinéticos em voluntários do sexo masculino após a ingestão de comprimidos contendo 500 mg de RES mostraram que valores de C_{max} para RES, RES glicuronado e RES sulfatado foram $71,2 \pm 42,4 \text{ ng mL}^{-1}$, $4.083,9 \pm 1.704,4 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1.516,0 \pm 639,0 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto os valores de $AUC_{0-\infty}$ foram $179,1 \pm 79,1 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $39.732,4 \pm 16.145,6 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $14.441,7 \pm 7.593,2 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (SERGIDES *et al.*, 2016). Esses dados corroboram com estudos anteriores, os quais demonstraram que o RES é bem absorvido após a administração oral, cerca de $\sim 75\%$ da dose é absorvida (AMRI *et al.*, 2012). Entretanto após o processo de absorção, o RES sofre um metabolismo rápido e extensivo, levando a baixa biodisponibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2009; COTTART *et al.*,

2010), principalmente metabolizado nos intestinos e no fígado, e seus principais metabolitos são conjugados glicuronídeos e sulfatos de RES (KUHNLE *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2010; ROTCHES-RIBALTA *et al.*, 2012).

A absorção intestinal como resultado de um processo de difusão passiva com velocidade rápida foi observada em modelo de células Caco-2 (KALDAS *et al.*, 2003) e é estimada em 46% em intestino delgado perfusado de rato, além da acumulação em enterócitos (ANDLAUER *et al.*, 2000); 77-80% em ratos (SOLEAS *et al.*, 2001) e pelo menos 70% em humanos (WALLE *et al.*, 2004; WALLE, 2011). O metabolismo de fármacos pela flora bacteriana do cólon também é considerado uma importante via metabólica (WALLE, 2011). Para o RES, os níveis plasmáticos dos metabolitos conjugados foram relatados como sendo maiores em comparação com os do composto original em estudos com animais e em humanos (MUZZIO *et al.*, 2012). O metabolismo dentro do enterócito consiste na formação de glicuroconjugados e sulfoconjugados de RES que são absorvidos em direção ao espaço vascular ou excretados no lúmen [(ANDLAUER *et al.*, 2000); sulfatação e glucuronidação também ocorrem no duodeno humano (DE SANTI *et al.*, 2000) e nas linhagens de células intestinais Caco-2 humana (KALDAS *et al.*, 2003; MAIER-SALAMON *et al.*, 2006).

A ocorrência do RES na circulação mesentérica representa 21% no intestino delgado de rato após perfusão (ANDLAUER *et al.*, 2000), além do RES possuir ligação à albumina sérica (JANNIN *et al.*, 2004; LANÇON *et al.*, 2004) e com lipoproteína humana de baixa densidade (URPÍ-SARDÀ *et al.*, 2005). A absorção hepática resulta da contribuição de um processo de difusão passiva e de um processo mediado por transportador na linha celular de hepatoblastoma humano HepG2 e em hepatócitos humanos (LANÇON *et al.*, 2004). O metabolismo hepático consiste em sulfatação e glucuronidação conforme evidenciadas em amostras de fígado humano (DE SANTI *et al.*, 2000).

A distribuição sistêmica em roedores é caracterizada por uma concentração máxima a 30 min (SOLEAS *et al.*, 2001), com metabolitos tornando-se detectáveis 3 h após a administração (YU *et al.*, 2002; SALE *et al.*, 2004). Em seres humanos, o RES livre em plasma e sérico representa menos de 2% do RES total (WENZEL e SOMOZA, 2005). Um recente estudo realizado por MENET *et al.* (2017) mostrou que no fígado, coração e cérebro, o padrão de concentração livre de RES foi semelhante ao do plasma, além disso a presença de RES no cérebro de ratos provavelmente

depende da dose administrada. Outro estudo elucidou a biodisponibilidade cerebral do *trans*-RES monitorando as concentrações cerebrais e os tempos de permanência após a administração de RES através de via intragástrica (via oral), intraperitoneal, artéria carótida externa e intratecal. Os resultados sugerem que, embora o RES seja capaz de atravessar a BHE, não atinge níveis terapêuticos no cérebro através de rotas convencionais de administração sistêmica, tais como a via oral e intraperitoneal (SHU *et al.*, 2015). Outro estudo, mostrou que a administração i.p. de RES na dose de 2 mg kg⁻¹ resulta na concentração de ~1 µg g⁻¹ em cérebro de ratos em 90 minutos (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2016). Os dados corroboram com outro estudo que encontrou cerca de ~3 µg g⁻¹ em cérebros de ratos após 90 minutos e na dose de 5 mg kg⁻¹ (JOSE *et al.*, 2014).

Células endoteliais microvasculares cerebrais humanas imortalizadas (hCMEC / D3) mostram morfologia semelhante às culturas primárias de células endoteliais do cérebro, representando um modelo de BHE humana que pode ser facilmente cultivado e é muito útil para estudos celulares e moleculares (WEKSLER *et al.*, 2013). Um estudo realizado neste tipo de cultura de células para avaliar a permeabilidade de RES, os resultados mostraram que a permeabilidade total, em 4 horas, foi de cerca de 15% e o valor de permeabilidade aparente (P_{app}) foi de $0,58 \pm 0,06 \times 10^5$ cm/s (NEVES *et al.*, 2016).

A excreção da fração não absorvida representa 40% de RES livre, 11% na forma glicuronídeo e 3% de conjugados de sulfato em intestino delgado de ratos (ANDLAUER *et al.*, 2000). A excreção renal é a principal via de eliminação em modelos animais e em seres humanos, onde após a administração oral em seres humanos é de 71 a 98% (contra 54-91% após a administração i.v.) enquanto a excreção fecal varia entre 3,3 e 35% (WALLE *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, vários estudos se concentraram em novas abordagens de formulação para estabilizar e proteger o RES da degradação, aumentar sua solubilidade em água, a fim de melhorar sua biodisponibilidade, e alcançar uma liberação controlada (SANTOS *et al.*, 2011; AMRI *et al.*, 2012). A utilização de sistemas compostos por lipídios-tensoativos parece ser uma estratégia interessante, uma vez que moléculas hidrofóbicas podem ser dissolvidas nestes sistemas (KARASULU, 2008; HE *et al.*, 2010; LANCELOT *et al.*, 2014). A principal limitação associada à rápida depuração mucociliar no sítio nasal resulta em baixa absorção e,

portanto, baixa biodisponibilidade. Para superar isso, os sistemas mucoadesivos de administração de fármacos de gelificação nasal são explorados para serem administrados para essa via (CARVALHO *et al.*, 2013b; SINGH *et al.*, 2013).

Neste sentido o uso de sistemas baseados em lipídio-tensoativo pode ser explorado devido às suas propriedades de mudança de mesofases. Por exemplo, por adição de água a um sistema de um lipídio-tensoativo, ambas as soluções isotrópicas (micelas e microemulsões) podem ser transformadas em sistemas líquidos cristalinos, tais como as mesofases lamelares, hexagonais ou cúbicas (MALMSTEN, MARTIN, 2002a; MALMSTEN, 2007). Devido à sua viscosidade frequentemente alta, as mesofases líquido-cristalinas também são um sistema de entrega adequado quando o fármaco precisa ser localizado, por exemplo, em cavidades corporais, como a mucosa nasal. Ao mesmo tempo, a alta viscosidade das fases cristalinas líquidas faz a preparação, manuseio e administração de tais sistemas difíceis. Dado estas considerações, interesse em relação ao uso de sistemas isotrópicos líquido como um sistema precursor para o uso de transformações de mesofase *in situ* de baixa viscosidade, onde é fácil de preparar, armazenar e administrar, para uma mesofase cristalina líquida altamente viscosa após administração (MALMSTEN, 2007). Assim a incorporação do RES em um sistema lipídio-tensoativo pode ser interessante e as propriedades para geleificação *in situ* para a cavidade nasal podem ser exploradas.

Desordens neurológicas, como DA, ocorrem por danos oxidativos e inflamatórios no SNC (WYSS-CORAY e ROGERS, 2012). O RES tem mostrado na literatura efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos, muitos destes estudos têm levantado hipóteses do RES no tratamento para transtornos neurológicos (BERMAN *et al.*, 2017; SAWDA *et al.*, 2017). Além disso, o RES é conhecido por modular as atividades da proteína quinase ativada pela monofosfato de adenosina (AMPK), sirtuína 1 (SIRT1) e *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α), e reguladores metabólicos que demonstraram estar envolvidos no início de distúrbios neurológicos (PASINETTI *et al.*, 2015).

O RES promove caminhos anti-envelhecimento através da ativação de vários alvos metabólicos, incluindo a AMPK. O RES aumenta os níveis de cálcio citosólico e promove a ativação da AMPK pela proteína quinase-beta dependente de cálcio/calmodulina. A ativação farmacológica e genética direta da AMPK reduziu o acúmulo extracelular de A β , enquanto que a inibição de AMPK reduziu o efeito do

RES sobre os níveis de A β . O RES inibe o alvo mTOR de AMPK (*mechanistic target of rapamycin*) para desencadear a autofagia e a degradação lipossômica de A β (CAI *et al.*, 2012). O RES administrado por via oral em camundongos foi detectado no cérebro, onde ativou a AMPK e diminuiu os níveis de A β cerebral e a sua deposição no córtex cerebral (VINGTDEUX *et al.*, 2010).

Embora o mecanismo exato do desenvolvimento AD seja desconhecido, foram identificados vários biomarcadores que ajudam a caracterizar o início e a progressão da doença e podem servir como alvos terapêuticos. O acúmulo de placas A β causado por mutações genéticas de APP ou APOE e o aumento da inflamação e dano oxidativo foram associados ao desenvolvimento e progressão da DA (HUANG e MUCKE, 2012). Além disso, a restrição calórica foi mostrada para prevenir o aparecimento de distúrbios neurológicos (PASINETTI *et al.*, 2015). A restrição calórica ativa as sirtuínas das desacetilases, principalmente a SIRT1, que também é ativado pelo RES (CHUNG *et al.*, 2010). Estudos pré-clínicos com RES sugerem que simula os efeitos benéficos da restrição calórica através da ativação farmacológica de SIRT1 (JAYASENA *et al.*, 2013). No que diz respeito à AD, a superexpressão SIRT1 no cérebro reduz a progressão da AD através de dois mecanismos putativos. Em primeiro lugar, SIRT1 direciona a divisão da APP longe da produção de A β ativado pela α -secretase (clivando a APP dentro da sequência A β). Em segundo lugar, SIRT1 desacetila tau, visando assim sua ubiquitinação e clivagem proteasomal e reduzindo os emaranhados (GUARENTE 2011).

PGC-1 α é uma proteína relacionada a vários mecanismos celulares que levam à alteração da regulação de genes (LIN *et al.*, 2002). Foi relatado que a PGC-1 α poderia proteger as células contra o estresse oxidativo e reduzir a disfunção mitocondrial (SCARPULLA, 2002; QIN *et al.*, 2009). Na DA, a biogênese mitocondrial prejudicada em células neuronais causa disfunção de sinapse (MENDOZA *et al.*, 2014) e danos celulares (REDDY *et al.*, 2012) e contribui para o declínio cognitivo (KIMATA *et al.*, 2012). Além disso, um estudo relatu que o nível de PGC-1 α evidentemente diminui nos cérebros de pacientes com AD mitocondrial (QIN *et al.*, 2009). Diminuição mediada por RES na acetilação de PGC-1 α e um aumento na atividade da mesma foi observada (LAGOUGE *et al.*, 2006).

Uma série de estudos demonstraram a capacidade de RES para reduzir a secreção de A β de diferentes linhas celulares (MARAMBAUD *et al.*, 2005) e suprimir

a neuroinflamação por inibição da NADPH oxidase e atenuar a expressão induzida por fator nuclear kappa beta (NF- κ B) de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e fosfolipase A2 (sPLA₂) (LIN *et al.*, 2004; BI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006). Os mecanismos pelos quais o RES atenua a neuroinflamação ainda não são completamente elucidados. Uma via importante parece envolver a parada dependente de sirtuína pelo NF- κ B na cadeia de cascatas de sinalização de células B ativadas, um passo que resulta em bloqueio *downstream* da ativação de microglia (CAPIRALLA *et al.*, 2012).

Um estudo foi realizado por xx que tratou em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina com RES na dose de 10 e 20 mg kg⁻¹. Os resultados mostraram que revelando que o tratamento com RES reverteu o comprometimento da memória induzida pelo diabetes. Em relação à atividade da AChE, observou-se um aumento significativo no grupo diabético tratado com RES (P < 0,05) em todas as estruturas cerebrais em relação ao grupo controle negativo. No entanto, a atividade de AChE diminuiu significativamente nos grupos controle tratado na dose de 10 e 20 mg kg⁻¹ com RES (P < 0,05) no córtex cerebral, hipocampo e estriado, enquanto não houve diferenças significativas nos grupos diabéticos tratado na dose de 10 e 20 mg kg⁻¹ em todas as estruturas cerebrais em comparação com o controle. Em conclusão, os resultados presentes mostraram que o tratamento com RES previne o aumento da atividade de AChE e consequentemente o comprometimento da memória em ratos diabéticos, demonstrando que este composto pode modular a neurotransmissão colinérgica e consequentemente melhorar a cognição (SCHMATZ *et al.*, 2009)sm.

MA *et al.* (2013) conduziram um estudo em que o RES melhorou a cognição e reduziu o estresse oxidativo em ratos com demência vascular. Os resultados mostraram que o RES foi capaz de reduzir a latência de escape e as distâncias de escape no labirinto de Morris e melhorou a capacidade de aprendizagem e memória em ratos de demência vascular. Outros experimentos descobriram que o RES diminuiu os níveis de malonilaldeído e aumentou a atividade da superóxido dismutase e os níveis de glutathione no hipocampo e no córtex cerebral de ratos de demência vascular confirmando os efeitos neuroprotetores do RES.

RES é um produto natural com vários efeitos terapêuticos e demonstrou-se imitar os efeitos da restrição calórica, exercer efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e afetar a iniciação e a progressão de muitas doenças através de vários mecanismos

moleculares específicos. Uma gama dos ensaios clínicos do RES tem focado em câncer, distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares, diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica e obesidade. Para os distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares e diabetes, os ensaios clínicos atuais mostram que o RES foi bem tolerado e influenciou de forma benéfica os biomarcadores de doenças estudadas (BERMAN *et al.*, 2017).

2.3 Sistemas baseados em anfifílicos para a liberação de fármacos

Moléculas anfifílicas ou tensoativas contêm uma parte hidrofóbica e hidrofílica, em solução aquosa frequentemente se juntam na interface e se auto-agregam numa tentativa de sequestrar as suas regiões apolares do contato com a fase aquosa (LAWRENCE, 1994). A auto-agregação na presença de água formando uma variedade de estruturas distintas, essa variação depende de parâmetros, como, por exemplo, concentração de tensoativos, presença de eletrólitos ou a temperatura (MALMSTEN, M, 2002). Em soluções diluídas, soluções isotrópicas de agregados micelares podem ser formadas, enquanto que em sistemas tensoativo-solvente em concentrações mais elevadas, fases líquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir (MALMSTEN, M, 2002). Quando um óleo ou mesmo outros componentes, como outro tensoativo ou um álcool de cadeia média, são adicionados ao sistema tensoativo-água podem levar a vários níveis de estruturação mais complexos. Dessa forma, emulsões, microemulsões e mesofases liotrópicas de diferentes geometrias podem ser geradas (EZRAHI *et al.*, 1999).

A escolha do sistema utilizado para solubilização depende de fatores, incluindo, por exemplo, (1) a quantidade de fármaco que necessita de ser solubilizada, (2) a quantidade de anfifílico que pode ser tolerada, (3) requisitos de estabilidade a longo prazo, (4) taxa de liberação e outros fatores relacionados com a administração do fármaco. As principais vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas são resumidas no Quadro 4.

Quadro 4. Principais vantagens e desvantagens com diferentes sistemas baseados em anfifílicos para solubilização de fármacos hidrofóbicos

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Micela	Baixas concentrações de anfifílico requeridas Baixa viscosidade Tamanho pequeno da gotícula Fácil preparação	Sensível à diluição Baixa capacidade de solubilização Potencial toxicidade do anfifílico
Emulsão	Alta capacidade de solubilização de fármacos Tamanho maior de gotícula (> 1 µm)	Estabilidade limitada Requer técnica de preparo adequada
Microemulsão	Boa estabilidade termodinâmica a longo prazo Boa capacidade de solubilidade de fármacos Fácil preparação Tamanho nanométrico da gotícula (10 – 100 nm) Aspecto transparentes Distribuição unimodal do tamanho de gotículas	Requer altas concentrações de anfifílico Solubilidade do fármaco influenciada pelos excipientes Potencial toxicidade do anfifílico Alteração do tamanho/distribuição das gotículas em função da diluição em água
Nanoemulsão	Baixa carga de anfifílico associado a um co-tensoativo Boa capacidade de solubilidade de fármacos Tamanho nanométrico da gotícula (<100 nm) Aspecto com cores azuladas ou translúcidas Média-alta estabilidade termodinâmica a longo prazo Distribuição bimodal do tamanho de gotículas Podem ser diluídas por água sem alterar a distribuição de tamanho de gotícula Podem ser obtidas por método de baixa energia	Requer técnica de preparo adequada envolvendo energia Potencial toxicidade do anfifílico
Fases líquido-cristalinas	Boa estabilidade a longo prazo Geralmente viscoso Boa capacidade de solubilização de fármacos Solubilização de fármacos hidrófilos e hidrofóbicos Solubilização de moléculas de baixo à alto peso molecular	Em alguns casos difícil de preparar devido à viscosidade Sensível à diluição

Adaptado de: MALMSTEN, M (2002); ANTON e VANDAMME (2011); MCCLEMENTS (2012); SANTOS *et al.* (2013); DOKANIA e JOSHI (2015).

2.3.1.1 Microemulsões e nanoemulsões

As microemulsões (MEs) são sistemas isotrópicos termodinamicamente estáveis compostos de óleo, água, tensoativo e co-tensoativos ou co-solventes. O fenômeno principal para a formação de MEs é a tensão interfacial baixa, que é usualmente obtida pelo uso de dois ou mais emulsionantes, um é predominantemente solúvel em água enquanto o outro é predominantemente solúvel em óleo (co-tensoativo). Os co-tensoativos reduzem a tensão interfacial para um valor ultra baixo, necessário para a formação de do sistema microemulsionado (PARMAR *et al.*, 2011; RAHMAN *et al.*, 2013).

Estruturas microscópicas tipo emulsão numa mistura de água, brometo de cetiltrimetilamônio, fase oleosa e álcool (hexanol) foram inicialmente propostas por HOAR e SCHULMAN (1943). Em 1959, essas estruturas foram finalmente confirmadas solidificando a fase oleosa através de coloração, e visualizadas por microscopia eletrônica por SCHULMAN *et al.* (1959), sendo o primeiro a descrever MEs, definindo o termo “microemulsões” como *sistemas que são claros e de natureza semelhante à solução com gotículas dispersas umas nas outras* (HOAR e SCHULMAN, 1943).

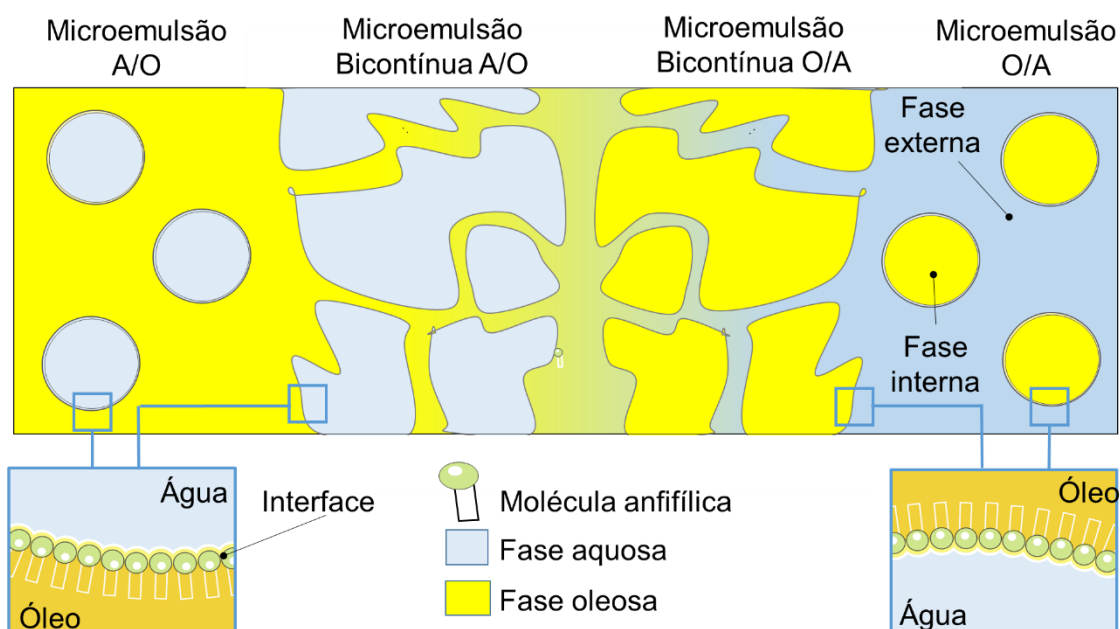
Uma definição mais recente e aceita de MEs como *uma dispersão homogênea formada espontaneamente, transparente, termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis contendo quantidades apropriadas de tensoativos e co-tensoativos* (ZANA, 1994; SOLANS e KUNIEDA, 1997). Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), ME pode ser definida como *uma dispersão de água, óleo e tensoativo que é um sistema isotrópico e termodinamicamente estável com diâmetro do domínio disperso² variando aproximadamente de 1 a 100 nm, usualmente 10 a 50 nm* (SLOMKOWSKI *et al.*, 2011). Os tipos de estruturas das MEs estão representados na Figura 5.

As MEs são normalmente obtidas em intervalos de concentração específicos são obtidos por diagramas de fase pseudo-ternários (relações entre água, óleo e tensoativo/co-tensoativo). A região de ME é caracterizada por composições que produzem uma tensão interfacial muito baixa na interface água e óleo, a formação de

² Os domínios da fase dispersa podem ser globulares ou interligados – microemulsão bicontínua.

uma película surfactante interfacial e associação das moléculas da fase oleosa com a película na interface.

Figura 5. Representação esquemática das estruturas de microemulsões, ME água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), e (c) ME bicontínua podendo ser A/O ou O/A



Adaptado de: (DE ALMEIDA *et al.*, 2017)

WINSOR (1948) classificou os sistemas microemulsionados em quatro tipos:

- Tipo I (o anfílico é preferencialmente solúvel em água e forma ME O/A)
- Tipo II (o anfílico está principalmente na fase oleosa e forma ME A/O)
- Tipo III (um sistema trifásico em que uma fase média contendo anfílico coexiste tanto com o excesso de água como com as fases pobres em anfílico)
- Tipo IV (uma solução micelar monofásica (isotrópica) se forma após a adição de uma quantidade suficiente de anfílico)

Dependendo do tipo de anfílico e fase oleosa, os tipos I, II, III ou IV formam preferencialmente, sendo o tipo dominante relacionado ao arranjo molecular na interface. Essas transições e formações estruturais não são totalmente compreendidas em termos de mecanismo. No entanto, é determinado que a flexibilidade da película de anfílico na interface é um fator importante para a formação. Neste sentido, um surfactante mais flexível pode permitir a existência de estruturas diferentes de MEs (KREILGAARD, 2002).

A introdução de um co-tensoativo de cadeia curta ao filme de tensoativo permite a diminuição da tensão interfacial e a fluidização do filme interfacial. No caso das MEs, a obtenção de tensão interfacial muito baixa é um requisito essencial e o uso de um segundo anfifílico, usualmente um álcool de comprimento de cadeia médio, é geralmente necessário (BRUSCHI, 2015).

Em princípio, as MEs podem ser formadas espontaneamente simplesmente juntando óleo, água e anfifílico a uma temperatura particular sem fornecer qualquer energia externa, uma vez que são sistemas termodinamicamente estáveis. Na prática, é frequentemente necessário aplicar energia externa (sob a forma de agitação ou aquecimento) para facilitar a formação de uma MEs porque existem barreiras de energia cinética que devem ser superadas ou limitações de transporte de massa retardando a sua formação espontânea (MCCLEMENTS, 2012).

Uma nanoemulsão (NEs) pode ser considerada uma emulsão convencional que contém gotículas de tamanho submicrométrico, exibindo estabilidade contra sedimentação ou cremação e um aspecto óptico transparente ou translúcido (semelhante ao das MEs). No entanto, esta dispersão é um sistema de não equilíbrio dinâmico que pode sofrer floculação, coalescência e/ou maturação de Ostwald. Apesar disso, é possível selecionar uma composição e um método de preparação apropriados para se conseguir uma NE com elevada estabilidade cinética.

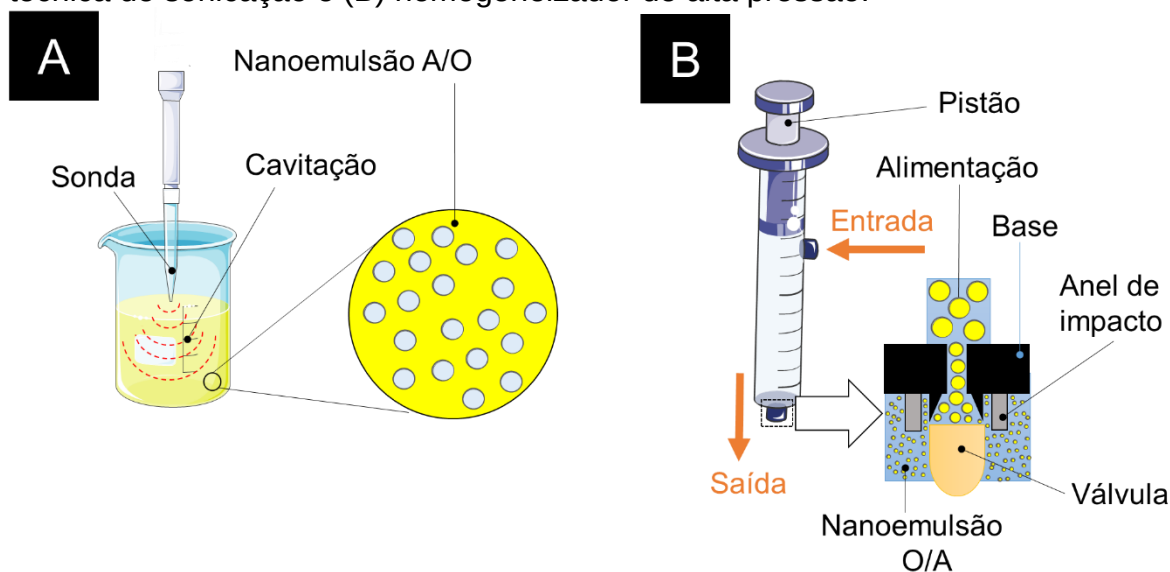
Neste sentido, uma nanoemulsão é uma mini-emulsão, emulsão de tamanho submicron ou emulsão ultrafina que pode possuir uma estabilidade cinética relativamente elevada, mesmo para vários anos (BRUSCHI, 2015). Portanto, as NEs podem ser classificadas como sistemas dispersos que possuem tamanhos de gotículas superando 100 nm (MCCLEMENTS, 2012). Além disso, as NEs podem ter o óleo disperso como gotículas na água, ou vice-versa (BRUSCHI, 2015).

Para formar NEs é necessária uma contribuição de energia, geralmente, de dispositivos mecânicos ou do potencial químico dos componentes (ABISMAIL *et al.*, 1999; MCCLEMENTS, 2012). Mecanicamente, uma alta energia (por exemplo, agitadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidização e geradores de ultrassons) são capazes de produzir intensas forças de ruptura necessária para promover uma taxa de cisalhamento capaz de deformar a partícula. A aplicação de alta energia gera forças que podem romper as gotas da fase dispersa,

de forma que a diferença entre as pressões interna e externa da gota seja superada (Lei de Young-Laplace) (TADROS *et al.*, 2004).

A emulsificação assistida por ultrassom tem sido utilizada com sucesso para preparar NEs (ABBAS *et al.*, 2013). O processo de cavitação regula a formação de NEs de tal forma que a rápida formação e colapso das micro-bolhas ocorre na interface das duas fases imiscíveis (contínuas e dispersas) sob a influência do campo acústico de alta intensidade (CHENDKE e FOGLER, 1975; MASON *et al.*, 2006). O colapso das micro-bolhas produz ondas de choque intensas e turbulência localizada, resultando em cisalhamento de alta velocidade no líquido. Estas forças de cisalhamento intensas produzidas facilitam a ruptura das gotas e a mistura das fases. O desenho esquemático está disposto na Figura 6A.

Figura 6. Representação esquemática da produção de nanoemulsão utilizando (A) técnica de sonicação e (B) homogeneizador de alta pressão.



Adaptado de: MCCLEMENTS (2011)

O desenvolvimento de homogeneizadores de alta pressão nos últimos 15 anos torna possível a exploração de sistemas nanoemulsionados (BRUSCHI, 2015). Por esta metodologia, prepara-se uma emulsão grosseira utilizando um misturador de alta velocidade e é então introduzida na entrada de um homogeneizador de válvula de alta pressão (MCCLEMENTS, 2011). À medida que entra no espaço entre a válvula e o assento da válvula (Figura 6B), a velocidade de fluxo é aumentada rapidamente. A homogeneização é completada na área entre a válvula e o assento, onde a emulsão

experimenta uma combinação de forças disruptivas intensas que causam que as gotículas maiores sejam quebradas em menores. A combinação de duas teorias, turbulência e cavitação, explicam a redução do tamanho da gota durante o processo de homogeneização (MASON *et al.*, 2006; MCCLEMENTS, 2011).

Em alguns aspectos, os microfluidizadores são de concepção semelhante aos homogeneizadores de válvulas de alta pressão, uma vez que utilizam uma bomba para forçar uma pré-mistura de emulsão grosseira através de um orifício estreito a altas pressões para facilitar a ruptura das gotículas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MAHDI JAFARI *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008). No entanto, o desenho dos canais através dos quais a emulsão grosseira flui dentro do dispositivo é diferente. A emulsão grosseira é forçada a entrar num canal de entrada sob alta pressão. O canal é concebido de modo que divida a emulsão grosseira em duas correntes que são feitas para empurrar umas às outras em uma alta velocidade dentro de uma câmara de interação (MCCLEMENTS, 2011). As intensas forças disruptivas geradas na câmara de interação são altamente eficazes na ruptura de gotículas e na formação de emulsões finas. O tamanho das gotas é reduzido por forças de alto cisalhamento e cavitação do que por colisões de alta velocidade com outras gotículas que é a principal força para a microfluidização (HÖRMANN e ZIMMER, 2016).

Por outro lado, existem métodos de baixa energia (tais como: temperatura de inversão de fase – PIT³, método do ponto de inversão da emulsão – EIP⁴, e emulsificação espontânea) usados para preparar sistemas nanoemulsionados (YANG *et al.*, 2012). Neste caso, apenas a agitação simples é necessária, a energia química interna do sistema é utilizada para a formação, e o método é considerado mais eficiente em termos energéticos (SOLANS e SOLÉ, 2012). A utilização de ambos os métodos de preparação pode ser utilizada atingir NEs com tamanhos de gotículas semelhantes, dependendo das variáveis do sistema e da composição destas (DOKANIA e JOSHI, 2015).

O método de emulsificação espontânea é geralmente implementado por titulação de uma fase orgânica (óleo contendo anfifílico) num recipiente contendo uma fase aquosa ou solução tampão. Formam-se gotas finas de óleo (<100 nm) quando o processo é otimizado levando em consideração variáveis dependentes (tipo do

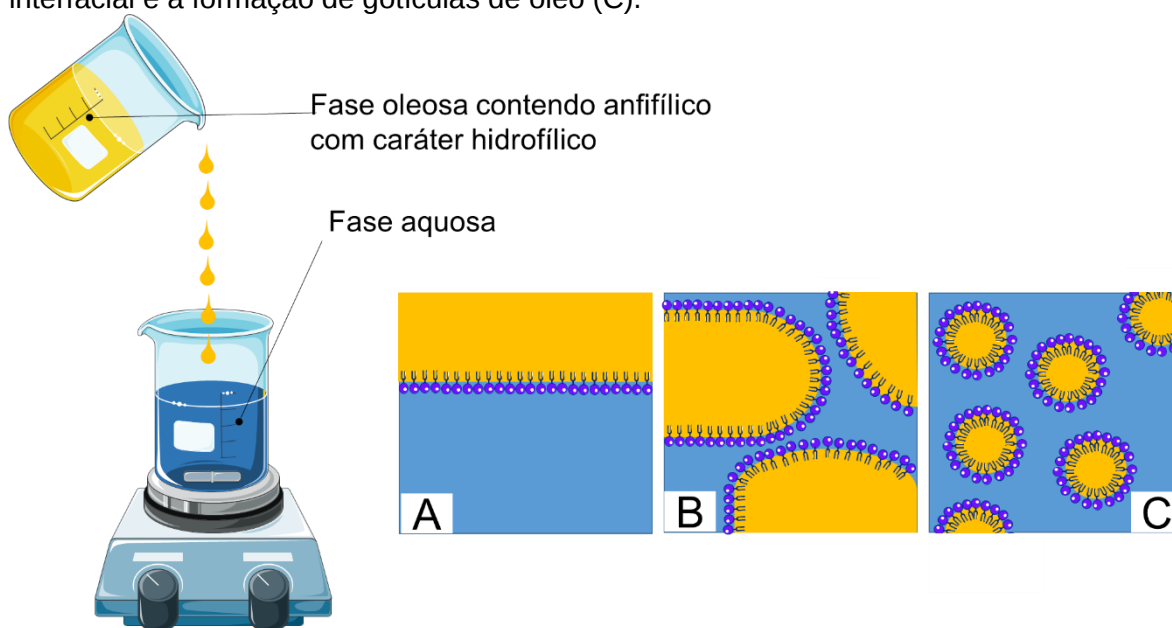
³ Do inglês: *phase inversion temperature (PIT) method*

⁴ Do inglês: *emulsion inversion point (EIP) method*

anfifílico, composição da fase oleosa, temperatura, taxa de agitação e taxa de adição) (KOMAICO e MCCLEMENTS, 2016).

O mecanismo físico-químico subjacente à formação de NEs utilizando este método é o movimento de um componente miscível em água (ou solvente ou anfifílico) da fase orgânica para a fase aquosa. Inicialmente, as fases orgânica e aquosa são misturadas juntos e após mistura, o solvente miscível com água ou anfifílico deslocam-se da fase orgânica para a fase aquosa, o que cria uma grande força turbulenta na interface óleo-água (Figura 7) (MCCLEMENTS, 2011; KOMAICO e MCCLEMENTS, 2016). Além disso, o rápido movimento dos componentes miscíveis com água para a fase aquosa provoca um grande aumento na área interfacial do óleo-água, o que leva à formação espontânea de gotículas de óleo rodeadas por fase aquosa através de um processo de brotamento. Para preparar gotículas muito pequenas, como é requerido em NEs, é usualmente necessário utilizar uma proporção elevada de componente miscível em água para óleo na fase orgânica antes da mistura (MCCLEMENTS, 2011). O método de emulsificação espontânea encontrou uma utilização na indústria farmacêutica, onde é utilizado para formar sistemas de liberação de fármacos para encapsular fármacos lipofílicos (SINGH *et al.*, 2009).

Figura 7. Representação esquemática do mecanismo proposto para a emulsificação espontânea: quando a fase orgânica (óleo e anfifílico hidrofílico) e fase aquosa (água) são postas em contato (B), é formada uma ME bicontínua no limite (B), levando à turbulência interfacial e à formação de gotículas de óleo (C).

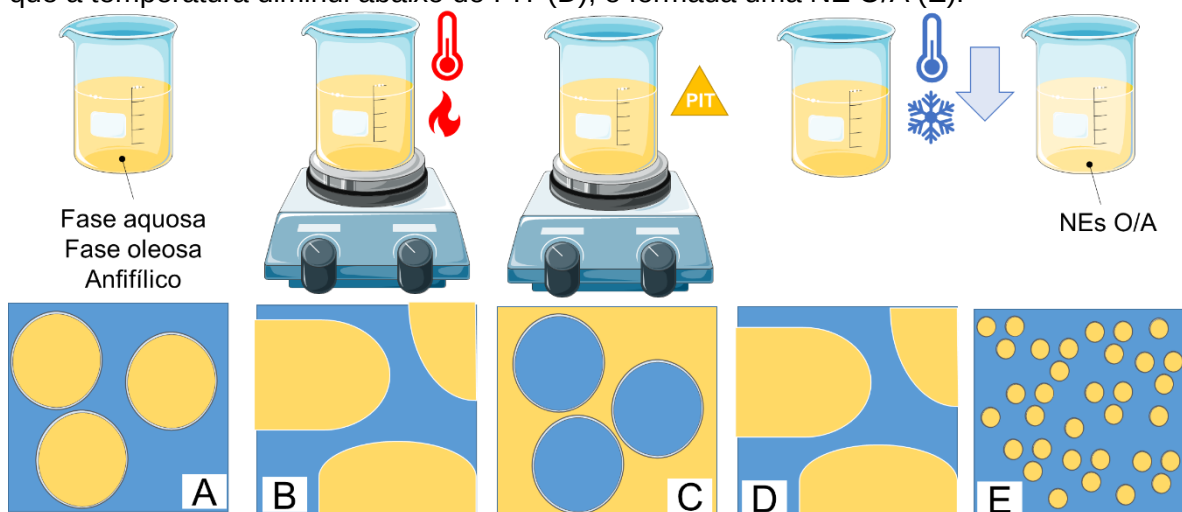


Adaptado de: MCCLEMENTS (2011); KOMAICO e MCCLEMENTS (2016)

O método PIT é tipicamente usado para formar NEs a partir de uma mistura de um anfifílico relativamente não hidrofílico, óleo e água empregando alteração na temperatura que acarreta em alterações na curvatura ou na solubilidade do anfifílico (Figura 8) (ANTON e VANDAMME, 2009). O anfifílico, óleo e a água são agitados à temperatura ambiente para formar uma emulsão grosseira. Essa mistura ternária resultante é gradualmente aquecida próxima ou até o PIT. A dispersão é então rapidamente arrefecida ou diluída em água fria, normalmente com agitação contínua, o que resulta na formação de uma NE O/A (GUPTA *et al.*, 2016). Quando este sistema é arrefecido abaixo do PIT, as moléculas de anfifílico deslocam-se rapidamente da fase oleosa para a fase aquosa (tal como no método de emulsificação espontânea), o que leva à formação espontânea de pequenas gotas de óleo devido ao aumento da área interfacial e do fluxo turbulento gerado (MCCLEMENTS, 2011).

Em baixas temperaturas, o grupo de cabeça polar é altamente hidratado e assim tende a ser mais solúvel em água. À medida que a temperatura é elevada, o grupo de cabeça torna-se progressivamente desidratado e a solubilidade do anfifílico em água diminui. A uma temperatura particular (PIT), a solubilidade do anfifílico nas fases de óleo e água é aproximadamente igual (fase contínua). Em temperaturas mais elevadas, o anfifílico torna-se mais solúvel na fase oleosa do que na fase aquosa (MCCLEMENTS, 2011). A temperatura à qual um sistema óleo-água-anfifílico muda de uma emulsão O/A para uma emulsão A/O é conhecida como a temperatura de inversão de fase (PIT) (RAO e MCCLEMENTS, 2010).

Figura 8. Emulsão grosseira O/A contendo os componentes (A) é então aquecida (B) até uma temperatura acima do PIT do sistema (C). Em seguida, o sistema é arrefecido, e à medida que a temperatura diminui abaixo do PIT (D), é formada uma NE O/A (E).



Adaptado de: MCCLEMENTS e RAO (2011)

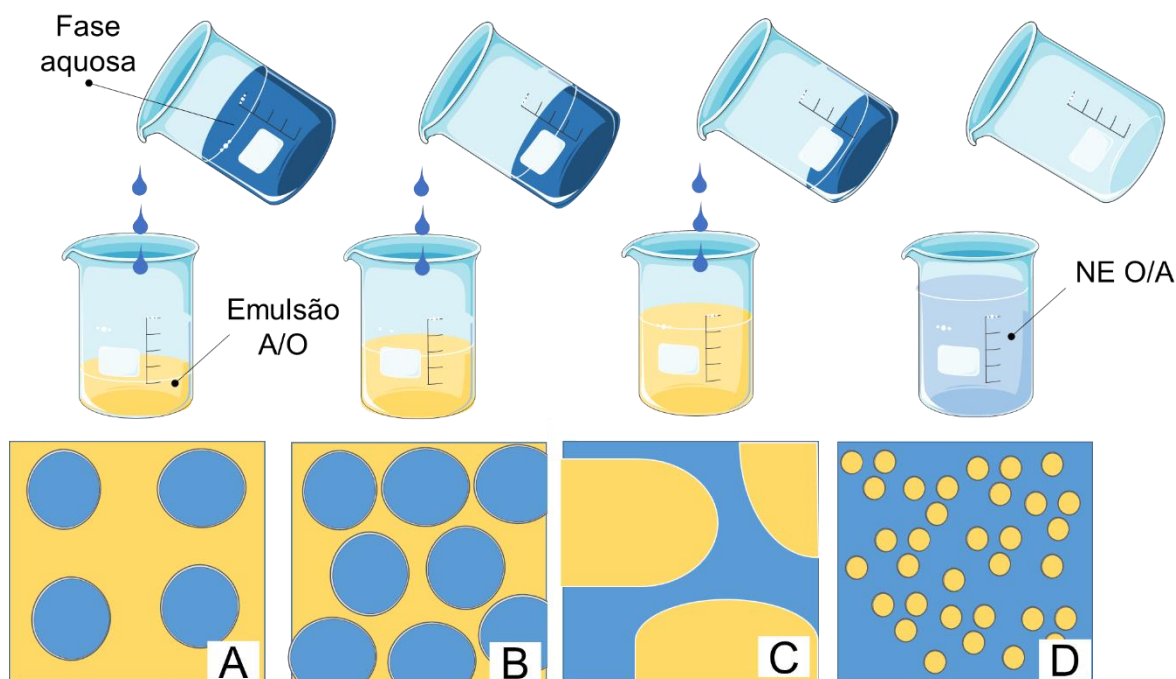
Numa NE, a monocamada do anfifílico está presente numa interface óleo-água e tende a favorecer a fase na interface formada dependendo da sua geometria molecular. Os anfifílicos com parâmetro de empacotamento menor que 1 tendem a favorecer a formação de fases O/A, aqueles com parâmetro maior que 1 favorecem emulsões A/O e aqueles com parâmetro igual a 1 não favorecem formação de fases dispersas, em vez disso, a formação de sistema bicontínuo ou dispersões líquido-cristalinas (ANTON *et al.*, 2007; ANTON e VANDAMME, 2009).

No método EIP, prepara-se uma emulsão A/O à temperatura ambiente e depois se dilui lentamente com água. Durante este processo de diluição, o sistema passa através de um ponto de inversão onde ocorre a transformação de uma emulsão A/O para emulsão O/A (Figura 9). Neste ponto de inversão, a tensão interfacial na interface óleo-água é muito baixa e, assim, pequenas gotículas podem ser formadas sem uma penalização significativa de energia (IZQUIERDO *et al.*, 2002). No PIT, por outro lado, a emulsão A/O é preparada a uma temperatura mais alta que a temperatura de inversão de fase da mistura. Quando a mistura é arrefecida até à temperatura ambiente, passa através da temperatura de inversão à qual ocorre a transformação da mistura de uma emulsão A/O para uma emulsão O/A (GUPTA *et al.*, 2016).

Na técnica de EIP, o teor de água acima de um valor crítico, a concentração de gotículas de água é tão alta que são embaladas muito apertadamente em conjunto e

a emulsão atinge um ponto de inversão de fase onde muda de um A/O para um sistema O/A. O tamanho das gotas formadas depende de variáveis de processo, tais como a velocidade de agitação e a taxa de adição de água (THAKUR *et al.*, 2008).

Figura 9. Representação esquemática do mecanismo proposto para a emulsificação de baixa intensidade pelo método do ponto de inversão da emulsão. A quantidade de água adicionada a uma emulsão A/O (A) é progressivamente aumentada (B), até que uma inversão de fase ocorre (C) e uma emulsão O/A é formada (D).



Adaptado de: MCCLEMENTS (2011); GUPTA *et al.* (2016)

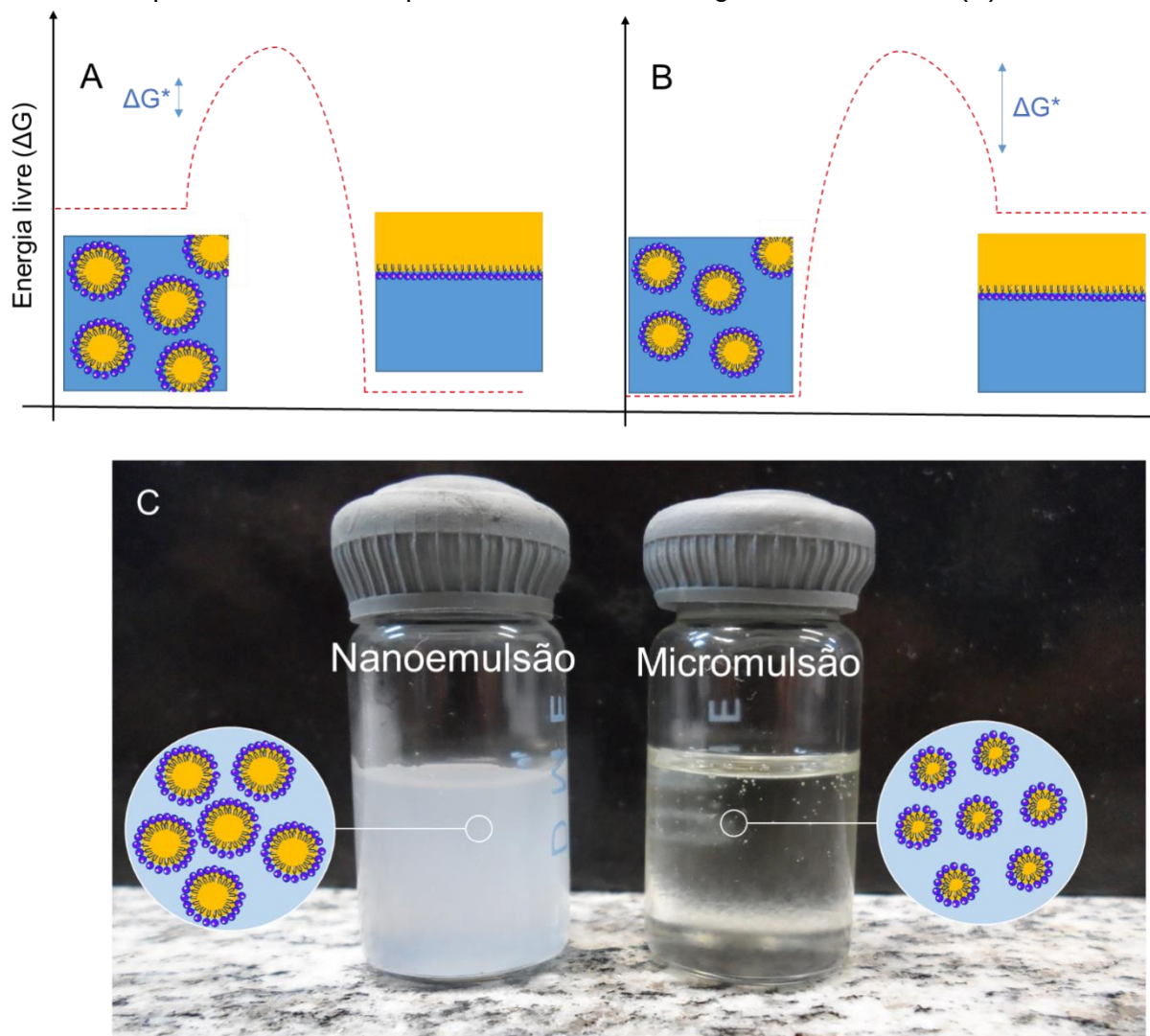
Três teorias têm sido usadas para explicar a formação e a estabilidade de MEs e NEs (PRINCE, 1967; KREILGAARD, 2002; MALMSTEN, M, 2002; MCCLEMENTS, 2012): (1) teoria de filmes interfaciais, na qual a tensão interfacial negativa devida a alta pressão do filme é responsável pela formação de MEs; (2) teoria da solubilização; e (3) tratamentos termodinâmicos.

Uma MEs pode não se formar espontaneamente devido à presença de barreiras de energia cinética e / ou de processos de transporte de massa lenta. A origem físico-química da barreira de energia em sistemas microemulsionados não é bem compreendida, mas pode estar relacionada com a energia livre associada ao movimento de uma molécula não polar de uma fase oleosa para uma fase aquosa.

(Figura 10). A magnitude da termodinâmica determinará em parte a solubilidade em água das moléculas de óleo: quanto maior a penalização de energia livre, menor será a solubilidade em água (MCCLEMENTS, 2012).

Uma NE é um sistema termodinamicamente instável e a taxa desta repartição depende das barreiras de energia entre a NE e seus estados separados, bem como sobre os processos específicos de transporte de massa envolvidos. A energia determina a estabilidade cinética de uma NE: quanto maior a barreira de energia, mais tempo a NE irá persistir. Tipicamente, a barreira de energia deve ser $> 20 \text{ kT}$ para produzir NEs com boa estabilidade a longo prazo (MCCLEMENTS, 2005). A velocidade com que uma NEs volta às fases separadas é também determinada pela frequência com que as gotículas de óleo entram em contato umas com as outras, tais como o movimento browniano, cisalhamento aplicado ou forças gravitacionais (MCCLEMENTS, 2011; 2012).

Figura 10 –Diagrama esquemático da energia livre (ΔG) das MEs e NEs em comparação com o estado de separação de fases. MEs têm uma energia livre mais baixa do que o estado de fase separada (B), enquanto as NEs têm uma energia livre mais elevada (A). Os dois estados são separados por uma energia de ativação (ΔG^*). Fotografia de uma ME e NE, onde as áreas ampliadas mostram esquemas do tamanho das gotículas formadas (C).



Adaptado de: MCCLEMENTS (2012); FONSECA-SANTOS *et al.* (2015).

A distinção de uma NE e ME é em termos de sua estabilidade termodinâmica: as NEs são termodinamicamente instáveis, enquanto que as MEs são termodinamicamente estáveis (MCCLEMENTS, 2012). Esta diferença pode ser entendida desenvolvendo um modelo matemático simples para calcular a energia livre de sua formação a partir de componentes separados. Um sistema que existe em equilíbrio entre uma dispersão coloidal (NE ou ME) e as fases separadas (óleo e uma solução aquosa do anfifílico). Numa primeira aproximação, a mudança de energia livre associada à formação de uma dispersão coloidal a partir das fases separadas consiste

num termo de energia livre interfacial (ΔG_i) e um termo de entropia de configuração ($-T\Delta S$) (HUNTER, 1989), segundo a Equação 3:

$$\Delta G = \Delta G_i - T\Delta S$$

Equação 3

A uma temperatura constante, pressão e potencial químico interfacial, o termo de energia livre interfacial é igual ao aumento da área de contato entre as fases aquosa e a óleo (ΔA) multiplicada pela tensão interfacial (γ) na interface óleo-água (HUNTER, 1989), conforme evidenciado pela Equação 4:

$$\Delta G_i = \gamma \cdot \Delta A$$

Equação 4

O termo de energia livre interfacial é sempre positivo porque o aumento da área de contato e da tensão interfacial são positivos. Assim, este termo sempre se opõe à formação de dispersões coloidais. O termo de entropia de configuração depende do número de maneiras diferentes que a fase de óleo pode ser disposta dentro do sistema. O termo de entropia de configuração é sempre negativo porque o número de arranjos acessíveis à fase oleosa num estado emulsionado é muito maior do que num estado não emulsionado e, portanto, favorece sempre a formação de dispersões coloidais. Uma expressão para a entropia de configuração pode ser derivada de uma análise estatística do número de configurações que gotículas de óleo podem adotar na dispersão coloidal e estados separados, segundo Equação 5 (HUNTER, 1989):

$$\Delta S = -\frac{nk}{\phi} (\phi \ln \phi + (1 - \phi) \ln (1 - \phi))$$

Equação 5

Onde k é a constante de Boltzmann, n é o número de gotículas na dispersão coloidal, e ϕ é a fração de volume da fase dispersa.

A análise acima pressupõe que a tensão interfacial de uma monocamada de anfifílico em torno de uma gota de óleo é a mesma que numa interface planar de óleo-água. Contudo, sabe-se que a tensão interfacial depende da curvatura de uma monocamada de anfifílico, diminuindo à medida que a monocamada se aproxima da

sua curvatura ótima, a qual depende da geometria molecular das moléculas anfifílicas presentes.(EVILEVITCH *et al.*, 2000; EVILEVITCH *et al.*, 2001; WENNERSTRÖM *et al.*, 2006) Uma descrição fenomenológica simples de dependência da tensão interfacial na curvatura das gotas para modelar este efeito (Equação 6):

$$\gamma = \gamma_0 + (\gamma_\infty - \gamma_0) \frac{(R_0 - R)^2}{R_0^2 + R^2}$$

Equação 6

Aqui γ_∞ é a tensão interfacial numa interface planar óleo-água, γ_0 é a tensão interfacial quando a monocamada do anfifílico está na sua curvatura ideal; e R_0 é o raio da gota quando a monocamada está na sua curvatura ideal.

A contribuição da energia livre interfacial torna-se cada vez mais positiva com tamanho de gotícula decrescente devido ao aumento da área interfacial, enquanto a energia livre de configuração torna-se negativa com diminuição do tamanho de gotícula. No entanto, a mudança de energia livre global torna-se cada vez mais positiva com a diminuição do tamanho de gotícula, uma vez que o termo de energia livre interfacial domina o termo de entropia de configuração. Estes cálculos sugerem que a formação de uma NEs se torna cada vez mais termodinamicamente desfavorável à medida que o tamanho de partícula diminui para sistemas onde a tensão interfacial é semelhante à de uma interface planar (MCCLEMENTS, 2012).

A alteração de energia livre global ainda é dominada pela contribuição de energia livre interfacial, de modo que tem um valor mínimo que está próximo da curvatura ótima da monocamada de do anfifílico. Estes cálculos mostram que uma dispersão coloidal termodinamicamente estável pode formar-se quando o tamanho de partícula está próximo do tamanho de partícula ótimo ($R = R_0$), uma vez que isto conduz a uma tensão interfacial ligeira e, portanto, a energia livre interfacial (ΔG_i) que normalmente se opõe à formação de uma dispersão coloidal é consideravelmente reduzida (MCCLEMENTS, 2012).

Existem muitas semelhanças estruturais entre estes dois tipos de dispersão coloidal, mas há também algumas diferenças importantes (ANTON e VANDAMME, 2011). No entanto, existe uma grande confusão sobre a natureza precisa desses diferentes sistemas, e há erros generalizados na classificação de dispersões coloidais

relatados na literatura científica. De modo que, alguns pesquisadores têm MEs como sistemas preparados opticamente transparentes, mas referem-se a elas como NEs, ou vice-versa (MCCLEMENTS, 2012).

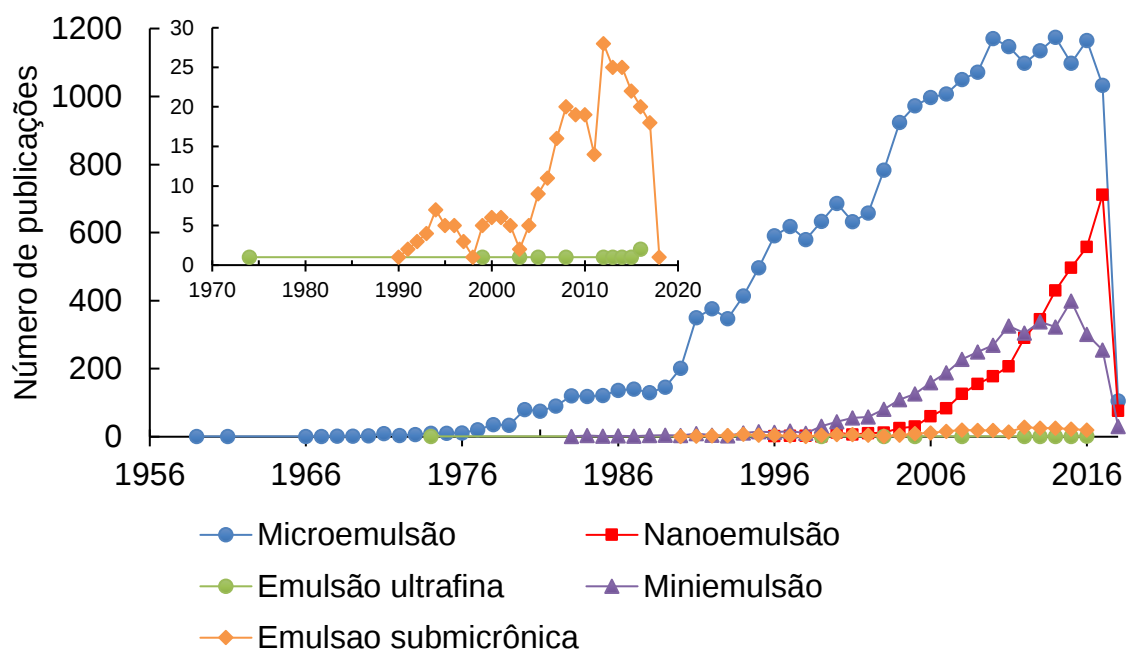
Uma razão principal para a confusão entre MEs e NEs é devido aos prefixos usados para denotá-los. O termo *micro-* normalmente denota uma grandeza de 10^{-6} , enquanto o termo *nano* significa usualmente um fator de 10^{-9} , o que implicaria que as NEs apresentam gotículas da fase interna menores quando comparadas com aquelas em MEs. Na prática, tal regra tem sua exceção – as gotículas em uma ME são menores do que aquelas em uma NEs. A razão para esta terminologia dúbia é resultado do desenvolvimento e percurso histórico na área de colóides (MCCLEMENTS, 2011; 2012).

Uma busca da literatura usando a base de indexação Web of Science® (Thonson Reuters), em dezembro de 2016, reportou que o primeiro artigo publicado utilizando o termo “microemulsão” foi publicado em 1959 por SCHULMAN *et al.* (1959)⁵, enquanto que o primeiro artigo usando o termo “nanoemulsão” foi publicado por CALVO *et al.* (1996) no ano de 1996. Assim, o termo ME tornou-se bem estabelecido muito antes do termo NE.

De fato, a utilização do termo NE só se tornou popular nos últimos 10 anos (Figura 11), o que pode ser, pelo menos em parte, atribuído ao crescente interesse no campo da nanotecnologia, além do desenvolvimento dos métodos de alta energia. No entanto, as dispersões coloidais que seriam agora chamadas de NEs certamente foram preparadas muito antes desta época, quando foram referidas por outros nomes, tais como emulsões ultrafinas, emulsões submicrônicas ou mini-emulsões. Os primeiros trabalhos para os termos emulsões ultrafinas, emulsões submicrônicas ou mini-emulsões foram publicados por PUESKUELEV *et al.* (1974), LEVY e BENITA (1990) e LACK *et al.* (1985), respectivamente. Obviamente que a utilização dos termos MEs e NEs tornou-se generalizada antes de serem claramente definidas ou distinguidas uma da outra.

⁵ Primeira publicação que define o conceito e confirma as características estruturais de uma ME.

Figura 11 – Número de publicações por ano (1959 – 2016 incluindo os termos em inglês⁶ identificados utilizando uma pesquisa indexada usando a plataforma Web of Knowledge™ (Thomson Reuters). Acesso em 18/01/2016.



MEs e NEs podem ser distinguidas com base na sua composição, dimensões, estrutura, prazo de validade e métodos de fabricação (KOMAICO e MCCLEMENTS, 2016). O Quadro 5 tenta propor métodos práticos de determinação da natureza dessas dispersões coloidais em particular. Em resumo, MEs têm um maior tempo de armazenamento a longo prazo do que NEs; MEs podem ser agitadas, aquecidas ou arrefecidas e então retornadas às suas condições originais, enquanto que, muitas vezes, as NEs sob as mesmas condições não satisfazem os parâmetros originais; as ME têm um tamanho de gota homogêneo enquanto que as NEs têm uma distribuição de gotículas de tamanho heterogêneo; as MEs podem ou não conter gotículas esféricas devido à tensão interfacial inferior, enquanto que NEs consistem em gotículas esféricas devido à pressão de Laplace que atua sobre elas (MCCLEMENTS, 2012).

Quadro 5. Comparação e diferenças conceituais entre NEs e MEs.

Parâmetro	Tipo de sistema coloidal
-----------	--------------------------

⁶Termos utilizados na busca: “microemulsion(s)”, “micro-emulsion(s)”; “nanoemulsion(s)”, “nano-emulsion(s)”; “submicron emulsion(s)”, “sub-micron emulsion(s)”; “mini-emulsion(s)”, “miniemulsion(s)”; “ultrafine emulsion(s)”, “ultra-fine emulsion(s)”, “ultrafine edible emulsion(s)”, “ultra-fine edible emulsion(s)”

	MEs	NEs
Tamanho (nm)	< 200	> 200
Distribuição de tamanho	Único pico estreito (monodisperso)	Monodisperso ou polidisperso
Forma da gota	Esférica ou não- devida à baixa tensão interfacial	Esférica devido à pressão de Laplace
Aparência visual	Transparente	Transparente ou translúcido
Formação	Espontânea ou baixa energia	Requer alta energia, mas existem métodos de baixa energia
Estabilidade termodinâmica	Estável	Metaestável
Influência da diluição ou temperatura	Pode alterar o tamanho, pode levar a formação de uma NE	Não altera o sistema, porém pode alterar a estabilidade
Processo de instabilidade	Amadurecimento de Ostwald	Diluição ou temperatura

Adaptado de: ANTON e VANDAMME (2011); MCCLEMENTS (2012); REHMAN *et al.* (2016)

Estratégias não-invasivas podem proporcionar um menor risco e uma abordagem mais amigável do paciente. Essa abordagem gerou um enorme interesse nos sistemas coloidais de administração de fármacos para entrega ao cérebro, especialmente pela via intranasal (RAJSHREE *et al.*, 2011). A região olfativa da mucosa nasal fornece uma conexão direta entre o nariz e o cérebro, que pode ser explorada para o direcionamento de moléculas de fármaco atuantes no SNC (doença de Alzheimer, depressão, enxaqueca, esquizofrenia e tumores cerebrais) (ILLUM, 2002; WU *et al.*, 2008; SHADAB *et al.*, 2009; PARDESHI e BELGAMWAR, 2013; KARAVASILI e FATOUROS, 2016; KAUR *et al.*, 2016).

2.3.1.2 Dispersões líquido-cristalinas

Processos de auto-organização podem gerar vários tipos de arquiteturas com diferentes graus de complexidade criadas a partir da manipulação de interações não covalentes (BLANAZS *et al.*, 2009; ALBERT e EPPS III, 2010; FERREIRA *et al.*, 2016). A auto-organização pode ser definida como a capacidade de certas moléculas,

macromoléculas ou materiais compósitos se associarem e formarem complexos, redes ou outras estruturas com novas propriedades particularmente úteis em aplicações tecnológicas e biomédicas. O processo de auto-organização pode ocorrer no nível molecular e macromolecular, e como uma organização supramolecular (LEHN, 1995).

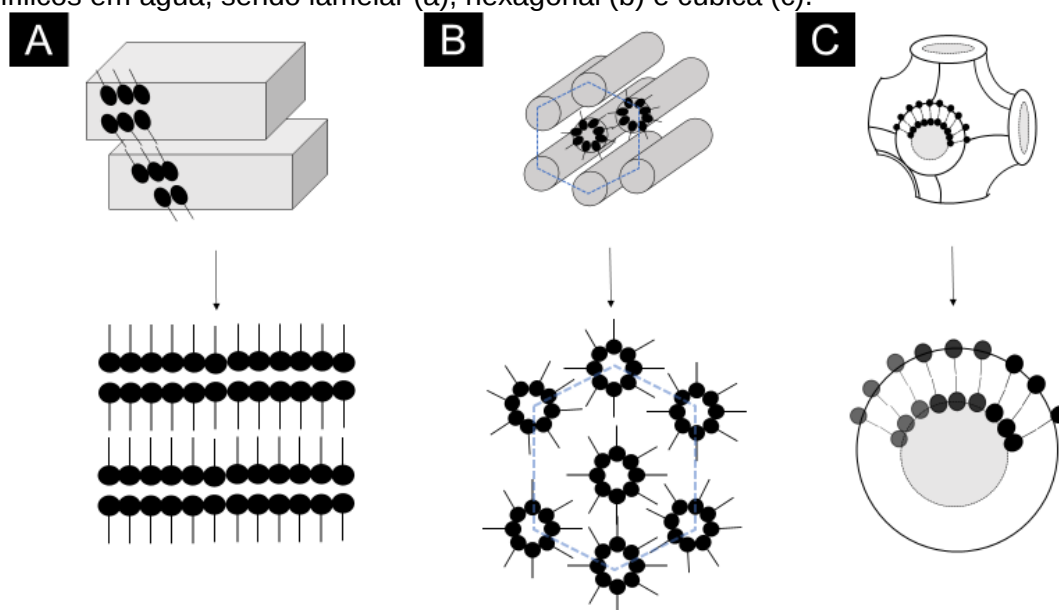
A auto-organização molecular está presente na natureza e tem gerado novas abordagens nas áreas biomédicas, biotecnológicas, nanotecnológicas e, em ascensão, na área farmacêutica, particularmente na liberação e entrega de fármacos (ARIGA *et al.*, 2008). A organização espontânea de moléculas ocorre em condições de equilíbrio termodinâmico em uma estrutura mais estável estabilizada molecularmente através de ligações não covalentes (WHITESIDES *et al.*, 1991; BALL, 1994).

O processo de auto-organização pode ocorrer por associação (com eles mesmos ou com estruturas diferentes) através de vários tipos de interações (associações de hidrogênio, forças de van der Waals, forças hidrofóbicas, interações iônicas ou reconhecimento não-covalente) (LEHN, 1988; 1990; 1995). Como existem vários tipos de interações envolvidas neste processo de auto-organização, a natureza das forças envolvidas modulará a variedade de organização estrutural para diferentes matrizes e/ou estruturas. Assim, para cada material, as várias formas e tamanhos podem ser obtidas baseando-se na auto-organização molecular ou supramolecular (ARIGA *et al.*, 2008). Estas diferentes interações podem estar envolvidas na associação e estabilização de hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e de anfifílicos (GARTI *et al.*, 2012; VERMA e HASSAN, 2013; DIANA *et al.*, 2015; LOMBARDO *et al.*, 2015; DELBIANCO *et al.*, 2016).

Os cristais líquidos (CLs) são mesofases auto-organizadas com propriedades intermédias entre sólidos cristalinos e líquidos isotrópicos (LARSSON, 1989; SINGH, 2000; MALMSTEN, M, 2002; MALMSTEN, 2007; PATEL e PATEL, 2010). CLs são classificados como termotrópicos ou liotrópicos dependendo do parâmetro físico-químico responsável pela sua transição de mesofase. A formação de mesofases pode ser delineada pelo aumento da temperatura ou pela adição de um solvente, que corresponde à diferenciação entre termotrópicos e liotrópicos, respectivamente (MALMSTEN, 2007; PATEL e PATEL, 2010).

CLs liotrópicos são formados pela mistura de uma molécula anfifílica e solventes, como óleos e água que, em uma temperatura e dada concentrações, podem se organizar em um mesofase. As mesofases formadas podem ser do tipo lamelar, hexagonal ou cúbica (PATEL e PATEL, 2010), conforme mostrado na Figura 12. A fase lamelar consiste de bicamadas de moléculas anfifílicas separadas por água. As estruturas hexagonais consistem em agregados lipídicos cilíndricos num meio contínuo de água. As fases cúbicas consistem em micelas normais ou reversas justamente empacotadas em simetria cúbica ou bicontínua. Dependendo do tipo da fase cúbica formada, a curvatura do filme formado pelo tensoativo varia consideravelmente (MALMSTEN, M, 2002). A fase cúbica é uma estrutura complexa, cuja interface cadeia carbônica/água pode ter curvaturas positivas e negativas (FLORENCE e ATTWOOD, 2006; ATTWOOD e FLORENCE, 2008).

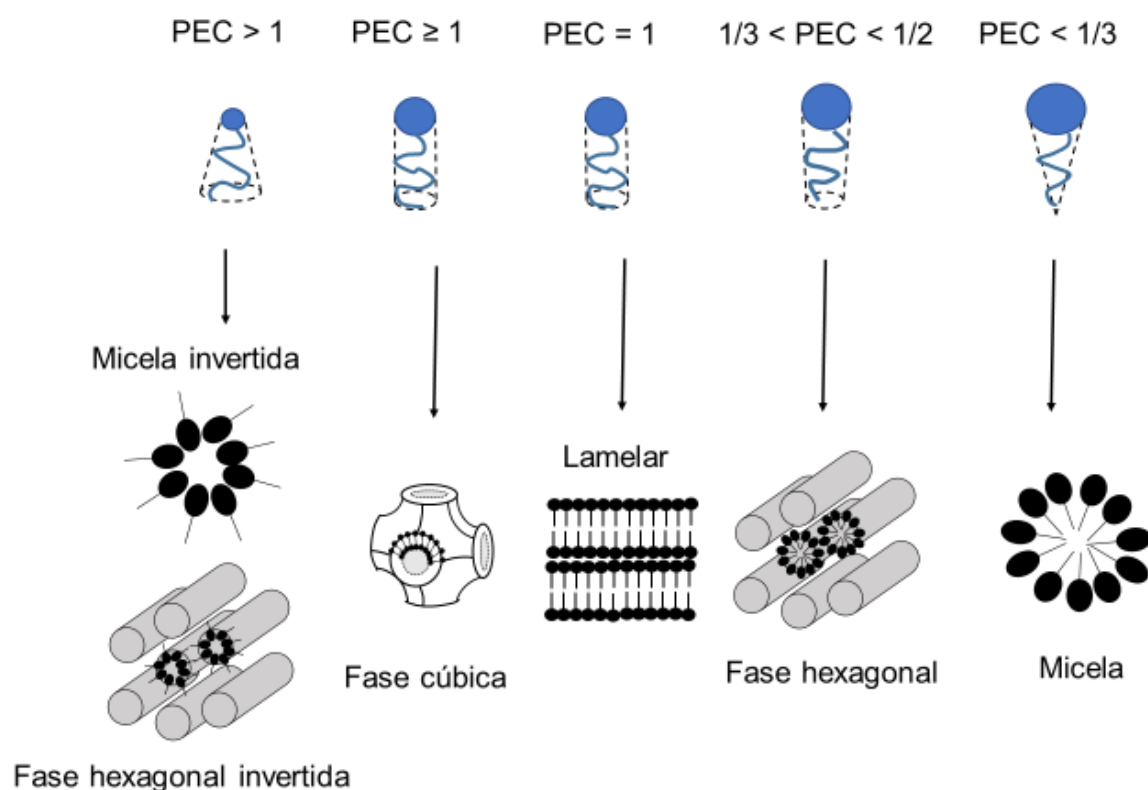
Figura 12. Representações esquemáticas de fases líquido-cristalinas formadas por anfifílicos em água, sendo lamelar (a), hexagonal (b) e cúbica (c).



A abordagem mais difusa para a racionalização das diferentes estruturas encontradas nos CLs liotrópicos baseia-se no conceito do parâmetro de empacotamento crítico (PEC) (ISRAELACHVILI *et al.*, 1976; ISRAELACHVILI 1991; ISRAELACHVILI, 2011). O PEC é um valor geométrico que consiste na relação entre o volume da cauda hidrofóbica (v), o volume da área de cabeça polar (A) e o comprimento da cauda hidrofóbica (l). Pelas alterações de valores do PEC, pode-se prever aproximadamente a ordem de transição de anfifílicos associados com a

mudança na curvatura da água ou óleo na interface (MALMSTEN, M, 2002). A Figura 13 mostra a correspondência entre várias mesofases e sua correspondência com o CEP.

Figura 13. Formação de estruturas líquido-cristalinas baseada no valor do parâmetro de empacotamento crítico (PEC) do anfifílico.



Adaptado de: MEZZENGA (2012).

O PEC prevê essencialmente duas classes de morfologias. Quando o valor de PEC for menor que 1 são esperadas morfologias do tipo óleo em água, em que as cabeças polares estão se formando uma interface convexa contra a água. Por outro lado, para PEC maior que 1, a inversão de fase ocorre e observa-se morfologias do tipo água em óleo, em que as superfícies côncavas da cabeça polar estão contra a água. As interfaces planas, o que corresponde à fase lamelar L_α são encontrados para valor de PEC igual a 1. Para a formação de micelas invertidas ou fase hexagonal invertida ou as fases cúbicas invertidas são esperados valores de CEP menor ou igual a 1, as fases hexagonais possuem valores entre 1/3 e 1/2; e micelas quando os valores são menores que 1/3 (MALMSTEN, M, 2002; SAGALOWICZ *et al.*, 2006).

O PEC tem sido amplamente utilizado para prever e racionalizar as diferenças observadas entre fases líquidas cristalinas e mudanças físicas, como, por exemplo, as alterações que ocorrem no PEC com a temperatura e a composição de anfifílicos. O aumento de temperatura leva ao rompimento parcial das ligações de hidrogênio, reduzindo a quantidade de moléculas de água solvatando as cabeças polares dos tensoativos, levando a um aumento do CEP, porque diminui a área de cabeça polar. Isto pode também explicar a transição de mesofase cúbica para hexagonal, por exemplo (QIU e CAFFREY, 2000).

Com base na literatura publicada, muitos fatores podem influenciar os comportamentos de fase de mesofases cúbicas e hexagonais. A adição de uma terceira substância, como o ácido oleico, trioleína, diglicerol monooleato, fosfatidilcolina de soja, palmitato de retinol, e tetradecano, pode modular as texturas das mesofases e até mesmo resultar na transição de fase (NAKANO *et al.*, 2002; YAGHMUR *et al.*, 2004; 2006). O aumento ou a diminuição da temperatura ou pressão também pode induzir a transição de fase de mesofases (YAGHMUR *et al.*, 2009) (YAGHMUR *et al.*, 2009), também como, a concentração de sal e valores do pH tem um efeito sobre o comportamento da transição de fase de CLs (AWAD *et al.*, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2008).

O conceito do PEC é limitado a uma interpretação qualitativa dos diagramas de fase e não pode ser usado para trazer uma visão sobre a complexidade estrutural das mesofases, nem sobre os mecanismos supramoleculares que regulam o seu comportamento de organização estrutural (MEZZENGA, 2012).

2.4 Liberação nasal como estratégia para vetorização de fármacos para o SNC

Para a administração de fármacos ao SNC e à circulação sistêmica, a via intranasal (IN) oferece várias vantagens em relação às vias convencionais orais ou parenterais (**Quadro 6**) (WU *et al.*, 2008; SHADAB *et al.*, 2009; LOCHHEAD e THORNE, 2012). Os fármacos quando administrados na cavidade nasal podem ser rapidamente absorvidas na circulação sistêmica sem a degradação enzimática usual e o efeito de primeira passagem hepática que acompanha a administração oral, resultando em biodisponibilidade aumentada e início rápido dos efeitos

farmacológicos (GRASSIN-DELYLE *et al.*, 2012). As áreas da cavidade nasal - nervo olfativo e trigeminal - fornecem aos fármacos, peptídeos ou proteínas, acesso direto ao cérebro, ignorando a barreira hematoencefálica (BBB), uma barreira altamente seletiva que exclui a maioria das moléculas (~ 98%) para o SNC (PARDRIDGE, 2005).

Cada fossa nasal é dividida em três segmentos: o vestíbulo, o átrio do meato e as conchas nasais (que, por sua vez, é dividido em conchas superiores, médias e inferiores) (HARKEMA *et al.*, 2006; GRASSIN-DELYLE *et al.*, 2012). A zona respiratória é o principal local de entrada sistêmica de fármacos devido à sua alta área de superfície (120 a 150 cm²) e sua membrana altamente vascularizada e permeável e contém glândulas responsáveis pela secreção da maioria do muco nasal (Figura 14). O epitélio que cobre as fossas nasais é constituído principalmente por células basais, células ciliadas e células de cálice que secretam muco (GRASSIN-DELYLE *et al.*, 2012). As células epiteliais são mantidas juntas por junções intercelulares apertadas e os cílios, presentes nas células ciliadas, transportam o muco para a junção orofaríngea, sendo, então, deglutido (GRASSIN-DELYLE *et al.*, 2012).

O epitélio da mucosa nasal é composto em sua maioria por uma membrana que contém células colunares, calciformes e basais. As células colunares presentes no terço anterior do epitélio são células não ciliadas, enquanto que as restantes são ciliadas. Os cílios são pequenas projeções piliformes localizadas sobre a superfície exposta das células epiteliais. Cada célula contém em torno de 300 cílios, que medem entre 5 e 10 µm de comprimento e 0,1 a 0,3 µm de diâmetro. Esses cílios ondulam em ritmo uniforme, com uma frequência de 10 Hz. Sua função é facilitar o movimento do muco da cavidade nasal para a nasofaringe e, finalmente, para o trato gastrointestinal. O efeito combinado desses cílios é denominado depuração mucociliar.

Quadro 6. Vantagens e desvantagens associadas à entrega intranasal (IN) de fármacos.

Vantagens	Desvantagens ou limitações
Absorção rápida que leva ao perfil plasmático semelhante à administração intravenosa para fármacos lipofílicos com peso molecular <1000 Da	Volume de administração limitado (< 100 µL / narina)
Biodisponibilidade avançada comparada à administração oral devido à evitação do metabolismo hepático ou gastrointestinal	Apenas medicamentos potentes (que exigem baixa dose) podem ser administrados devido à solubilidade inadequada da maioria dos medicamentos
Início rápido de efeitos farmacológicos em comparação com a administração oral	A depuração mucociliar rápida que leva à remoção de formulação/fármaco do local de absorção
Administração não-invasiva e fácil	Pode não ser adequado para fármacos hidrofílicos ou que são ionizados no pH nasal (6.5-7.5)
Adequado para pacientes com incapacidade de deglutição ou patologia gastrointestinal, náuseas ou vômitos	Degradação enzimática
Fármacos podem ser direcionadas para o cérebro e FCE por contornar a BHE, portanto, adequado para direcionar fármacos de alto peso molecular para o cérebro	Potencial de irritação ou toxicidade para a mucosa nasal
Redução das doses administradas devido à segmentação ou biodisponibilidade aumentada.	A absorção pode ser afetada em condições como rinite, rinorréia, congestão nasal

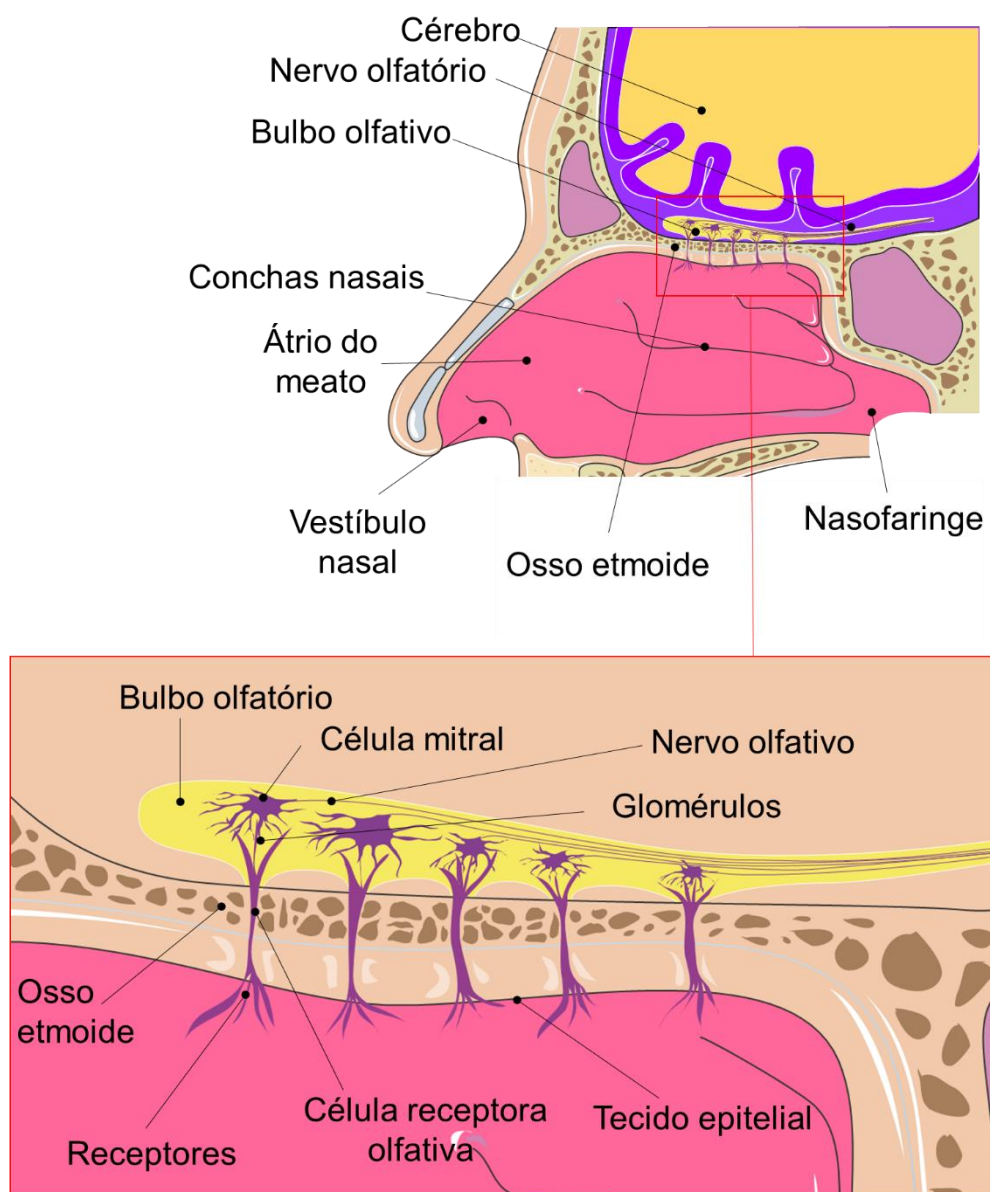
O epitélio olfatório (Figura 14) tem uma pequena área superficial (1 a 5 cm², representando apenas 3 a 5% da área total da superfície da cavidade nasal (MORRISON e COSTANZO, 1990) e, portanto, não está significativamente envolvida na absorção sistêmica dos fármacos, no entanto, pode permitir o acesso direto ao SNC, ignorando a barreira hematoencefálica (ILLUM, 2004). Esse epitélio é formado por células olfativas, que são neurônios em contato com o ambiente externo e outra

extremidade na lâmina própria, formando os nervos olfativos que entram nos bulbos olfativos através da placa cribriforme do osso etmoidal. Após a absorção na lâmina própria, os fármacos podem se transportar intracelularmente ao longo desses neurônios olfativos periféricos para os bulbos olfativos e serem distribuídos para a porção rostral do cérebro (THORNE e FREY, 2001) ou transportar extracelularmente para os bulbos olfatórios e LCR através dos nervos olfatórios e espaços linfáticos ou perivascularares (REGER *et al.*, 2006).

Os produtos nasais para uso sistêmicos são principalmente soluções aquosas ou suspensões fornecidas como pulverizações (WANG *et al.*, 2013), mas isso nem sempre é a abordagem de formulação mais apropriada porque a absorção de fármacos não pode ser controlada, isto é, não há controle sobre as concentrações plasmáticas, a duração da absorção ou tempo para atingir as concentrações terapêuticas adequadas (WATTS e SMITH, 2009). Algumas destas especialidades farmacêuticas podem ser citadas: *spray* nasal de calcitonina (Miacalcin®) para o tratamento da osteoporose; *spray* nasal de mesilato de dihidroergotamina (Migranal®) e sumatriptano (Imitrex®) para tratamento de enxaqueca; *spray* nasal de naloxano (Narcan®) para o tratamento de resgate por overdose de opioides; *spray* nasal de nicotina (Nicotrol®) para o tratamento antitabagismo; *spray* nasal de cetorolaco (Sprix®) e butorfanol (Stadol®) para o tratamento de dor moderada a severa; *spray* nasal de esuquetamina (Spravato®) para o tratamento da depressão; gel nasal de testosterona (Natesto®) para terapia de reposição hormonal; e *spray* nasal de ocitocina (Syntocinon®) para auxiliar a contração uretina.

Além do mais, soluções aquosas simples podem escorrer do nariz, serem drenadas rapidamente e, então, serem engolidas, o que pode, em última instância, diminuir a magnitude ou aumentar a variabilidade da resposta terapêutica. Por exemplo, o tempo para 50% de uma formulação líquida simples para ser depurada a partir da cavidade nasal é de 15 - 20 min (WASHINGTON *et al.*, 2001). Portanto, a abordagem de formulações mucoadesivas pode ser utilizada com sucesso para aumentar a retenção do fármaco na superfície da mucosa nasal (BRUSCHI, 2015). Sistema responsivos ao estímulo apresentam-se líquido à temperatura ambiente e em resposta à temperatura nasal, pH, íons ou ao muco presentes nas mucosas, podem sofrer geleificação *in situ* na cavidade nasal (SINGH *et al.*, 2013; GALGATTE *et al.*, 2014).

Figura 14. Representação das diferentes áreas da cavidade nasal e da via olfatória do epitélio nasal



Neste contexto, as mucosas e, em particular, a mucina que as revestem, são uma parte essencial dos fenômenos de mucoadesão e cobrem as cavidades naturais do corpo, proporcionando uma barreira epitelial ao ambiente externo (SOSNIK *et al.*, 2014). Em particular, a passagem nasal é coberta pela mucosa, que aprisiona partículas e bactérias, com a finalidade de limpar e proteger da cavidade nasal (WU *et al.*, 2008). Devido às variações do tipo epitelial, a presença e / ou a distribuição de porções de carboidratos no glicocálix e as características de rugosidade ou

dobramento das superfícies mucosas podem influenciar os fenômenos de mucoadesão (ACCILI *et al.*, 2004). Algumas informações da variabilidade estão alocadas no Quadro 7.

Quadro 7. Principais características de diferentes locais da mucosa.

Mucosa	Tipo de epitélio	Temperatura	Tensão de cisalhamento	Muco			Tamanho médio do epitélio
				Concentração de mucina	pH	Depuração	
Bucal	Esquamoso estratificado não-queratinizado	36,5 °C	Mastigação (M)	0,1–0,5%	7,1 (6,8 – 7,4)	0,1 – 1,85 mL/min	10–100 µm
Gástrica	Colunar simples	37 °C	Digestão (M)	3%	1,6 (1,0 – 2,5)	4 – 5 h	50–450 µm
Intestinal ^a	Colunar simples com vilosidades	37 °C	Digestão (M)	1%	6,9 (5,9 – 7,5)	47–270 min	37 µm
Colonica	Colunar simples	37 °C	- (M)	<5%	6,6 (6,0–7,0)	270–300 min	110–130 µm (50–275 µm)
Nasal	Colunar pseudoestratificado ciliado	30 °C (28–34 °C)	Respiração (M) Tosse (A)	2–3%	6,6 (6.3–6.7)	5–10 min 0.5–1 mL/min ^b	10-15 µm
Ocular	Esquamoso estratificado não-queratinizado	34 °C	Piscar (H)	0,01%	7.6 (7.5–7.8)	5-10 s	3–5 µm
Vaginal	Esquamoso estratificado não-queratinizado	37 °C	Copulação (A)	1-5%	4.2 (3.5–4.5)	1,5 – 6 mL/dia	20 µm

^a Intestino delgado; ^b Fluxo. **Adaptado para o português de:** SOSNIK *et al.* (2014)

O muco é produzido por células caliciforme ou glândulas na mucosa ou sub-mucosa (LITT, 1984) e apresenta-se como um fluído viscoelástico não-newtoniano e altamente hidratado, cerca de 95% de água, que compreende uma rede tridimensional de mucinas (2-5%), com malha de rede compreendendo entre 20–200 nm (OLMSTED *et al.*, 2001), e apresentando valores típicos de viscosidade na faixa de 10-10³ Pa.s em baixas taxas de cisalhamento, porém os valores de viscosidade podem variar dependendo de composição, sítio anatômico e das condições fisiopatológicas (LAI *et al.*, 2009).

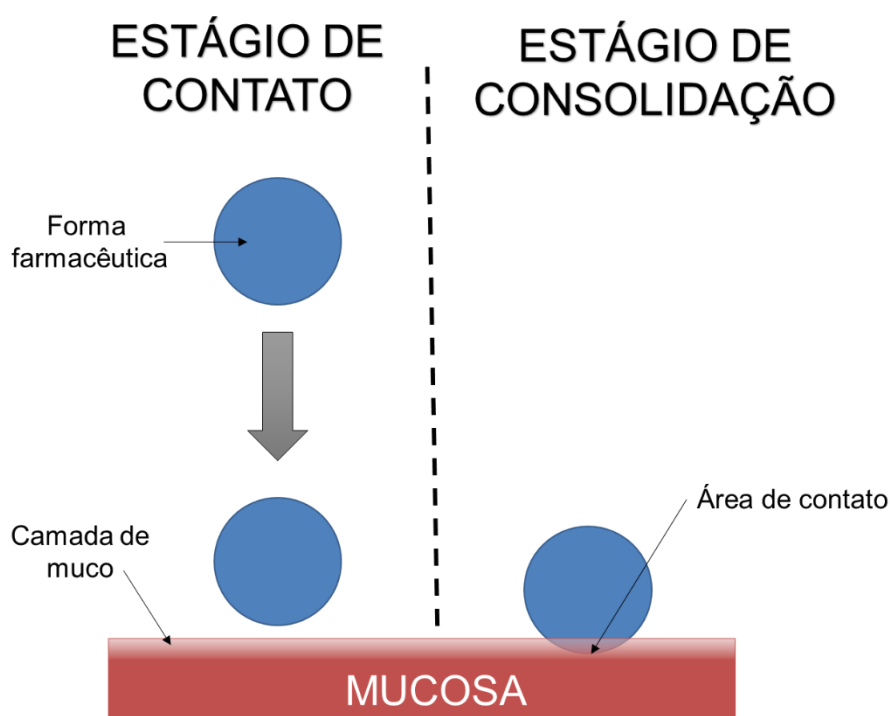
As mucinas estão presentes no muco e têm um papel importante nos fenômenos de adesão. Estas proteínas compreendem um grupo de glicoproteínas que diferem nas suas sequências estruturais de glicosilação e polipeptídeos e são codificados pela família de genes *MUC*. Uma vez em meios aquosos, as mucinas enredam e originam sistemas heterogêneos e complexos geleificados que são estabilizados por ligação de hidrogênio intra- e intermolecular, interações eletrostáticas e ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína presentes em regiões não-glicosiladas (BANSIL *et al.*, 1995). A quantidade de ligação dissulfeto presente nas mucinas do muco influencia no comportamento viscoelástico (HANISCH e MÜLLER, 2000). Outro fator que possui um papel no empacotamento e função estrutural das mucinas é a variação do pH, devido a presença de ácido siálico (pK_a = 2,6) a carga elétrica da mucina varia em função deste, com valor do ponto isoelétrico em 2 – 3, podendo a carga eletrostática influenciar nos processos de mucoadesão.

Desde a década de 80, o conceito de mucoadesão ganhou interesse considerável na área de Tecnologia Farmacêutica (MORTAZAVI *et al.*, 1982; SMART e KELLAWAY, 1982). A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, pelo menos um dos quais são de natureza biológica, são mantidos juntos por longos períodos de tempo por forças interfaciais. Nas Ciências Farmacêuticas, quando o adesivo é para o muco ou uma membrana mucosa, o fenômeno é referido como mucoadesão (SMART, 2005).

Embora os estudos sobre os mecanismos envolvidos na mucoadesão e o desenvolvimento de novos sistemas ou de polímeros mucoadesivos tenham evoluído nos últimos vinte anos, a mucoadesão ainda não é totalmente compreendida. As técnicas quantitativas e qualitativas ainda são tratadas separadamente para explicar esse processo (CARVALHO, FLÁVIA CHIVA *et al.*, 2010).

Geralmente, nos estudos da adesão, existem dois passos no processo adesivo, são descritos como a interação entre materiais mucoadesivos e uma membrana mucosa (Figura 15) (SMART, 2005; 2014). Primeiramente, no estágio de contato ocorre um contato íntimo, também chamado de molhante, entre a membrana mucoadesiva e mucosa. Posteriormente, ocorre o estágio de consolidação, onde várias interações físico-químicas governam para consolidar e fortalecer a junta de contato, levando a uma adesão prolongada (SMART, 2005).

Figura 15. As duas etapas do processo de mucoadesão.



O mecanismo de adesão de certas macromoléculas à superfície de um tecido mucoso ainda não está bem compreendido (CARVALHO, FLÁVIA CHIVA *et al.*, 2010). O sistema mucoadesivo deve espalhar-se sobre o substrato para iniciar contato próximo e aumentar o contato superficial, promovendo a difusão de suas cadeias poliméricas dentro do muco. As forças de atração e repulsão surgem e, para que o processo de mucoadesão seja bem sucedido, as forças de atração devem dominar (SMART, 2005). Diferentes teorias individuais de adesão foram sugeridas para explicar a mucoadesão (Quadro 8); entretanto, a combinação destas podem proporcionar uma compreensão satisfatória dos fenômenos ocorridos (KHUTORYANSKIY, 2011; SMART, 2014).

Quadro 8. Diferentes teorias utilizadas para explicar as interações adesivas entre materiais mucoadesivos e muco / mucosa

Teoria	Descrição
<i>Teoria eletrônica</i>	A adesão é estabelecida devido à atração eletrostática entre mucina carregada negativamente e materiais carregados positivamente
<i>Teoria da adsorção</i>	As interações adesivas estão relacionadas ao estabelecimento de ligações hidrogênio e van-der-Waals; efeitos hidrofóbicos e quimisorção
<i>Teoria da molhabilidade</i>	A adesão está relacionada com a capacidade de um mucoadesivo (quando em forma líquida) se espalhar pela camada de muco
<i>Teoria da difusão</i>	Considera que a adesão é estabelecida pela interpenetração de mucoadesivos macromoleculares (poliméricos ou outros) com fibras de mucina, conduzido por um diferencial de gradiente de concentração
<i>Teoria da fratura</i>	Relaciona a adesão com a força necessária para o desprendimento interfacial de duas superfícies sólidas previamente anexadas
<i>Teoria mecânica</i>	A adesão depende da rugosidade de duas superfícies diferentes e da área disponível para interação

Adaptado para o português de: SOSNIK *et al.* (2014)

A teoria eletrônica baseia-se na premissa de que materiais mucoadesivos e biológicos possuem cargas elétricas opostas. Assim, quando ambos os materiais entram em contato, eles transferem elétrons levando à construção de uma camada eletrônica dupla na interface, onde as forças atraentes dentro desta dupla camada eletrônica determinam a força mucoadesiva (SMART, 2005; 2014).

De acordo com a teoria da adsorção, o dispositivo mucoadesivo adere ao muco por interações químicas secundárias, como van der Waals e ligações de hidrogênio, eletrostática ou interações hidrofóbicas. Tais forças foram consideradas as mais importantes no fenômeno de interação adesiva (SMART, 2005) porque, embora sejam individualmente fracas, um grande número de interações podem resultar em uma forte adesão global (MATHIOWITZ *et al.*, 1999; SMART, 2014).

A teoria molhante é aplicada principalmente aos sistemas líquidos e considera as energias superficiais e interfaciais do sistema com a mucosa. Envolve a capacidade de um líquido se espalhar espontaneamente para uma superfície como pré-requisito para o desenvolvimento da adesão (SMART, 2005). A afinidade de um líquido para

uma superfície pode ser encontrada usando técnicas como a geometria do ângulo de contato para medir o ângulo de contato do líquido na superfície, sendo a regra geral que quanto menor o ângulo de contato, maior a afinidade do líquido para o sólido (ANDRADE *et al.*, 1979; PEPPAS e BURI, 1985; LEHR *et al.*, 1992; SRIAMORNSAK *et al.*, 2008). O coeficiente de espalhamento (S_{AB}) pode ser calculado a partir das energias de superfície do sólido e líquido usando a Equação 7:

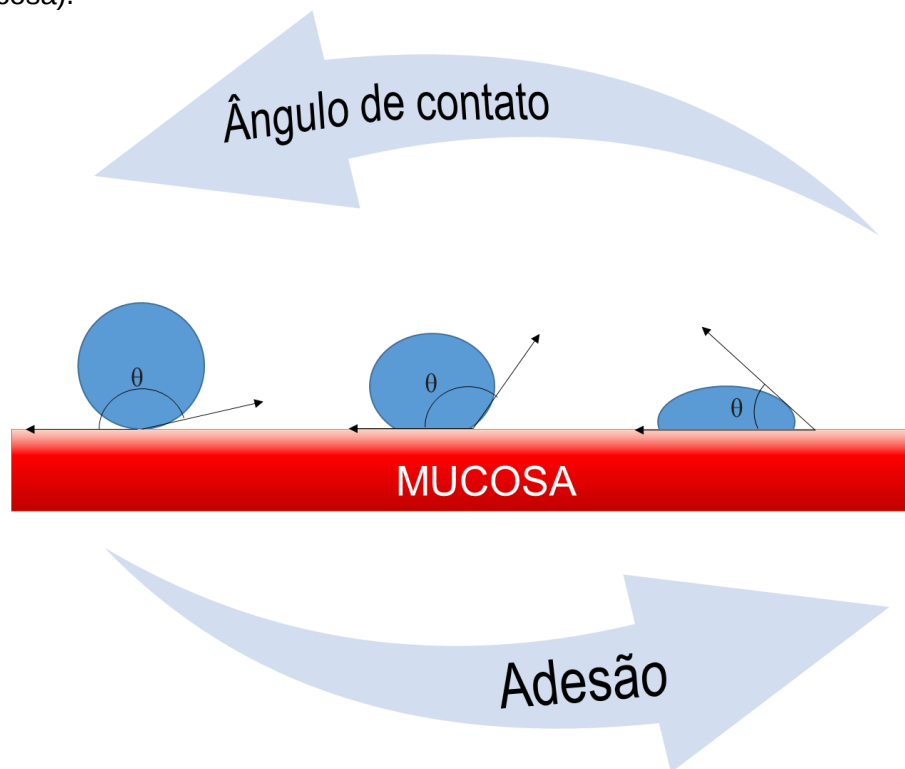
$$S_{AB} = \gamma_A - \gamma_B - \gamma_{AB} \quad \text{Equação 7}$$

onde γ_A é a tensão superficial (energia) do líquido A, γ_B é a energia superficial do sólido B e γ_{AB} é a energia interfacial entre o sólido e o líquido. O S_{AB} deve ser positivo para o líquido se espalhar espontaneamente pelo sólido.

Quanto maior a energia de superfície individual do muco e do dispositivo em relação à energia interfacial, maior o trabalho de adesão (W_A), isto é, maior a energia necessária para separar as duas fases (Equação 8).

$$W_A = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB} \quad \text{Equação 8}$$

Figura 16. Ilustração do ângulo de contato de uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida (mucosa).



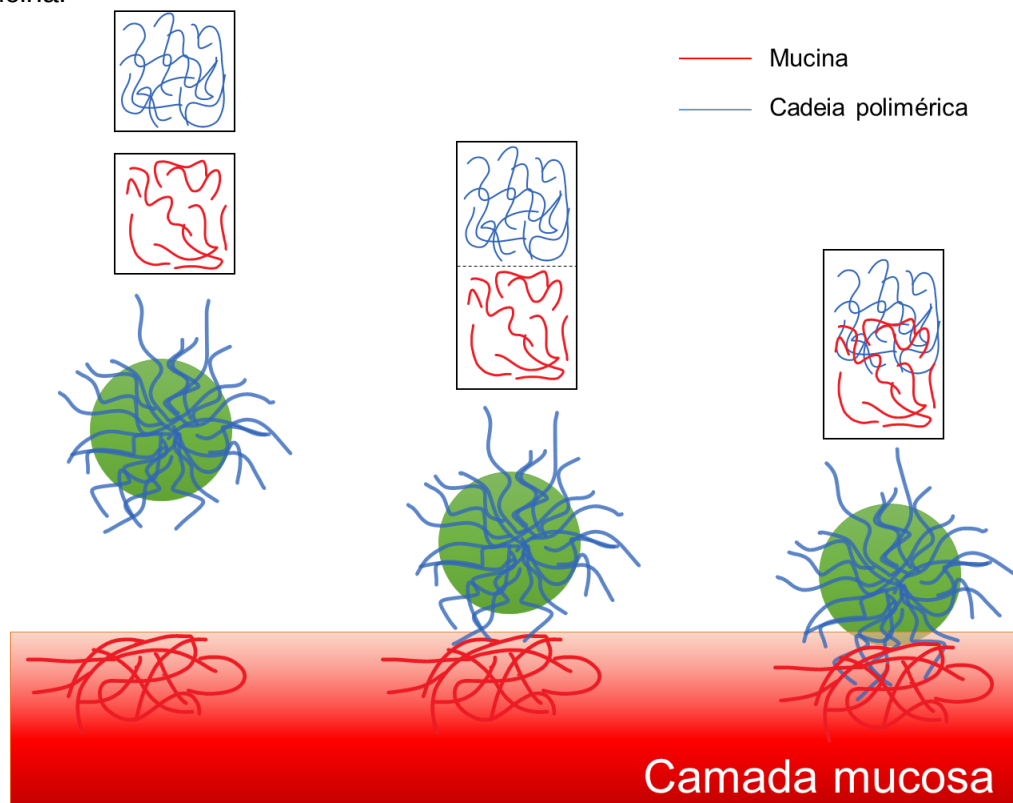
A teoria da difusão descreve a interpenetração de cadeias de polímeros em uma interface adesiva. Este processo é conduzido pelo gradiente de concentração e é afetado pelos comprimentos de cadeia molecular da macromolécula e suas mobilidades. A profundidade de interpenetração depende do coeficiente de difusão e do tempo de contato (PEPPAS e BURI, 1985; SMART, 2005). De acordo com a literatura, a profundidade de interpenetração necessária para produzir uma ligação bioadesiva eficiente está na faixa de 0,2 a 0,5 μm . Esta profundidade de interpenetração de cadeias de polímero e mucina pode ser estimada pela Equação 9:

$$I = (tDb)^{1/2}$$

Equação 9

onde t é o tempo de contato, e Db é o coeficiente de difusão do material mucoadesivo no muco.

Figura 17. Interações secundárias que geram a interpenetração das cadeias de polímeros na mucina.



A teoria da fratura difere um pouco das outras cinco na medida em que relaciona a força adesiva com as forças necessárias para o desprendimento das duas superfícies envolvidas após a adesão. Isso pressupõe que a falha da ligação adesiva ocorra na interface (SMART, 2005). A força necessária para separar duas superfícies após a adesão ser estabelecida (Hägerström, 2003; Smart, 2005). Esta força (S_m) é frequentemente calculada em testes de resistência à ruptura pela proporção da força máxima de desprendimento (F_m) e da área de superfície total (A_0), envolvida na interação adesiva dada pela Equação 10:

$$S_m = \frac{F_m}{A_0}$$

Equação 10

A energia de fratura (g_c) pode ser obtida a partir do trabalho de adesão reversível (W_r), ou seja a energia necessária para produzir novas superfícies fraturadas) e o trabalho de adesão irreversível (W_i) que é o trabalho de deformação plástica provocada pela remoção de uma ponta de prova até a ruptura da ligação

adesiva, e ambos os valores são expressos como unidades de superfície de fratura (A_f) (Equação 11).

$$g_c = W_r + W_i \quad \text{Equação 11}$$

O módulo elástico do sistema está relacionado ao stress (σ) e ao cisalhamento (ϵ) e pela lei de Hooke (Equação 12):

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0} = \frac{FL_0}{\Delta LA} \quad \text{Equação 12}$$

onde: E é o módulo de Young ou módulo de elasticidade; F é a força exercida sobre um objeto sob tensão; A é a área transversal real através da qual a força é aplicada; ΔL é a variação da espessura sistema; L_0 é o comprimento original.

Ao final, em um único sistema de componente uniforme, a força de fratura (S_j) que é equivalente à força de ruptura máxima (S_m) é proporcional à energia de fratura (g_c), para o módulo de Young (E) e para o comprimento de ruptura crítico (c) no local da fratura, conforme descrito na Equação 13:

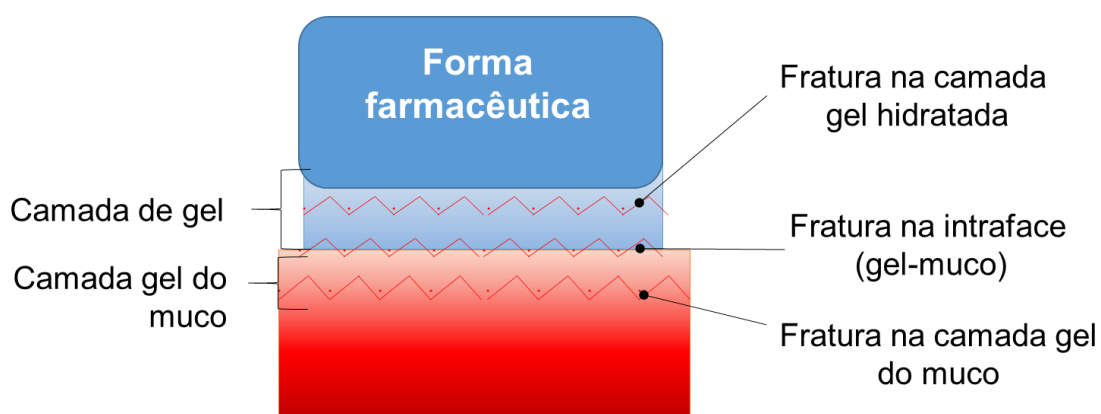
$$S_j = \left(\frac{g_c E}{c} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 13}$$

Uma crítica a esta análise é que o sistema sob investigação deve ter dimensões físicas conhecidas e deve ser constituído por um material único e uniforme. Em virtude disto, a relação obtida não pode ser aplicada para analisar o local de fratura de um bioadesivo de componentes múltiplos. Neste caso, a equação deve ser expandida para acomodar dimensões elásticas e módulos para cada componente (CARVALHO, FLÁVIA CHIVA *et al.*, 2010).

A teoria mecânica assume que a adesão surge de um bloqueio de um adesivo líquido em irregularidades em uma superfície áspera. No entanto, as superfícies ásperas também fornecem uma área de superfície aumentada e disponível para essa interação, juntamente com uma maior dissipação viscoelástica e plástica de energia durante a fratura conjunta, em que se pensa ser mais importante no processo de

adesão do que um efeito mecânico (PEPPAS e SAHLIN, 1996). A falha adesiva ocorrerá normalmente no componente mais fraco da ruptura (). Para adesivos mais fracos, esta seria a interface mucoadesiva-muco, para adesivos mais fortes, a interface inicialmente seria entre a camada de muco e o material mucoadesivo hidratado (HÄGERSTRÖM e EDSMAN, 2001).

Figura 18. Regiões para a fratura da junção mucoadesiva em uma forma farmacêutica em contato com a mucosa.



Nenhum desses mecanismos ou teorias isoladas podem explicar a mucoadesão em sua totalidade, já que os fenômenos ocorrem de forma sinérgica e cada qual em etapas diferentes do processo. No entanto, a compreensão desses mecanismos em cada instância pode ajudar no desenvolvimento de novos produtos mucoadesivos e compreender para os produtos já existentes (SMART, 2005; 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração intranasal de *trans*-resveratrol e avaliar *in vivo* em modelo de Alzheimer induzido.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a influência do tamanho da cadeia de polioxietileno na formação e propriedades de nanoestruturas;
- ✓ Avaliar a utilização de outros anfifílicos não iônicos, como o polissorbato de monosorbitano e o álcool cetílico etoxilado e propoxilado na formação e propriedades de nanoestruturas;
- ✓ Desenvolver e validar metodologia analítica do RES por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Determinar a solubilidade do RES nos sistemas estudados e nos excipientes utilizados;
- ✓ Inquirir o potencial de formulações precursoras de cristais líquidos frente ao fluído nasal simulado mimetizando o biológico;
- ✓ Caracterizar os sistemas estruturados formados por técnica de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo, comportamento reológico e reométrico, análise do perfil de textura e a absorção de líquidos;
- ✓ Avaliar as propriedades mucoadesivas das formulações obtidas;
- ✓ Avaliar a segurança das formulações pelo método da difusão em ágar em células 929.
- ✓ Investigar a atividade nootrópica das formulações pela administração intranasal em camundongos com Alzheimer induzido pela estreptozotocina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, EUA)
- Ácido acético (Qhemis, Brasil)
- Ácido oleico grau P.A. (Synth, Brasil);
- Álcool cetílico etoxilado 20OE e propoxilado 5OP (Croda, Brasil);
- Álcool oleílico etoxilado 20OE (Croda, Brasil);
- Cloreto de cálcio P.A. (Synth, Brasil);
- Cloreto de potássio grau P.A. (Synth, Brasil);
- Cloreto de sódio grau P.A. (Synth, Brasil);
- Etanol absoluto (Qhemis, Brasil)
- Mucina de porco tipo II (Sigma-Aldrich, EUA)
- PEG 400 (Audaz, Brasil)
- Polissorbato 80 (Synth, Brasil);

4.1.2 Equipamentos

- Agitador Digital Eurostar™ 20 (IKA, Alemanha) com haste de agitação aço inox 316L tipo hélice (naval) 50mm;
- Câmera digital Samsung DV300F (Samsung, Coréia do Sul)
- Centrífuga de tubos Sorvall TC6 (Sorvall, EUA);
- Cromatógrafo Líquido Varian, composto por módulo de bombeamento de solvente ProStar/Dynamax 210/215, detector UV ProStar 330 UV-VIS PDA, injetor automático Varian Autosampler, forno de coluna Timeline 210, Coluna de fase reversa C18 Luna 250 mm x 4.6mm 5µm (Phenomenex, EUA) e pré-coluna C18 3 cm x 4 cm (Phenomenex, EUA);
- Espalhador de raio X à baixo ângulo, faixa de energia de de 8 keV, monocromador ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$), detector vertical Pilatus 300K com pixel de 172 µm, 487 x 195 pixels, taxa de quadros de 200 Hz (Dectris®, Baden, Suíça); porta amostras PALMI (amostras líquidas, 300 µL de volume mínimo) e PASMI

(amostras sólidas, 7 compartimentos, motorizados) de desenvolvimento interno do LNLS;

- Estufa de ar circulante Regist 170 (Fabbe, Brasil);
- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix (local não especificado);
- Microscópio de luz polarizada Carl-Zeiss Axion 40 (Carl-Zeiss, Alemanha);
- Purificador de água Millipore Milli-Q® Direct 8 por osmose reversa (tipo III) e ultrapura (tipo I) (Darmstadt, Alemanha);
- Reomêtro híbrido Discovery HR-1 (TA Instruments, EUA);
- Texturômetro TAXTplus (Stable Micro System, Reino Unido);

4.2 Métodos

4.2.1 Comportamento de fases dos tensoativos em água

O comportamento de fases liotrópico dos tensoativos: álcool oleílico etoxilado (3OE) – OLETH-3 (O3), álcool oleílico etoxilado (20 OE) – OLETH-20 (O20), ou álcool cetílico etoxilado (5 OP) e propoxilado (20 OE) – PPG-5-CETETH-20 (PC) foi verificado pela mistura destes componentes com concentrações crescentes de água destilada nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Com exceção do O20, este foi fundido a 65 °C e misturado com água também nessa temperatura. Os sistemas foram mantidos em equilíbrio de fase e as mesofases formadas foram identificadas por microscopia de luz polarizada (MLP).

4.2.2 Construção dos diagramas de fases ternários dos sistemas

Os diagramas de fases ternários foram obtidos pela titulação de água às misturas, massa total de 1 grama, contendo o tensoativo O3 e PC combinado com ácido oleico em proporções nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As proporções foram tituladas com água destilada (500 µL) com auxílio de micropipeta. Após cada adição, os sistemas foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro e mantidos em repouso por 24 h. Em caso de formação de bolhas, este tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas ser observado.

À exceção de O20, o diagrama foi construído ponto-a-ponto pensando-se cada componente isolado variando a cada 10% dentro do eixo dos diagramas totalizando

36 formulações. O tensoativo O20 e o AO foram pesados e então aquecidos até 65 °C até a fusão do anfifílico e então a proporção de água, previamente aquecida na temperatura de 65 °C, foi adicionada. Os sistemas foram mantidos em agitação com auxílio de bastão de vidro até o arrefecimento das formulações na temperatura ambiente.

Após o período de equilíbrio de fases, os sistemas foram identificados visualmente e classificados como: sistemas líquidos transparentes (SLT), sistemas de alta viscosidade transparentes (SAVT), sistemas opacos e separação de fases. Os sistemas obtidos, com exceção daqueles que separam fases, foram analisados por MLP.

4.2.3 Validação do método analítico por CLAE

Os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados segundo Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e pela RE 166/2017 (BRASIL, 2017).

O volume de amostra injetado foi de 50 µL, a proporção de fase móvel (água acidificada contendo 2% de ácido acético:metanol) foi de 50:50, fluxo de fase móvel de 1,0 mL por minuto, comprimento de detecção no UV de 303 nm e temperatura do forno de 30 °C.

4.2.3.1 Seletividade

Para determinar este parâmetro foram comparados os cromatogramas obtidos para excipientes e formulação sem RES.

4.2.3.2 Linearidade

A linearidade foi estabelecida pelas médias de três curvas padrão autênticas, as quais foram obtidas em oito níveis de concentrações diferentes de RES, variando de 0,5 – 100,0 µg.mL⁻¹. Cada concentração foi determinada em triplicata para cada curva padrão e a linearidade foi avaliada por análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

4.2.3.3 Precisão

Para o estudo de precisão foram utilizadas concentrações de 25, 50 e 75 µg.mL⁻¹ do RES determinada em triplicata. As análises foram realizadas em dois dias diferentes, não consecutivos.

4.2.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito para as concentrações 25, 50 e 75 µg.mL⁻¹, em triplicata em metanol. O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão, conforme Equação 14.

$$Exatidão (\%) = \frac{Concentração\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100$$

Equação 14

4.2.3.5 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi determinado, matematicamente, a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. O cálculo para determinar o valor correspondente ao LD, baseia-se no desvio padrão (DP) do residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (IC) ou coeficiente angular na curva analítica, segundo a Equação 15. O valor do LQ foi determinado pelo primeiro ponto da curva analítica.

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3,3$$

Equação 15

4.2.4 Estudos de solubilidade do RES

Os estudos de solubilidade do RES foram realizados utilizando excesso de fármaco em 5 mL de diferentes meios líquidos (formulações e excipientes) Foram testadas as formulações contendo PC e O20, ácido oleico, PC, O20 misturado com ácido oleico na proporção 6:3, PEG400 e etanol. As soluções saturadas foram mantidas em agitação, por 48 horas, em agitador vertical com velocidade controlada e protegidas da luz. Ao término, os tubos foram centrifugados à 2000 x g por 10 minutos e então o sobrenadante foi coletado. O sobrenadante foi diluído

adequadamente em fase móvel, filtrado em filtro PTFE 0,45 μm , e então injetado em CLAE. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.5 Seleção dos sistemas para caracterização físico-química

Os sistemas foram escolhidos com base no seu comportamento de fases liotrópico, sendo sistemas de baixa viscosidade e que aumentam sua viscosidade através da diluição aquosa. A formulação precursora de cristal líquido composta por PC / ácido oleico / água foi nomeada como F1, a formulação composta por O20 / ácido oleico / água como F2, a formulação composta por PS / ácido oleico / água como F3. As concentrações foram fixas para cada tipo de anfifílico, sendo compostas de 60% de anfifílico, 30% de fase oleosa e 10% de água.

Os formulações foram selecionadas pelo seu comportamento de fase e sua composição estão descritas no Quadro 9.

Quadro 9. Composição centesimal das formulações desenvolvidas.

Formulação	Excipiente	Porcentagem (%)
F1	Ácido oleico	30,0
	PPG-5-CETETH-20	60,0
	Água purificada	10,0
F2	Ácido oleico	30,0
	OLETH-20	60,0
	Água purificada	10,0
F3	Ácido oleico	30,0
	Polissorbato 80	60,0
	Água purificada	10,0

Para avaliar se os sistemas mudam de fases em contato com o muco e assim atuarem como precursores de cristal líquido, eles foram misturados com fluído nasal simulado (FNS) na proporção 30% (m/m), 50% ou 100% (m/m) em relação à formulação, mantidos a 32 °C, para simular a temperatura nasal e observadas por MLP para investigar a mudança de fase ocorrida. As formulações diluídas com 30% (m/m), 50% (m/m) e 100% (m/m) de FNS foram nomeadas com a diluição adicionando o número 30, 50 ou 100 ao final da nomenclatura.

4.2.6 Preparo do fluido nasal simulado (FNS)

A composição do FNS foi descrita por CALLENS *et al.* (2003) e a concentração de mucina foi baseada no estudo de revisão de SOSNIK *et al.* (2014) que descreveu o FNS com contrações de mucina entre 1,0 e 2,0%. Procedeu-se pesando 745 mg de cloreto de cálcio (NaCl), 129 mg de cloreto de potássio (KCl) e 32 mg de cloreto de cálcio (CaCl_2), os pós foram colocados em um béquer de vidro e adicionou-se *quantidade suficiente* de água purificada. Essa mistura foi agitada com auxílio de um agitador magnético por um tempo de 20 minutos até a total dissolução dos sais. Então, pesou-se a mucina e foi adicionada 2 gramas equivalente à 2% (m/v) no volume total de FNS. O béquer com a solução foi levado à agitação magnética por mais 12 horas até a total dispersão da mucina.

Posteriormente, efetuou-se o ajuste do pH até 6,0 com o auxílio de uma solução de ácido clorídrico 0,1 M e solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Então, a dispersão foi transferida quantitativamente para um cálice de vidro e o volume foi completado com água purificada *q.s.p.* 100 mL. O FNS foi acondicionado em garrafa de vidro e esta foi mantida em geladeira por um período máximo de 90 dias.

4.2.7 Incorporação RES nas formulações

O RES foi incorporado na concentração de 5 mg/g em *quantidade suficiente para (q.s.p.)* a massa total das formulações.

As formulações compostas por PC foram obtidas à frio e pela simples mistura dos componentes. Em gral de vidro, foi adicionado o RES, previamente pesado, então foi triturado com auxílio do pistilo com o intuito de reduzir o tamanho de partícula do RES. Após essa operação unitária, o RES foi levigado com o AO em agitação no próprio gral. Observou-se que ocorreu a dissolução parcial do RES na mistura e então foi adicionado o PC ao AO, cuja mistura foi agitada até a dissolução completa do RES. Ao final, a água foi adicionada, de forma lenta para evitar grumos, e as formulações foram acondicionadas em fracos de vidro.

A técnica pela fusão a quente foi empregada para as formulações compostas por O20. Pesaram-se o O20 e ácido oleico e esta mistura foi aquecida e fundida a 65 °C. Após a fusão, o RES foi pesado e adicionado ao material fundido, foi aguardado que todo o RES fosse dissolvido na mistura O20/AO. Ao final, o sistema foi titulado

com água na temperatura de 60 °C utilizando uma micropipeta e as formulações foram acondicionadas em fracos de vidro protegidas da luz.

Para avaliar se os sistemas mudam de fase em contato com o muco e assim atuam como precursores de cristal líquido, eles foram misturados com fluido nasal simulado (FNS) na proporção 30% (m/m), 50% ou 100% (m/m) em relação à formulação, mantidos a 32 °C. As formulações diluídas com 30% (m/v), 50% (m/v) e 100% (m/v) de FNS foram nomeadas com a diluição adicionando o número 30, 50 ou 100 ao final da nomenclatura, juntamente com a sigla RES.

4.2.8 Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MPL)

As amostras foram preparadas colocando uma pequena quantidade do sistema sobre uma lâmina e coberta com lamínula. As imagens foram obtidas num aumento de 40 ou 100 ×. A caracterização por MLP foi realizada utilizando um microscópio de luz polarizada e as fotomicrografias foram obtidas com auxílio de câmera digital.

4.3 Espalhamento de Raio-X à Baixo Ângulo (SAXS)

O arranjo estrutural dos sistemas foi analisado por SAXS. Os dados foram coletados na estação de medidas D11-A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas - SP, em monocromador do tipo Si (111) comprimento de onda de 1,608 Å. As amostras foram colocadas em uma cela à temperatura ambiente. Para amostras líquidas foi usado aparato PALMI (porta amostra de líquidos com mica) e para amostras semissólidas foi usado o aparato PASMI (porta amostras de sólidos com mica) usando fita kafton entre as amostras. O espalhamento parasita, espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais. A aquisição de dados foi realizada por um tempo de 10 até 30 s.

A posição do primeiro pico das curvas de SAXS, q_1 , é usada para avaliar os parâmetros de estrutura das fases lamelar e hexagonal, sendo a distância entre planos (d) e aresta de hexágono (a), a partir das Equação 16 e Equação 17, respectivamente:

$$d = 2\pi/q_1$$

Equação 16

$$a = \frac{\sqrt{2}}{3/d}$$

Equação 17

4.4 Análise do perfil de textura e análise por reologia

4.4.1 Análise do perfil de textura

Para realização do teste, 7 gramas das formulações foram pesadas em tubos de centrífugas cônicos de 50 mL e centrifugados a 4000 rpm, por 3 minutos, para eliminação de bolhas e de forma a tornar sua superfície lisa. Os sistemas foram deixados em repouso por 12 horas para ocorrer o equilíbrio de fases.

Os tubos foram colocados abaixo da sonda analítica ($\varnothing$ 10 mm) do analisador de textura TAxplus (Stable Micro Syste), que foi programado para comprimir a amostra numa velocidade de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$ até a profundidade pré-definida de 10 mm e retornar a superfície na mesma velocidade. Após o tempo de 5 s, uma segunda compressão iniciou-se nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em seis replicatas, à temperatura de $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.1.1 Reologia oscilatória

A análise oscilatória foi realizada empregando reômetro híbrido Discovery HR-1 (TA Instruments) utilizando geometria cone-placa (diâmetro de 40 mm com ângulo de 2°) e altura de *gap* em $52 \text{ }\mu\text{m}$, à uma temperatura de $32 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Primeiramente, foi realizado o teste de varredura de tensão para determinação da região viscoelástica. Para esse teste foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz.

Após a determinação da tensão de 0,5 Pa da região viscoelástica, colocou-se o reômetro no modo teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 75 rad/s.

4.4.1.2 Reologia de fluxo

As medições reológicas foram realizadas a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$ em reômetro híbrido Discovery HR-1 (TA Instruments) com geometria de cone-placa (diâmetro de 40 mm e ângulo de 2°) e uma altura de *gap* de 52 μm . As amostras das formulações foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior para minimizar o cisalhamento da amostra e foram deixadas a equilibrar durante 3 minutos antes da análise. O cisalhamento ascendente foi de $0 - 100 \text{ s}^{-1}$ e o cisalhamento descentente foi de $100 - 0 \text{ s}^{-1}$, ambos foram realizados por 120 s.

4.5 Análise das propriedades mucoadesivas

Discos foram produzidos com a compressão direta de 250 mg de mucina em pó (Máquina de Compressão modelo A15V500, punção plana $\varnothing = 10 \text{ mm}$, Fabbe, Brasil) e foram aderidos à sonda analítica do equipamento com fita adesiva dupla face. Para realização do teste, os sistemas foram centrifugados numa velocidade de 4000 rpm e dispostos logo abaixo da sonda analítica dentro de um banho a 32°C . O conjunto foi introduzido 1 mm de profundidade a partir da superfície da amostra e mantido por 60 s sem nenhuma força ser aplicada durante a fase de contato. Depois, a sonda foi removida a uma velocidade constante de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$ até a total separação das duas superfícies. Calculou-se, através do programa de computador, a ASC obtida durante a fase de destaque da amostra e a comprimido, sendo reportada como trabalho de mucoadesão; determinou-se também o pico de mucoadesão, que é a força máxima obtida durante a retirada da sonda analítica.

4.6 Avaliação da citotoxicidade em agarose overlay em células L929

As células de tecido de camundongo da linhagem NTCT L929 (ATTC CLL1) foram cultivadas como e quando a confluência desejada foi atingida, realizou-se uma suspensão celular na concentração de 2×10^5 células mL^{-1} . Posteriormente foram pipetados 4 mL desta suspensão em cada poço (3,5 cm de diâmetro) das placas de 6 poços, em meio *Dulbecco's* com 5% de soro fetal bovino. Estas placas permaneceram em estufa, a 37°C com 5% de CO_2 , por 48 h, para permitir a adesão e a confluência da monocamada celular. A viabilidade celular mínima para a realização do ensaio foi

de 85%. É fundamental a observação da cultura celular antes do início do ensaio, pois alterações morfológicas ou sinais de contaminação determinariam o seu descarte. Através do microscópio invertido, as culturas foram examinadas e confirmou-se a ausência de contaminação e a saúde celular, com a confluência da monocamada. A confluência é alcançada quando toda a área disponível para o crescimento é tomada e as células mantêm contato entre si.

Após 48 horas, o meio de cultura foi aspirado e realizou-se a lavagem dos poços com 2 mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. Logo após, o PBS foi aspirado e 1 mL do meio de cobertura foi adicionado em cada poço. Este meio de cobertura é composto por ágar a 1,8%, adicionado do corante vermelho neutro a 0,01% e DMEM 2X concentrado (1:1 v/v). Tanto o ágar quanto o meio de cultura permaneceram em banho-maria a 40°C até serem colocados em contato com a monocamada de células. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 15 minutos, aguardando a solidificação do ágar, à temperatura ambiente. Discos de papel filtro foram embebidos nas formulações líquido-cristalinas, e foram colocados com pinças cirúrgicas no centro do poço contendo ágar. Para o controle celular, o primeiro poço recebeu apenas o meio de cobertura. Para o controle negativo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em meio de cultura DMEM, e para o controle positivo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em Triton™ X-100. Todos os sistemas líquido-cristalinos e controles foram testados em triplicata. As placas foram embrulhadas em papel de alumínio, para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro e levadas à estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 h. Após a incubação por 24h, os poços foram macroscopicamente observados, e a formação de um halo claro ao redor das amostras e dos controles positivos, evidenciou os efeitos relativos à citotoxicidade.

A extensão da área descorada foi dividida em 4 quadrantes, a partir do disco de papel filtro contendo as amostras. Os quadrantes foram mensurados visualmente, através de transparências milimetradas sob as placas e paquímetro, e então registradas. A metodologia utilizada fornece uma informação quantitativa (mediante a extensão do diâmetro dos halos) e qualitativa, a partir da interpretação dos resultados.

Para interpretação dos resultados, as médias finais obtidas para cada amostra foi relacionada ao grau de citotoxicidade como consta no Quadro 10.

Quadro 10. Graus de reatividade para teste de difusão em ágar.

Grau	Classificação	Parâmetro
0	Ausência	Ausência de descoramento sob a amostra
1	Leve	Zona de descoramento limitada à área sob a amostra
2	Branda	Zona de descoramento a partir da amostra até 0,5 cm
3	Moderada	Zona de descoramento a partir da amostra entre 0,5 a 1,0 cm
4	Severa	Zona de descoramento maior que 1,0 cm

Adaptado de: UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP 36 (2016)

4.7 Avaliação farmacológica das formulações em modelo animal de DA

4.7.1 Animais

Para os ensaios farmacológicos foram utilizados camundongos fêmeas de linhagem Swiss pesando entre 25,0 e 35,0 g e de aproximadamente 3 meses de idade provenientes do Biotério Central da Universidade do Itajaí (UNIVALI), Campus Itajaí, e retirados com pelo menos 3 dias de antecedência dos experimentos para ambientação no biotério de experimentação. Os animais foram mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C com livre acesso a água e comida em ciclo claro/escuro controlado de 12/12h, exceto durante a realização dos experimentos. Os ensaios farmacológicos foram realizados segundo os princípios éticos de Boas Normas de Experimentação, e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UNIVALI (Protocolo número: 058/18P).

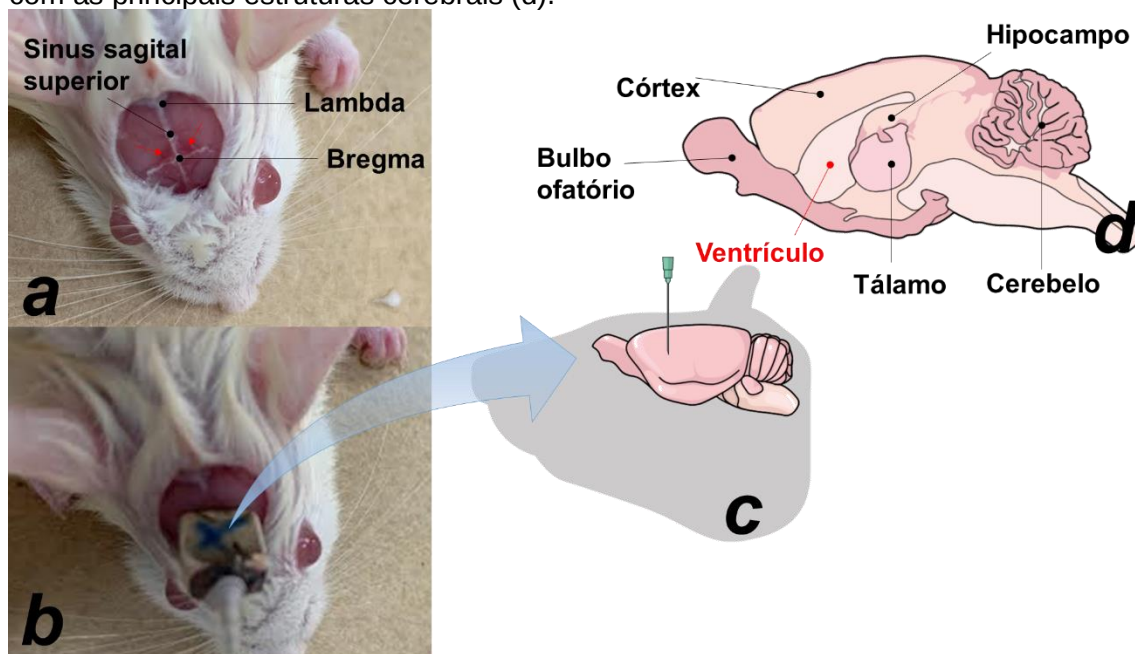
O total de 100 animais foi usado no ensaio e após o procedimento cirúrgico de indução, os mesmos foram aleatorizados nos grupos experimentais. Após os experimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical.

4.7.2 Indução da DA através da administração estreptozotocina

A STZ foi administrada pela via intracerebroventricular (i.c.v.) com os animais devidamente anestesiados com xilazina e quetamina (10 e 100 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após a administração dos anestésicos e posterior perda dos reflexos posturais, foi injetado na região superior da cabeça um anestésico local contendo agente vasoconstrictor contendo cloridrato de lidocaína 2% e de fenilefrina 1:2500 (1-2 mg/kg, s.c.) seguido de uma incisão para remoção de tecidos, utilizando tesoura cirúrgica e pinças, e exposição da calota craniana com auxílio de uma raspador.

Com a calota craniana exposta, 2µl de STZ (2,5 mg/mL) diluída em líquido cefalorraquidiano (LCR) artificial estéril foi administrado pela via i.c.v utilizando uma microseringa Hamilton® acoplada a um sistema de microcânula com uma agulha hipodérmica na extremidade. Para o procedimento inseriu-se a agulha sob o crânio dos camundongos unilateralmente (3 mm de profundidade), 1 mm da fissura craniana central a um ponto equidistante de cada olho, a uma distância igual entre os olhos e as orelhas e perpendicular ao plano do crânio (Figura 19).

Figura 19. Fotografia mostrando as estruturas cranianas do camundongo e as flechas vermelhas indicam o ponto de inserção da agulha (a) e com a agulha inserida ao local (b), figura ilustrativa com a localização do SNC no crânio do animal (c) e a ampliação do cérebro com as principais estruturas cerebrais (d).



Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas pós-cirúrgicas sob iluminação de 40W até total recuperação e controle de hipotermia induzida pela anestesia. No terceiro dia, realizou o mesmo procedimento e injetou-se a solução de STZ no outro ventrículo. Para controle da dor pós-operatória, ao final do procedimento, foi administrado dipirona (100 mg/kg, i.p.) uma única vez após as cirurgias e repetiu-se a aplicação após 72h.

Para a administração intranasal, procedeu-se da seguinte forma: os animais foram imobilizados e segurou-se em posição supino. Adicionalmente, outro manipulador efetuou a administração das formulações com auxílio de uma micropipeta com volume de 20 μ L. Com a micropipeta, aspirou-se um volume de 15 μ L e foi instilado lentamente na narina direita do animal pela introdução da ponteira na mesma (Figura 21). Após a administração aguardou-se cerca de 1 minuto com o animal em posição supino e então o animal foi colocado na sua respectiva caixa. Para otimizar a administração realizou-se a primeira administração em todos os animais na narina direita. Ao término, procedeu-se com a administração na narina esquerda do mesmo modo apresentado anteriormente. Para a administração total nos 44 animais levou-se um tempo de 120-150 minutos.

Figura 21. Procedimento da administração intranasal em camundongo acordado usando micropipeta.



A partir do 14^o dia de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de Campo Aberto (CA) e a memória avaliada através do teste de reconhecimento de objetos (TRO) e teste de esquiva-inibitória (TEI) (Figura 20).

4.7.4 Campo aberto

Para aferir se os tratamentos afetaram o sistema locomotor dos animais e consequentemente comprometeram os resultados referentes de cada animal nos posteriores testes comportamentais, foi utilizado o teste de campo aberto descrito por

TOLARDO *et al.* (2010), executado no 18º dia posterior à indução da DA com o STZ. O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 30 x 30 x 30 cm com assoalho dividido em 9 quadrantes iguais (10 x 10 x 10 cm) onde os animais foram avaliados 60 minutos após o tratamento. Os parâmetros comportamentais observados foram avaliados através dos números de cruzamentos (*crossing*) e o número de atividades exploratórias (*rearings*) que foram registrados em sessões de 6 minutos. Os animais permaneceram por mais 4 minutos a partir dos 6 minutos do teste do teste do CA para complementar os 10 minutos total de ambientação.

4.7.5 Teste de reconhecimento objeto

O teste consistiu em uma tarefa baseada em uma tendência natural do animal em explorar (dar preferência) a um objeto novo em relação a um familiar dentro de um ambiente conhecido e esse procedimento foi validado por (IZQUIERDO *et al.*, 1998) e adaptado por (GONCALVES *et al.*, 2012). Esta preferência foi utilizada como indicativo de memória em relação ao objeto familiar. No 18º dia posterior à segunda administração de STZ, os animais foram submetidos ao TCA conforme descrito no item 5.7 necessários para a ambientação e realização do TRO. No 19º dia os animais foram recolocados no aparato com a presença de dois objetos idênticos (objeto A) por um período de 10 minutos, sob sessão treino, e no dia seguinte, 20º dia, os mesmo animais foram submetidos à avaliação da memória de reconhecimento (sessão teste), em que os animais foram expostos novamente ao aparato durante 10 minutos na presença de dois objetos, porém um novo objeto, o objeto B, substituiu um dos antigos objetos (A+B). A memória de reconhecimento foi avaliada comparando o tempo gasto pelo animal explorando cada objeto durante a segunda tentativa. Com o tempo gasto em cada objeto, calcula-se o índice de reconhecimento pela Equação 18:

$$IR = \frac{\text{Tempo B}}{(\text{Tempo A} + \text{Tempo B})}$$

Equação 18

4.7.6 Teste de esquiva inibitória

O aparato utilizado para avaliação da memória emocional aversiva dos animais foi uma caixa automatizada e o protocolo foi descrito por (SOUZA *et al.*, 2002) e (AMOAHA *et al.*, 2015). Os animais foram gentilmente colocados em uma plataforma fórmica de 2,5 cm de altura e 7,0 cm de largura e 25,0 cm de comprimento localizada no lado esquerdo de um aparelho de 50 x 25 x 25 cm, com um piso feito por um calibre

paralelo de 0,1 cm barras de aço inoxidável espaçadas de 1,0 cm de distância. Na sessão de treinamento, a latência para o camundongo colocar com as quatro patas na grade foi medida, imediatamente seguida por um choque de 3, 0 segundos e 0,4 mA. Os camundongos que não desceram por um período de 20 segundos foram gentilmente empurrados da plataforma para o piso. As sessões de teste de retenção, processualmente idênticas às da sessão de treinamento, foram realizadas 24 horas após o treinamento, sem choque e com latência de abaixamento limitada a 180s; ou seja, valores de sessão de teste maiores que 180s foram contados como 180s.

4.7.7 Análise estatística

Para os testes paramétricos, os dados obtidos foram apresentados com medidas seguidas pelos respectivos erros padrão médio (EPM) e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando necessário, foram seguidos de testes de múltiplas comparações a partir dos modelos post hoc de Dunnett e Newman-Keuls, utilizando o software GraphPad®. Para os testes não paramétricos (como o TEI e TRO), foram utilizados os testes *post-hoc* de Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados com medidas seguidas dos intervalos interquartis e foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comportamento de fases dos anfifílicos em água

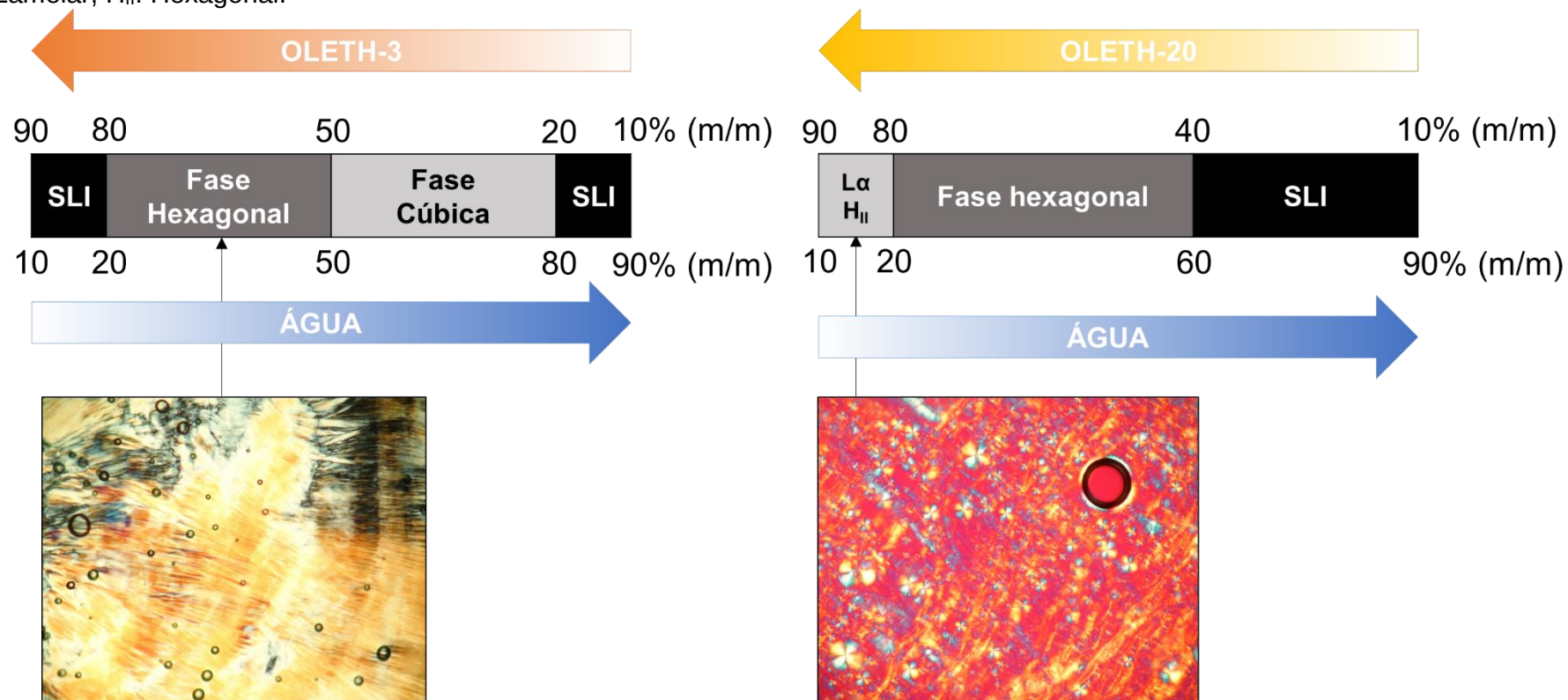
A estratégia utilizada neste estudo foi obter sistemas mucoadesivos explorando a capacidade de diversos anfifílicos em formar mesofases organizadas em contato com fluidos aquosos. Por isso foi investigado o comportamento de fases destes tensoativos em presença de água. A Figura 22 e Figura 23 mostram um esquema ilustrativo do diagrama de fases binário obtido pelas misturas dos anfifílicos com água.

A mistura de O3 com até 20% (m/m) de água formou predominantemente SLI. Acima desta concentração, os sistemas tornaram-se géis e isotrópicos, sendo indicativo de sistemas cúbicos. Concentrações de água entre 20% até 50% (m/m) geraram sistemas hexagonais, conforme mostrado pela MPL na Figura 22. Acima de 50% de água, foram geradas estruturas cúbicas com alta viscosidade e opticamente transparentes. Enfim, a diluição acima de 90% (m/m) com água gerou novamente sistemas líquidos e isotrópicos, sendo indicativo de uma desorganização dos sistemas líquido-cristalinos formados.

Com concentrações de água até 20%, os sistemas mostraram-se como uma mistura de mesofase hexagonal com mesofases lamelares, conforme mostrado por MPL na Figura 22. Entretanto, a adição de água levou a formação de sistemas hexagonais com concentrações de até 60% (m/m). Acima destes valores de água, foi evidenciada a formação de SLI. O diagrama binário com O3 mostrou uma ampla faixa de sistemas líquidos e isotrópicos com concentrações entre 20 e 80% (m/m) de água. Já o anfifílico O20, apesar de formar CLs em contato com uma ampla faixa de concentração de água (entre 20-60%), não foi capaz de exibir uma evolução das estruturas com a diluição aquosa.

Os sistemas compostos com PS mostraram-se como sistemas líquidos e isotrópicos com concentrações de anfifílicos até 60% (m/m), as diluições geraram sistemas hexagonais até 40% (m/m) e após serem diluídas, de lamelares geraram estruturas hexagonais, evidenciadas por campos estriados através da técnica de MLP (Figura 23). Os sistemas formados pelo PS não exibem uma evolução de estruturas com a adição de água, porém são capazes de auto-organizarem com concentrações de até 40% (m/m) de água.

Figura 22. Esquema ilustrativo dos diagramas de fases binários resultantes das misturas de OLETH-3 / água e OLETH-20 / água, além de imagens representativas obtidas por MLP exemplificando os sistemas anisotrópicos obtidos. SLI: Sistema líquido isotrópico; L α : Lamelar; H $_{II}$: Hexagonal.

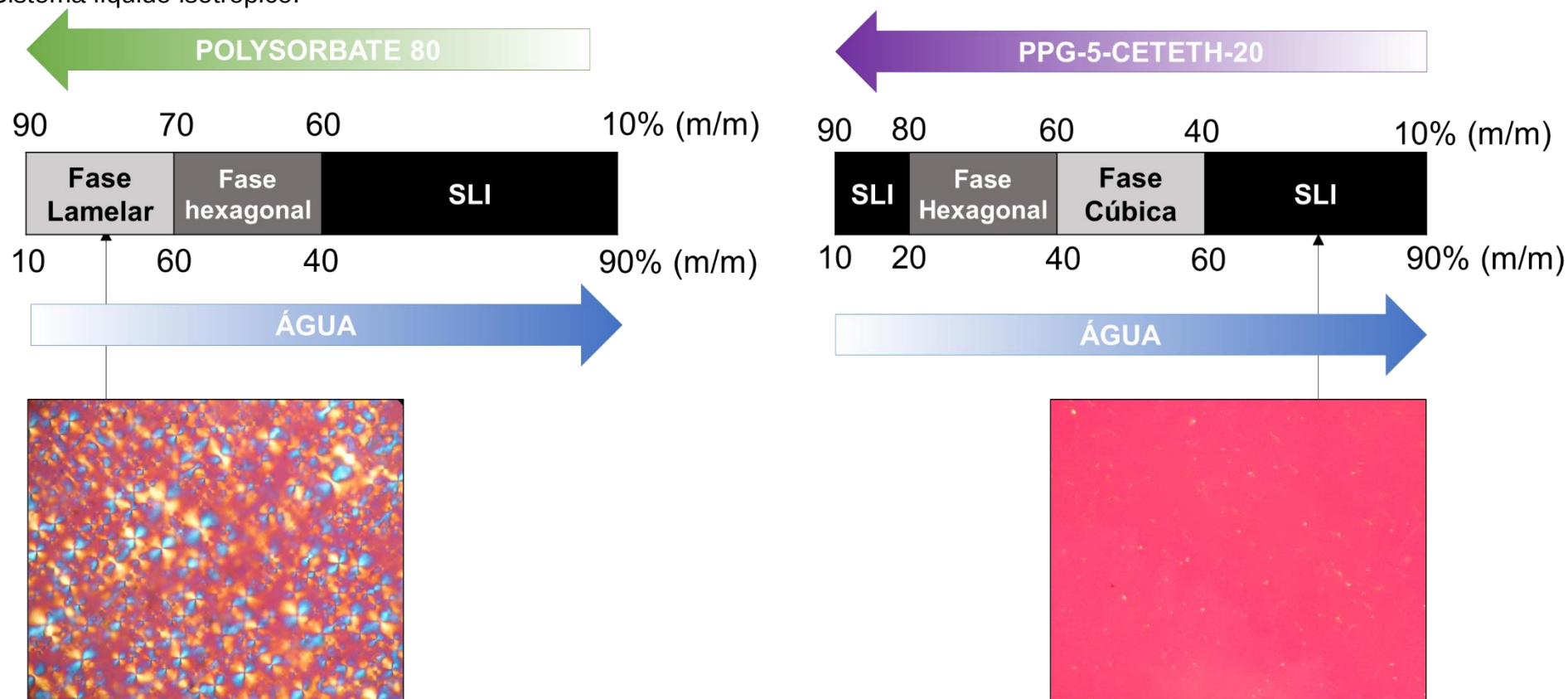


Pode ser observado que o PC em contato com até 20 % (m/m) de água forma sistemas opticamente transparentes, líquidos e isotrópicos classificados como SLI. Acima de 20% (m/m) de água, os sistemas se transformaram na fase hexagonal, constatada pela observação de estrias na MLP. Esta fase possui alta viscosidade, é transparente e tem a aparência de um gel com a adição de até 40 % (m/m) de água. Acima desta quantidade, o sistema mudou para a fase cúbica, que apesar de ser isotrópica, foi identificada pela sua alta viscosidade, maior que da fase hexagonal. Esse tipo de mesofase foi constatada pela observação de campo escuro na MLP, conforme indicado na Figura 23. Enfim, com adição de concentrações de água maiores que 60% (m/m), os sistemas voltaram a ser SLI.

Em geral, o comportamento de fase dos anfifílicos O3, PS e PC em contato com concentrações crescentes de água promove a formação de estruturas cada vez mais organizadas. A diluição aquosa destes anfifílicos promoveu a transição de SLI para a fase hexagonal, seguida pela fase cúbica, exceto para PS, até que uma maior concentração de água desorganizou o sistema que voltou a ser um SLI. Entretanto, com a diluição do O20 não houve aumento da organização dos sistemas independentemente da quantidade de água, pois houve sempre a formação de uma fase hexagonal, até que uma diluição maior ocorreu uma mistura de mesofase lamelar e hexagonal.

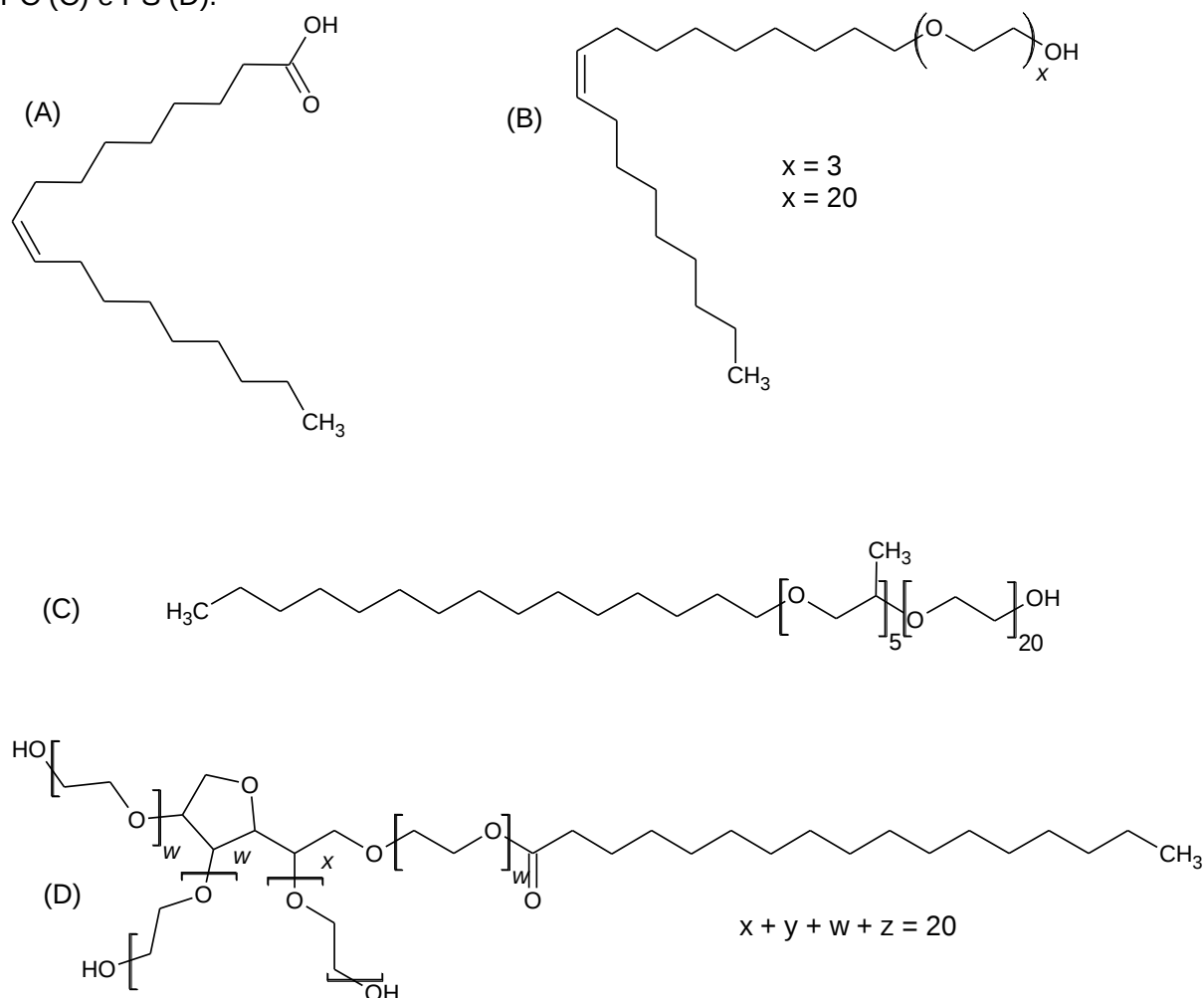
Os anfifílicos podem se organizar e formar estruturas distintas dependendo da sua concentração e sua geometria molecular. A relação entre as cadeias polares e cabeças apolares das moléculas anfifílicas, bem como a dimensão destas, parecem governar o processo de auto-agregação formando as mesofases (MEZZENGA, 2012). Por outro lado, a transição de fases é essencialmente governada pelo preenchimento do espaço confinado entre as interconexões destas estruturas por água mudando a curvatura das cabeças polares gerando estruturas diferenciadas (MALMSTEN, 2007).

Figura 23. Esquema ilustrativo dos diagramas de fases binários resultantes das misturas de POLYSORBATE-80 / água e PPG-5-CETETH-20 / água, além de imagens representativas obtidas por MLP exemplificando os sistemas anisotrópicos obtidos. SLI: Sistema líquido isotrópico.



Para anfifílicos não iônicos com uma única cadeia carbônica, estudados nesse trabalho (Figura 24), a adição de água provoca a aglomeração das moléculas do anfifílico, cujas cabeças polares ficam voltadas para o meio interno aquoso, a fim de obter um estado mínimo de energia livre, formando assim micelas reversas. Com o aumento da água interna, a estrutura micelar se alonga, até que uma quantidade de água promove o empacotamento destas estruturas, formando a fase hexagonal. Com adicionais aumentos de água, o tensoativo não consegue estabilizar a água como fase interna, resultando numa fase mais ordenada como a fase cúbica, cuja interface tem curvatura ao redor tanto da cadeia hidrofóbica como da cabeça polar do tensoativo. Quando a quantidade de água excede a de tensoativo, a primeira passa a ser o meio externo e a parte hidrofóbica do tensoativo passa a se proteger contra o ambiente aquoso, formando micelas normais (CARVALHO, 2012).

Figura 24. Estruturas moleculares do ácido oleico (A), O3 com $x = 3$ ou O20 com $x = 20$ (B); PC (C) e PS (D).



Os sistemas desenvolvidos aqui se mostraram promissores como sistemas percussores de CLs utilizando uma mistura binária de anfifílico e água. Os anfifílicos tiveram um comportamento de organização e estruturação quando acrescidos quantidades crescentes de água, exceto O20 não exibiu um aumento gradual da organização das mesofases em contato com a água. Todavia, os demais anfifílicos estudados mostraram capazes de formar sistemas líquidos isotrópicos que aumentam a viscosidade com a diluição aquosa, porém, a transformação dos SLI em fase hexagonal ou fase cúbica pode provocar a obstrução das vias aéreas, devido à viscosidade elevadas destas fases. Por outro lado, a adição de um terceiro componente nestas misturas binárias a fim de alterar o comportamento de mesofases dos sistemas parece ser uma estratégia interessante. Além do que, a adição de um componente lipofílico, como o ácido oleico foi capaz de modular as mesofases formadas e suas características reológicas em estudos anteriores (CARVALHO, F. C. *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2013b; BERNEGOSSI *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2016).

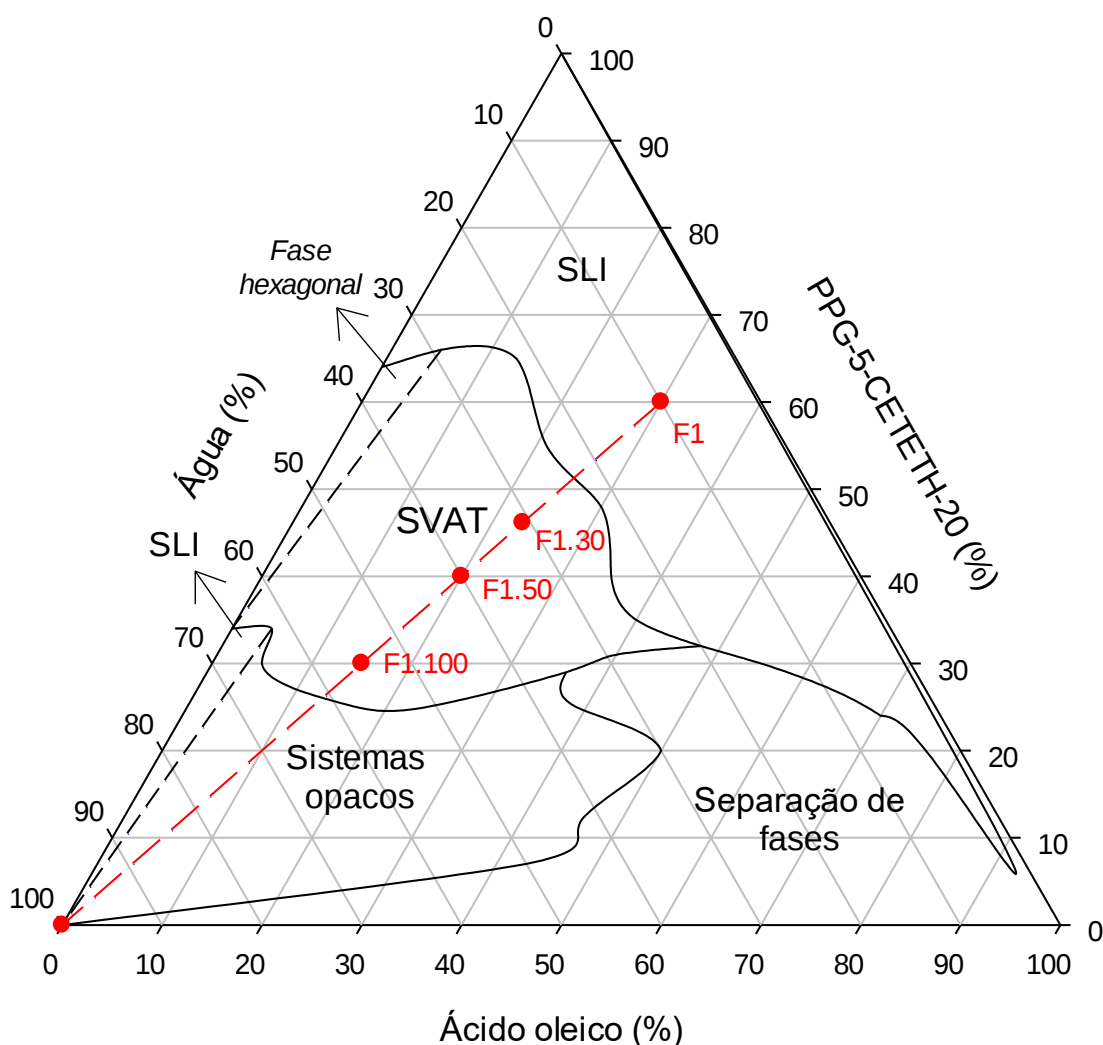
Logo, sistemas compostos por misturas binárias podem não ser adequados para a incorporação de fármacos insolúveis em água. Dessa forma, faz-se necessário a adição de uma fase oleosa com a finalidade de aumentar a dissolução, neste caso do RES, para uma incorporação adequada aos sistemas propostos.

5.2 Construção do diagrama de fases ternário

O diagrama na Figura 25 mostra a combinação de PC, ácido oleico e água. A região SAVT é formada a partir da diluição dos SLIs com 30% de água. A fase hexagonal foi obtida apenas numa região limitada do diagrama, identificada pela observação de estrias na MLP, em que o ácido oleico está abaixo de 5%, anfifílico entre 65 e 40% e água entre 35 e 60%. Uma larga região de SLI foi formada com concentrações de anfifílico variando de 30 a 60% e quantidades de água de até 30%. Essas regiões são isotrópicas e líquidas, sendo característica da formação de micelas ou de um maior ordenamento da matriz levando a formação de MEs (MALMSTEN, M, 2002). Valores de diluição acima de 30% das regiões de SLI geraram uma região de formação de STAV. Estas regiões de STAV suportam até 60% de fase aquosa, entretanto quando o volume de água excede ocorreu a formação de sistemas opacos. A região de sistemas opacos compreende uma quantidade de água acima de 60% e

de baixo conteúdo oleoso, mesmo que com altas quantidades de anfifílico. Por outro lado, quando o volume de fase oleosa aumenta, os sistemas opacos se desestabilizam levando às separações de fases. O mesmo é observado com as regiões de SLI quando o volume de água é maior juntamente com as baixas concentrações de anfifílico, levando a sistemas com altas concentrações de fase oleosa e incapacidade do sistema de formar estruturas.

Figura 25. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PC, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em vermelho mostrando a diluição em FNS.



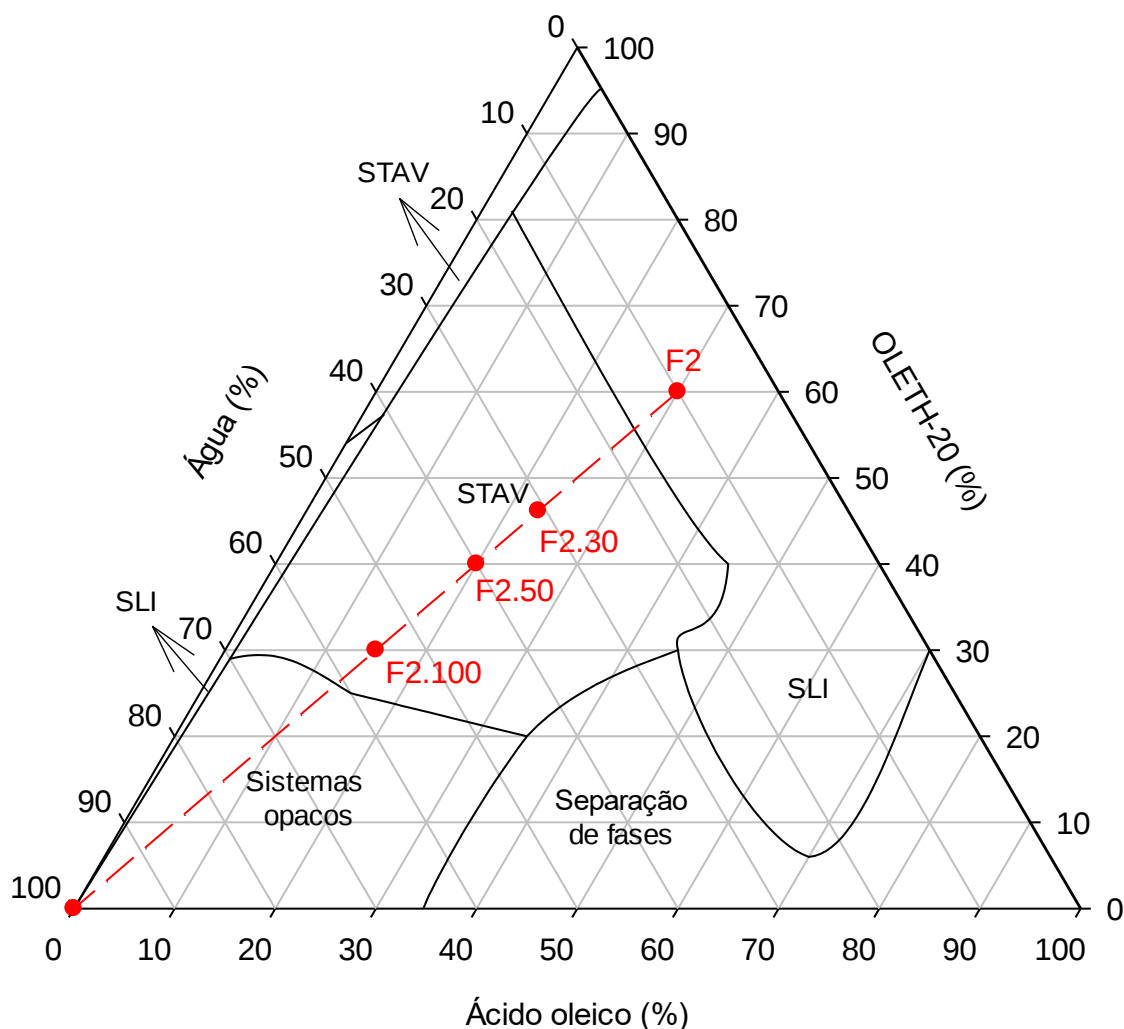
Os sistemas obtidos nas regiões classificadas como SLI são isotrópicos, líquidos, opticamente transparentes e termodinamicamente estáveis. Esses tipos de sistemas podem ser caracterizados por MEs ou sistemas micelares, o que distingue

é o tipo de organização do anfifílico disperso no solvente. Fases micelares são estruturas esferoides formadas apenas por agregados dos anfifílicos (JONES e LEROUX, 1999; ALIABADI e LAVASANIFAR, 2006). Por outro lado, nas MEs o filme interfacial nas gotículas de uma fase oleosa que se protege de um meio externo aquoso, ou gotículas de água que se protegem de um meio externo oleoso (ANTON e VANDAMME, 2011; MCCLEMENTS, 2012).

O diagrama de fases ternário das misturas contendo O20, ácido oleico e água está disponível na Figura 26. O ponto F2 foi a amostra selecionada para caracterização físico-química e F1.30, F1.50 e F1.100 é onde o sistema se localiza após a diluição aquosa de F1 na proporção 30%, 50% e 100% (v/m).

O diagrama mostrou uma larga região de SLT contendo concentrações em torno de 30% do anfifílico com baixas concentrações de água. Com o conteúdo de água crescente, ocorreu uma transição de fase, onde os SLT geraram STAV. A região de STAV engloba uma ampla região do diagrama ternário variando de concentrações de anfifílico numa faixa de 30-80% com diluição aquosa acima de 20%.

Figura 26. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de O-20, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em vermelho mostrando a diluição em FNS.

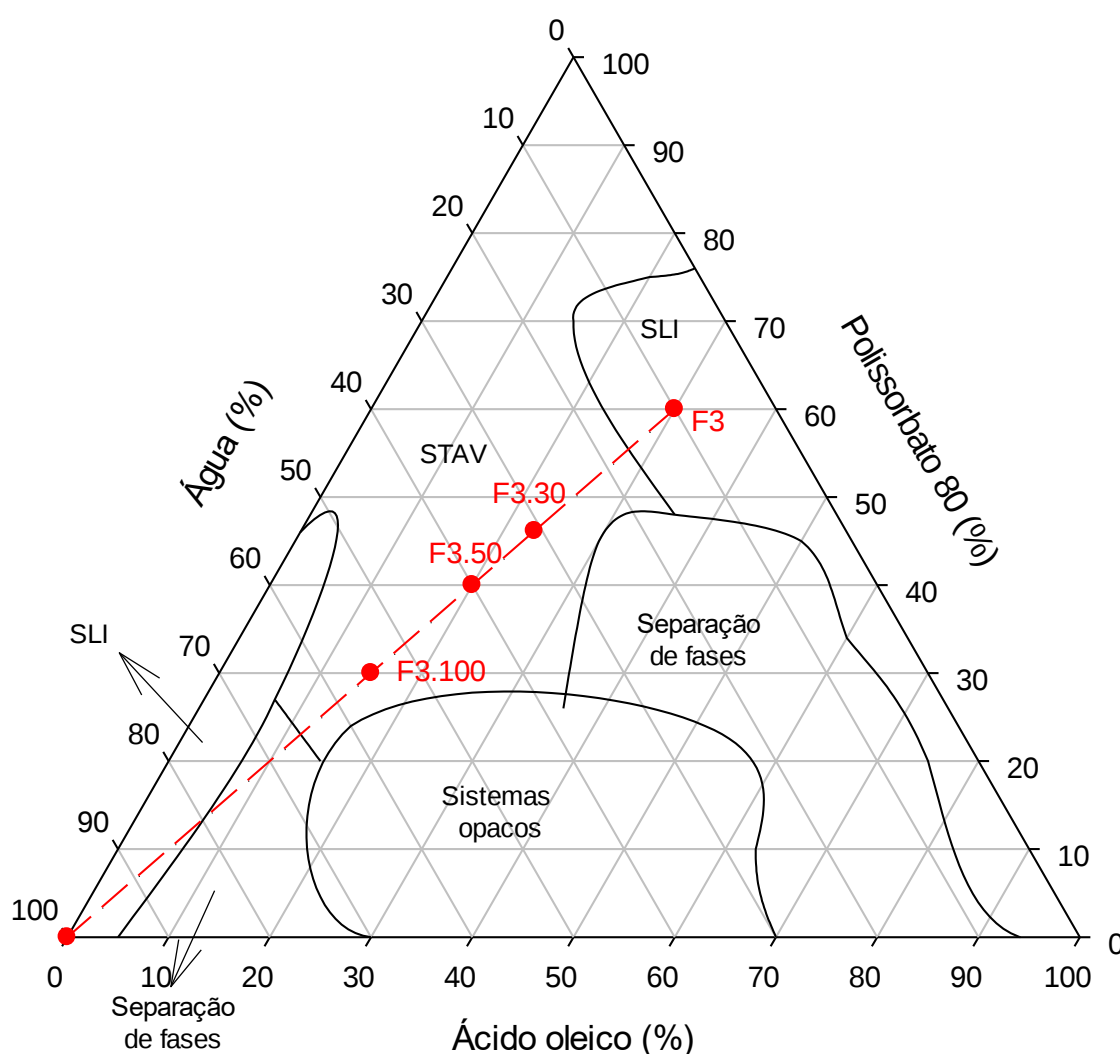


Os SLI também foram formados no vértice esquerdo do diagrama, numa região estreita, quando a diluição aquosa dos SAVTs ultrapassa 70%. Concentrações de fase oleosa de até 35% formaram sistemas opacos, devido à baixa quantidade de anfifílico que não é suficiente para formar estruturas ordenadas. Com o aumento de fase oleosa levou a formação de sistemas instáveis com formação de separação das fases, fenômeno indicativo de instabilidade devido à grande proporção de fase oleosa no sistema.

Para a mistura ternária contendo PS como anfifílico pode ser observado uma região de SLI ao lado direito do diagrama. Altas concentrações de PS geraram STAV, no vértice superior do diagrama, que com o aumento de água levaram a formação de

STAV. Com quantidades de anfifílicos na faixa de 50-70% e quantidades de água em até 20% contribuíram para a formação de SLI; entretanto, a adição crescente de água gera STAV. Os STAV se mantêm organizados com até 70% de água, sendo que a diluição crescente gerou separação de fases.

Figura 27. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PS, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em vermelho mostrando a diluição em FNS.

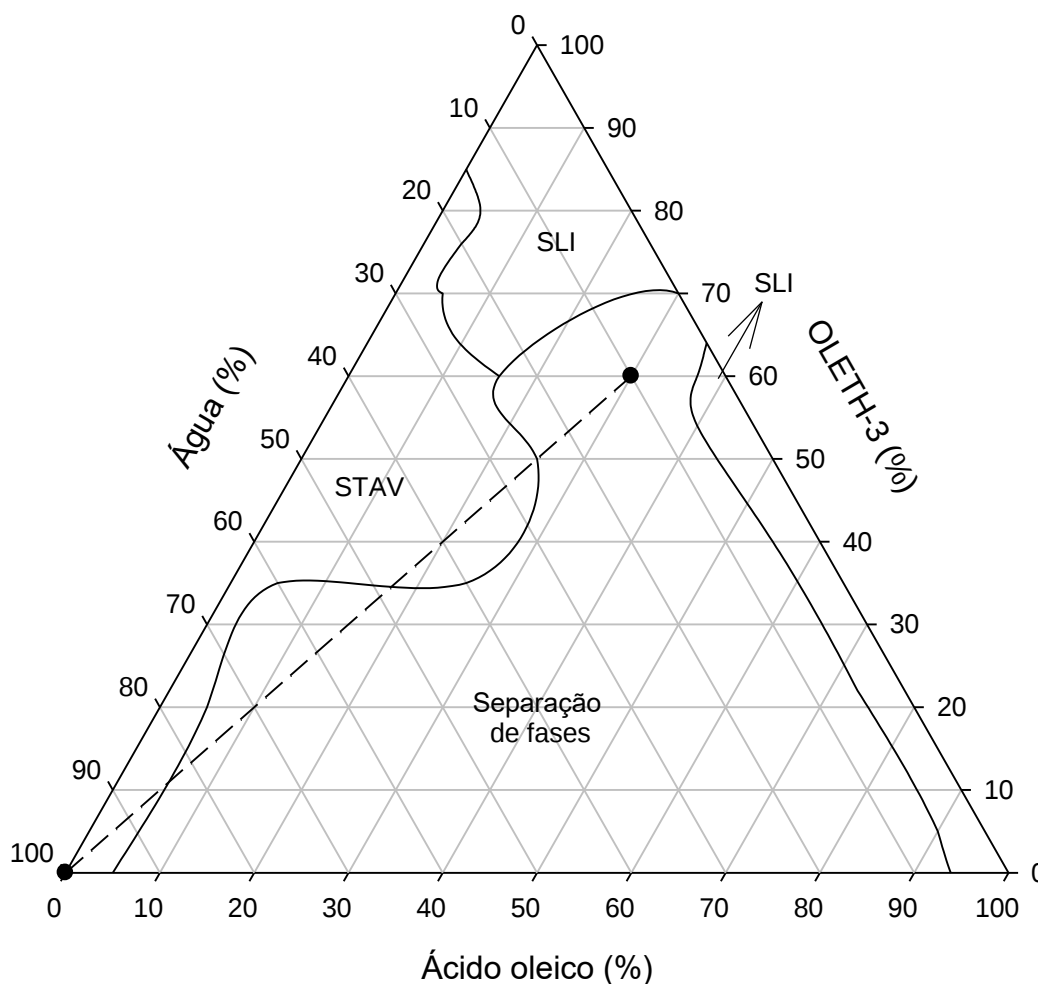


Por outro lado, altas concentrações de anfifílico geraram regiões de STAV que a partir do acréscimo de água gera uma pequena região de SLI ao lado esquerdo. Devido à alta quantidade de água presente, os sistemas gerados podem ser sistemas micelares ou MEs do tipo normais. Ao lado direito se verifica ao contrário, a quantidade de água até 10%, gera sistemas SLI com baixas concentrações de ácido oleico, que

com o aumento deste leva a formação de região de STAV. Uma região com sistemas opacos foi formada com concentrações de até 30% de anfifílico e concentração de fase oleosa de 30-70%. Porém, valores abaixo de 30% ou 70% geraram regiões de separação de fase.

O sistema obtido por O3, ácido oleico e água está mostrado na Figura 28. No diagrama, observa-se uma ampla região de separação de fase. No vértice superior com concentrações de anfifílico acima de 80% e 15% de conteúdo aquoso gerou SLI. Devido às altas concentrações de anfifílico pode ter contribuído para a formação de micelas ou MEs. Quando a região SLI é diluída, ocorre a transição de fase para STAV. Esse comportamento pode ser explicado pela molécula de O3 (Figura 24) que contém 3 unidades de OE na cabeça polar. Mesmo em altas concentrações a água é capaz de solvatar a cabeça polar originando estas estruturas. Quando a concentração de anfifílico diminui, variando até 60%, e com grandes concentrações de óleo favoreceu a formação de SLI do lado direito do diagrama. Esse fenômeno pode ser explicado devido às altas concentrações de óleo que interagem com as cadeias carbônicas do anfifílico e a água em pequena quantidade presente nessas regiões que solvata a cabeça polar do anfifílico favorecendo a formação de micelas ou MEs A/O.

Figura 28. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de O3, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; Linha em preto mostrando a região de diluição.



Comparando a região de separação de fases no diagrama ternário de O3, ácido oleico e água, é possível observar que a região é extensivamente maior quando comparada com o diagrama obtido pelo anfifílico O20. De fato, o arranjo molecular apresentado por essa mesma classe de anfifílico tem uma influência na organização das estruturas desses sistemas. O diagrama da Figura 28 não apresentou nenhuma região de sistemas opacos, em contrapartida o diagrama apresentado pela Figura 26 apresenta essas regiões que são indicativas de sistemas emulsionados. O caráter hidrofílico e hidrofóbico desses dois tipos de anfifílicos tem uma influência sobre a emulsificação ou regiões de separação de fase. O O3 apresenta um valor de EHL de 6,6 enquanto o O20 apresenta valor de 15,5, sendo que um valor baixo de EHL apresenta baixa dispersabilidade em água, mas apresentam a capacidade de formar

emulsões A/O (EHL = 4 – 6) ou como agentes molhantes (6 – 8) (GRIFFIN, 1949; 1954). Regiões menores de separação de fase apresentadas pelo O2O podem estar implicadas com uma interação maior das moléculas de água com as 20 unidades de OE presente na parte polar que leva a uma melhor estabilidade termodinâmica.

Assim, as misturas binárias formaram uma ampla região de separação de fases na área de diluição (60% de tensoativo) inviabilizando seu uso como precursor de CLs como proposto neste trabalho. Alternativamente, é possível obter sistemas SLI e STAV que podem ser aplicadas com potencial para outras vias de administração, como a via tópica cutânea, por exemplo. Mas, não são adequadas para a administração intranasal, já que na região inicial do sistema e da diluição se mostram como uma região de separação de fases. Por outro lado, áreas com concentrações acima de 70% podem ser exploradas para este propósito, já que apresenta uma região de SLI, que com o aumento de água leva à uma região de STAV.

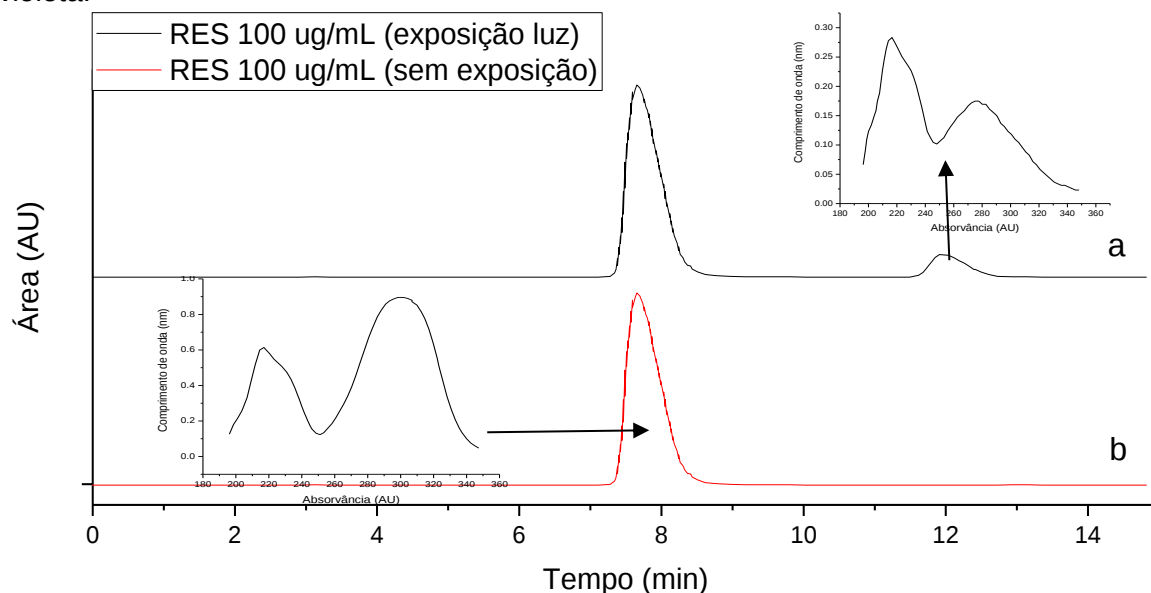
Um dos grandes desafios da pesquisa de novos sistemas de liberação nanoestruturados é a possibilidade de escalonamento industrial obtendo as mesmas características como obtido em estudos de bancadas ou piloto (CARVALHO, 2012). Para a produção dos sistemas obtidos neste trabalho não é necessária a utilização de equipamentos complexos e nem de insumos farmacêuticos onerosos, logo, é extremamente viável sua produção em escala industrial.

5.3 Validação do método analítico por CLAE

Um método foi desenvolvido para análise qualitativa do RES. O método mostrou uma separação satisfatória do analito com boa resolução dentro de um curto espaço de tempo, utilizando um gradiente isocrático. O cromatograma mostrou um pico de retenção em 7,5 minutos para o RES (Figura 29) gerando um tempo de análise de 15 minutos. Entretanto, quando a solução de RES foi exposta a luz solar por cerca de 6 horas, foi evidenciada a conversão isomérica de *cis* para *trans*. Os espectros de absorção no UV mostram picos de absorção diferentes para cada composto nos diferentes tempos de retenção (7,5 e ~12 minutos). O primeiro pico de retenção mostrou um espectro de absorção de máxima de 218 nm e 306 nm, sendo característico do isomero *trans*; para o segundo pico foi mostrando absorções máximas em 216 nm e em 275 nm, sendo reportado em algumas literaturas como o isomero *cis* (TRELA e WATERHOUSE, 1996; CAMONT *et al.*, 2009; NOUR *et al.*,

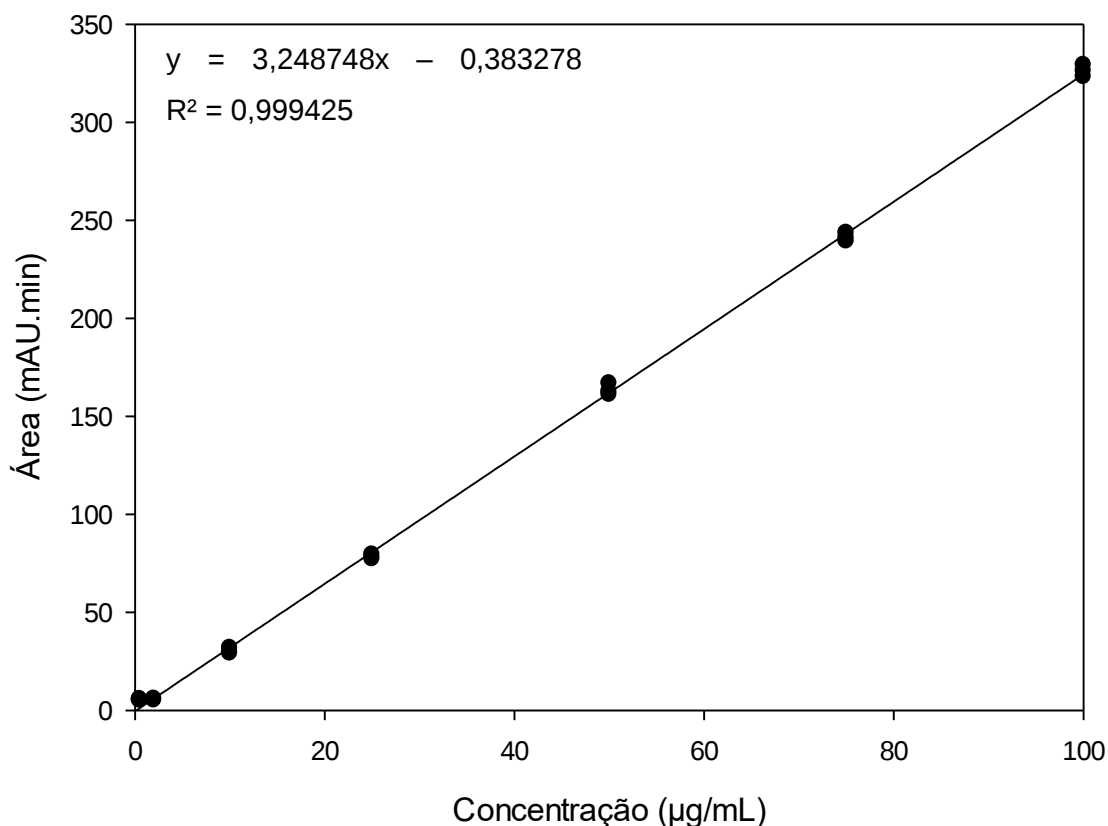
2012; SILVA *et al.*, 2017). Estes resultados mostram-se promissores para a aplicação do método em estudos de estabilidade das formulações.

Figura 29. Perfil cromatográfico do RES na concentração de 100 ug/mL com ou sem exposição à luz (a e b, respectivamente) e seus respectivos espectros de absorção no ultravioleta.



A curva analítica para o RES provou ser linear ao longo do intervalo proposto (0,5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), como mostrado pelos coeficientes de regressão linear (r^2) de 0,9994 para o composto estudado, demonstrando um ajuste aceitável de dados para a linha de regressão ($y = 3,248748x - 0,383278$), conforme mostrado na Figura 30.

Figura 30. Curva de calibração obtida em função da concentração de RES pela área do pico cromatográfico.



A análise estatística de regressão linear obtida a partir de um F_{calc} ($3,36 \times 10^4$) em comparação com F_{tab} ($2,56 \times 10^{-34}$) demonstra a significância estatística do método de linearidade ($p < 0,05$) (Tabela 1). A sensibilidade do método para o composto foi expressa pela inclinação da curva analítica, e pelos valores LD de $387,0 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente. O valor de LQ foi de $0,5 \text{ µg mL}^{-1}$ ou 500 ng mL^{-1} , sendo o primeiro ponto da curva analítica.

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para regressão linear simples.

Parâmetro	gl	SQ	MQ	Fcal	Ftab
Regressão	1	$2,70 \times 10^4$	$2,70 \times 10^4$	$3,36 \times 10^4$	$2,56 \times 10^{-34}$
Resíduo	19	15,3	0,81		
Total	20	$2,70 \times 10^4$			

Nota: gl: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; F cal: valor de F calculado; Ftab: valor de F tabelado.

A precisão do padrão na amostra foi avaliada em três níveis: 25, 50 e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a RES, com recuperações entre 97 – 101%. O método mostrou boa precisão em concentração baixa, média e de alto nível para o analito, dentro da linearidade do método. Um valor de DPR < 3,0% foi observado em todas as determinações do teste de recuperação. Tanto as corridas intra- e inter-dia apresentaram valores de DPR menores que 3,0%. Estes resultados mostram a alta precisão do método para a determinação do método de análise (Tabela 2).

Tabela 2. Precisão intra-corrida e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de RES.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		DPR (%)		Exatidão (%)	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
25,0	24,60 $\pm$ 0,59	24,10 $\pm$ 0,356	2,41	1,48	98,42 $\pm$ 2,37	96,37 $\pm$ 1,43
50,0	48,57 $\pm$ 0,97	50,37 $\pm$ 0,92	2,0	1,84	97,15 $\pm$ 1,95	100,75 $\pm$ 1,85
75,0	75,41 $\pm$ 1,85	74,35 $\pm$ 0,67	2,46	0,91	100,56 $\pm$ 2,48	99,05 $\pm$ 0,90

^a Média e desvio padrão (n = 3)

O método desenvolvido se mostrou linear, específico, preciso e exato para a determinação de RES nos ensaios de performance, como na liberação e permeação em mucosa nasal, além de ser usado nos estudos de solubilidade do RES.

5.4 Estudos de solubilidade do RES

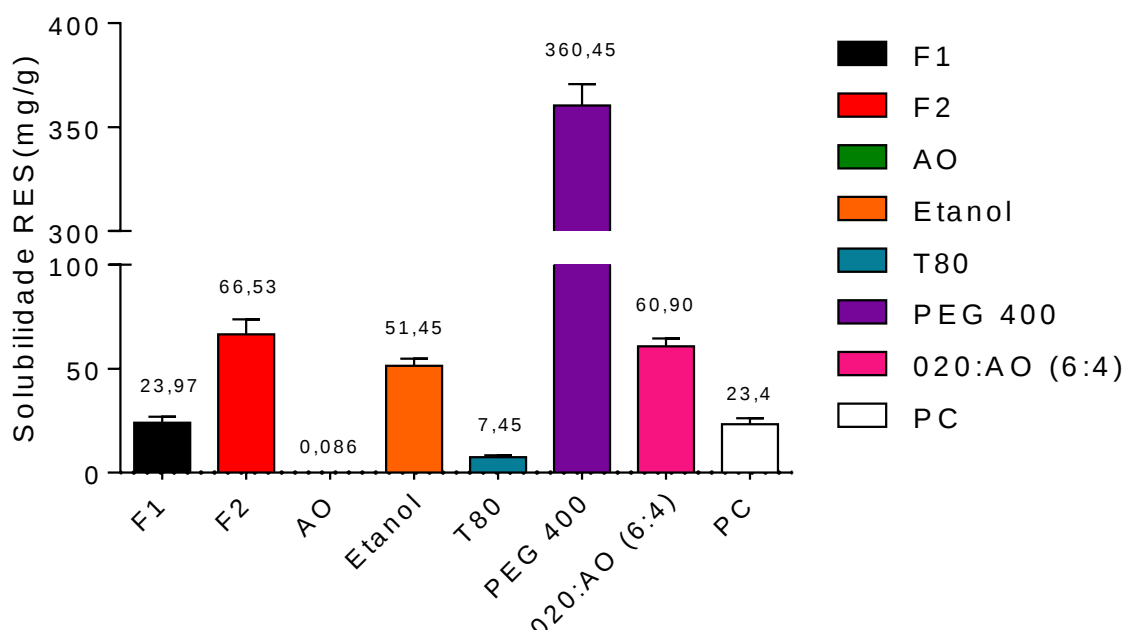
A quantidade máxima de RES que pode ser incorporada nos sistemas em estudo foi investigada adicionando-se nos mesmos 3 g do fármaco. Após a homogeneização, eles foram centrifugados e o RES em excesso foi precipitado. O sobrenadante contendo o RES solubilizado foi devidamente diluído na fase móvel e quantificado por CLAE.

O RES foi incorporado nas formulações F1, F2, e também nos componentes isolados (PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico). A incorporação do RES no OLETH-20 não foi realizada, pois o processo de homogeneização fica inviável devido a sua consistência pastosa. Então o O20 foi fundido com óleo na mesma proporção das

formulações (6:3) e devido a sua consistência líquida procedeu-se com o ensaio de solubilidade.

Os sistemas contendo RES foram nomeados como F1R e F2R. A Figura 31 mostra um gráfico comparativo das quantidades máximas de RES incorporadas em cada amostra.

Figura 31. Concentração (mg/g) solubilizada do RES nas formulações e excipientes isolados.



Os resultados mostram que a solubilidade do RES no tensoativo O20 é maior que em água, já que incorporou em média 95 mg/g do fármaco. O ácido oleico incorporou menos de 90 µg/g de RES, indicando que o RES foi insolúvel nessa fase oleosa. Assim, os sistemas F1 e F2 incorporam quantidades distintas de RES e devido a sua insolubilidade no ácido oleico, este parece que não favoreceu uma solubilização maior. Nos componentes isoladas, os dados de solubilidade mostraram que o polissorbato 80 (T80) solubilizou 7 mg/g de RES, além disso o PEG 400 alcançou valores próximos de 450 mg/g de RES. Este comportamento sugere que o número de etoxilações favorece a solubilidade do RES. Quando se compara a solubilidade do RES em O20 e PC, evidencia-se que o O20 solubilizou cerca de 3 vezes mais RES do que o PC.

O volume máximo de formulação que é possível administrar via nasal é de 300 µL (HENKIN, 2011; ARMSTRONG *et al.*, 2014). Assim, o sistema de liberação para ser administrado via nasal tem que apresentar uma boa capacidade de incorporação

do fármaco (ILLUM, 2002; 2003; ILLUM, 2004). Isto permite a administração da dose num volume pequeno de formulação. Sob este aspecto, ambos os sistemas desenvolvidos oferecem grande vantagem para administração nasal do RES.

5.5 Seleção dos sistemas para caracterização físico-química

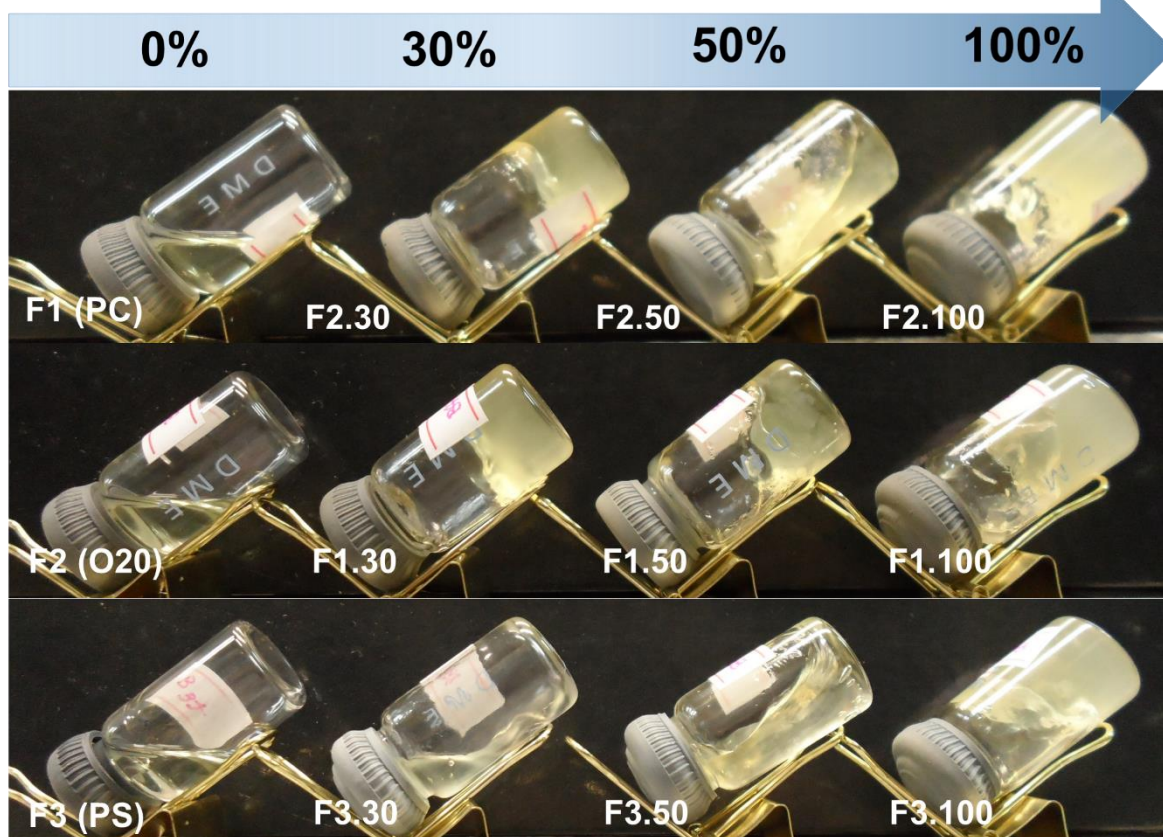
Sistemas precursores de mesofases líquido-cristalinas podem ser definidos como sistemas de baixa viscosidade, que em contato com um fluído biológico, podem alterar a sua mesofase, ocorrendo uma transição, gerando estruturas mais organizadas e aumento a viscosidade (CARVALHO *et al.*, 2013b). Sistemas muito viscosos podem sofrer dificuldade para serem administrados através da mucosa (CARVALHO, F. C. *et al.*, 2010), e sistemas mais fluídos podem ser administrados mais facilmente na mucosa nasal (CARVALHO, F. C. *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2013b), também reportado para a cavidade bucal (BRUSCHI *et al.*, 2007; BRUSCHI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2014; BERNEGOSI *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016) e na mucosa vaginal (RAMOS *et al.*, 2015; SALMAZI *et al.*, 2015). Sistemas mucoadesivos com baixa viscosidade são interessantes para uma maior espalhabilidade do sistema ao longo da mucosa, e o aumento da viscosidade pode resultar num maior tempo de residência da forma farmacêutica no local da aplicação (BRUSCHI, 2015).

Desse modo, a escolha racional para os sistemas contendo PC, PS e O3 com ácido oleico / água são aquelas que formaram uma ampla região de SLI. Para a escolha do ponto inicial, considerou-se a mínima concentração do anfifílico que não fosse próximo às regiões de sistemas opacos ou de separação de fases. Além disso, foi considerada a escolha de uma linha de diluição que abrangesse amplamente a região SAVT, para o sistema permanecer na estrutura líquido-cristalina numa faixa de diluição aquosa maior. Todos os diagramas propostos mostram uma formulação precursora com a diluição, nas seguintes proporções: 60% de anfifílico, 30% de ácido oleico e 10% de água. A Figura 26, Figura 27 e Figura 25 mostram que quando os sistemas compostos por O20, PS e PC são diluídos (linha de diluição) promove a formação de um STAV, logo, os pontos precursores de CLs se mostram com viscosidade mais elevada, devido à organização destes sistemas.

Para simular o comportamento de fases dos sistemas na cavidade nasal, eles foram diluídos com FNS em proporções que variam de 30% até 100% e observados

macroscopicamente e por MLP. A Figura 32 evidencia a estruturação e mudança da viscosidade dos sistemas quando em contato com o FNS.

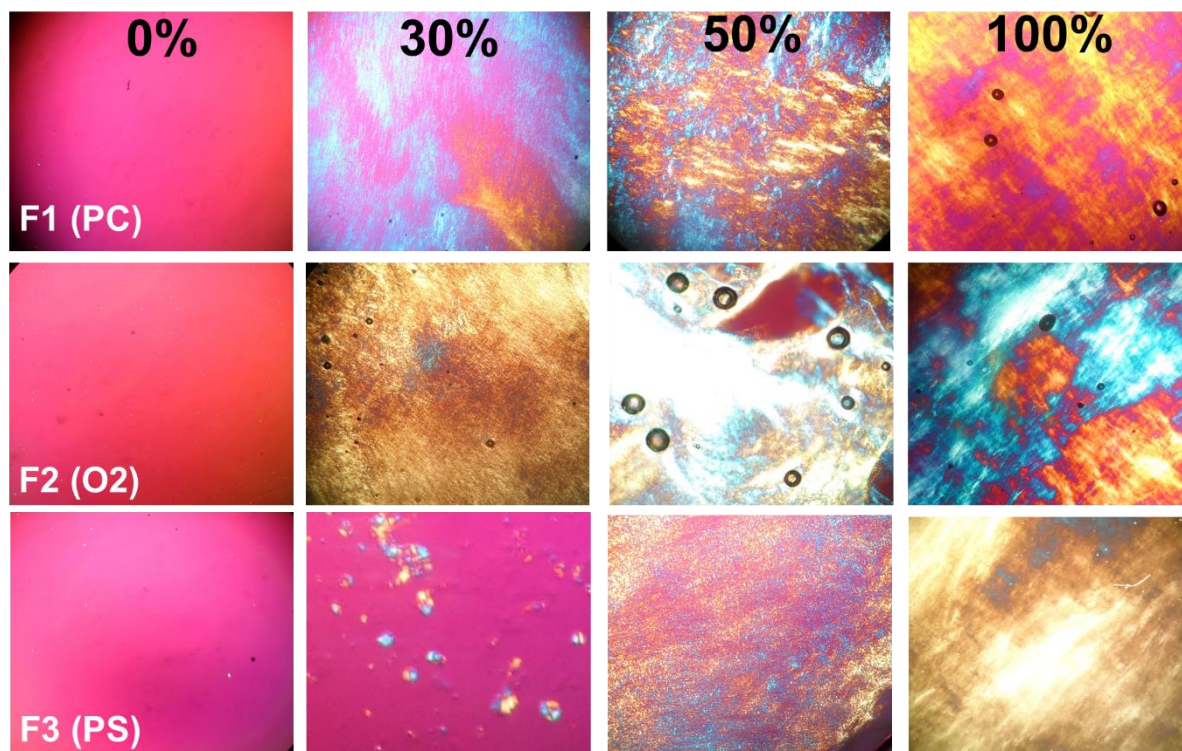
Figura 32. Aspecto visual dos sistemas precursores antes da administração nasal e a formação dos sistemas por meio do contato com o muco simulando após a administração.



As MLP corroboram com a mesofase formada e estão mostradas na Figura 33. Todos os sistemas iniciais se mostraram por campo escuro e sendo caracterizadas como MEs. A partir da primeira diluição em 30% de FNS, os sistemas mostraram viscosos, exceto o F2.30 (Figura 32), formado por PS, que se mostrou com propriedades viscoelásticas. Já a mesofase caracterizada por MPL mostrou a presença de cruzes de Malta indicativo de mesofase lamelar. A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planas de bicamadas de anfífilas separadas por camadas de solvente, formando rede unidimensional. Devido ao baixo ordenamento da estrutura, esse sistema geralmente apresenta-se como líquido viscoso (FORMARIZ *et al.*, 2005). Com o aumento de FNS acrescentado ao sistema evidenciou formulações mais viscosas devido à transição para uma fase hexagonal. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicos e sua organização estrutural resulta em

campos de visualização característicos, como as cruzes de Malta no caso da fase lamelar ou estrias no caso da fase hexagonal (GOODBY, 1998).

Figura 33 – Imagens obtidas por MLP das formulações F1, F2 e F3, e de suas diluições de 30%, 50% e 100% em FNS, resultando nas amostras diluídas.



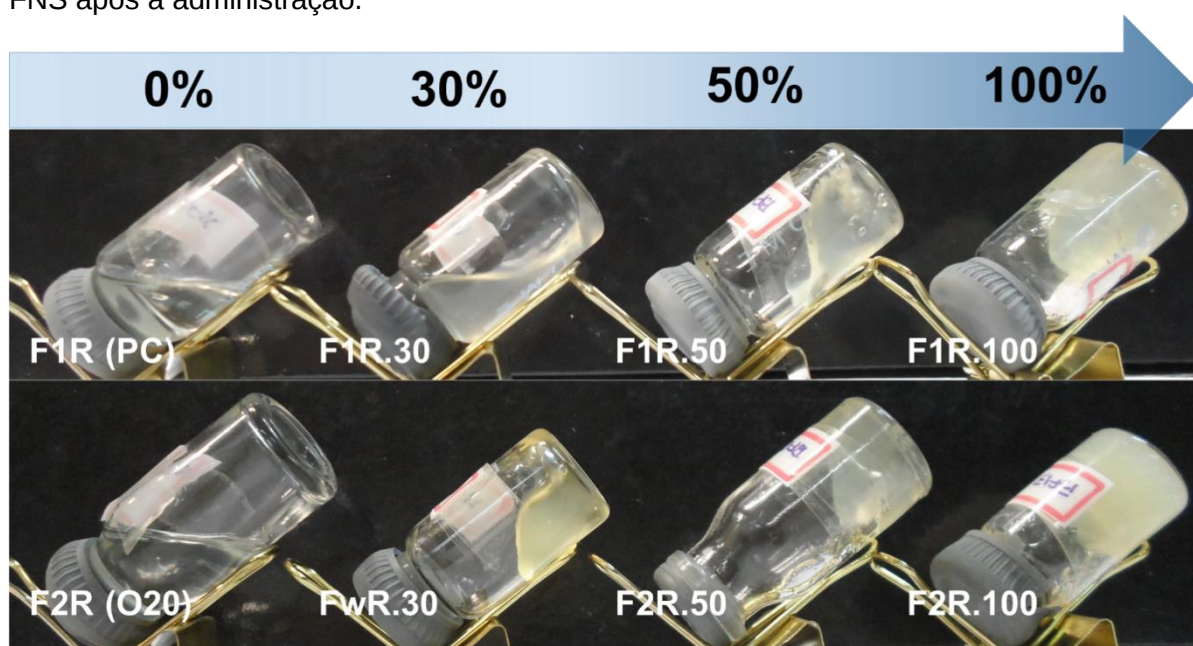
Os sistemas formados por O20 e PC são inicialmente líquidos isotrópicos e transparentes que quando diluídos em FNS geram sistemas viscosos em todas as diluições, com exceção da F3.50 que fica menos viscosa após um tempo de cedência com o frasco invertido, mas retorna a sua viscosidade não tendo um fluxo completo no frasco. Sistemas formados por O20 e PC, como anfifílico, mostraram pela MPL texturas indicativas de mesofase hexagonal e aparência de um gel (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2002; GUO *et al.*, 2010).

Esse comportamento de mudança de viscosidade é interessante para sistemas de CLs, onde se apresentam na forma líquida, e com a incorporação de FNS tornam-se mais viscosos (FEHÉR e ERÖS, 2005; MALMSTEN, 2007). A transição de mesofase pela adição de um solvente é fundamentada no fato de que a água leva a solvatação da cabeça polar do tensoativo, aumentando a sua curvatura e o volume da região polar, gerando estruturas hexagonais ou cúbicas por causa do maior empacotamento (MALMSTEN, M, 2002; MEZZENGA, 2012).

5.6 Incorporação do resveratrol nas formulações

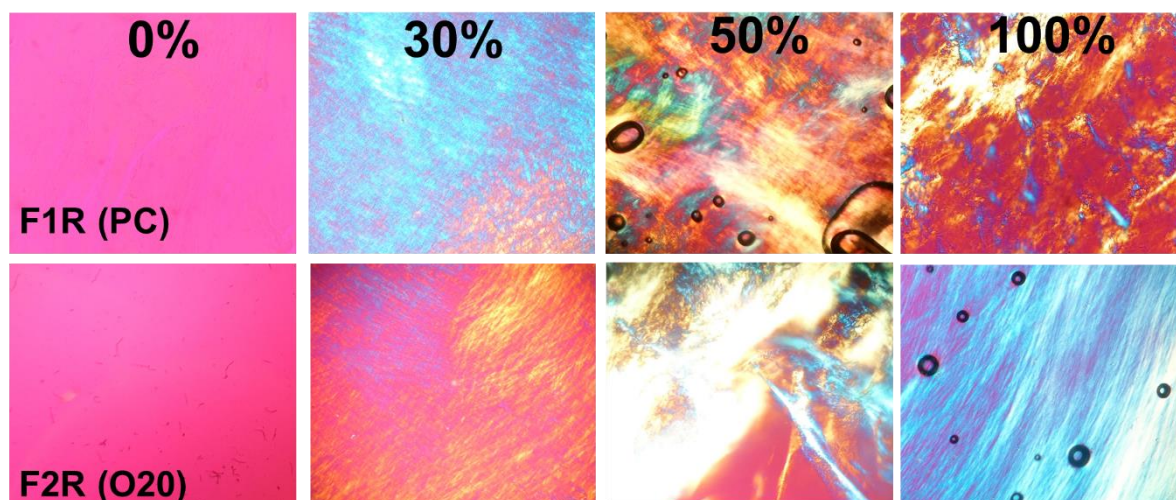
O RES foi incorporado nas formulações na concentração de 5 mg/g e o potencial precursor foi inquirido. A Figura 34 mostra o aspecto visual macroscópico das formulações após a diluição com FNS. É observado que as formulações visualmente aumentam a viscosidade após a incorporação no FNS.

Figura 34. Aspecto visual dos sistemas prercursores, contendo RES na concentração de 5 mg/g, antes da administração nasal e a formação dos sistemas por meio do contato com o FNS após a administração.



A Figura 35 mostra mudanças no perfil de desvio da luz, em que os sistemas precursores são isotrópicos e que na medida em que o FNS é incorporado nas formulações obtêm-se características anisotrópicas. O arranjo hexagonal apresenta um padrão típico na MPL sendo caracterizado por campo estriado, pois os agregados de tensoativo estão organizados em cilindros.

Figura 35 – Imagens obtidas por MLP das formulações contendo resveratrol e de suas diluições de 30%, 50% e 100% em FNS, resultando nas amostras diluídas.



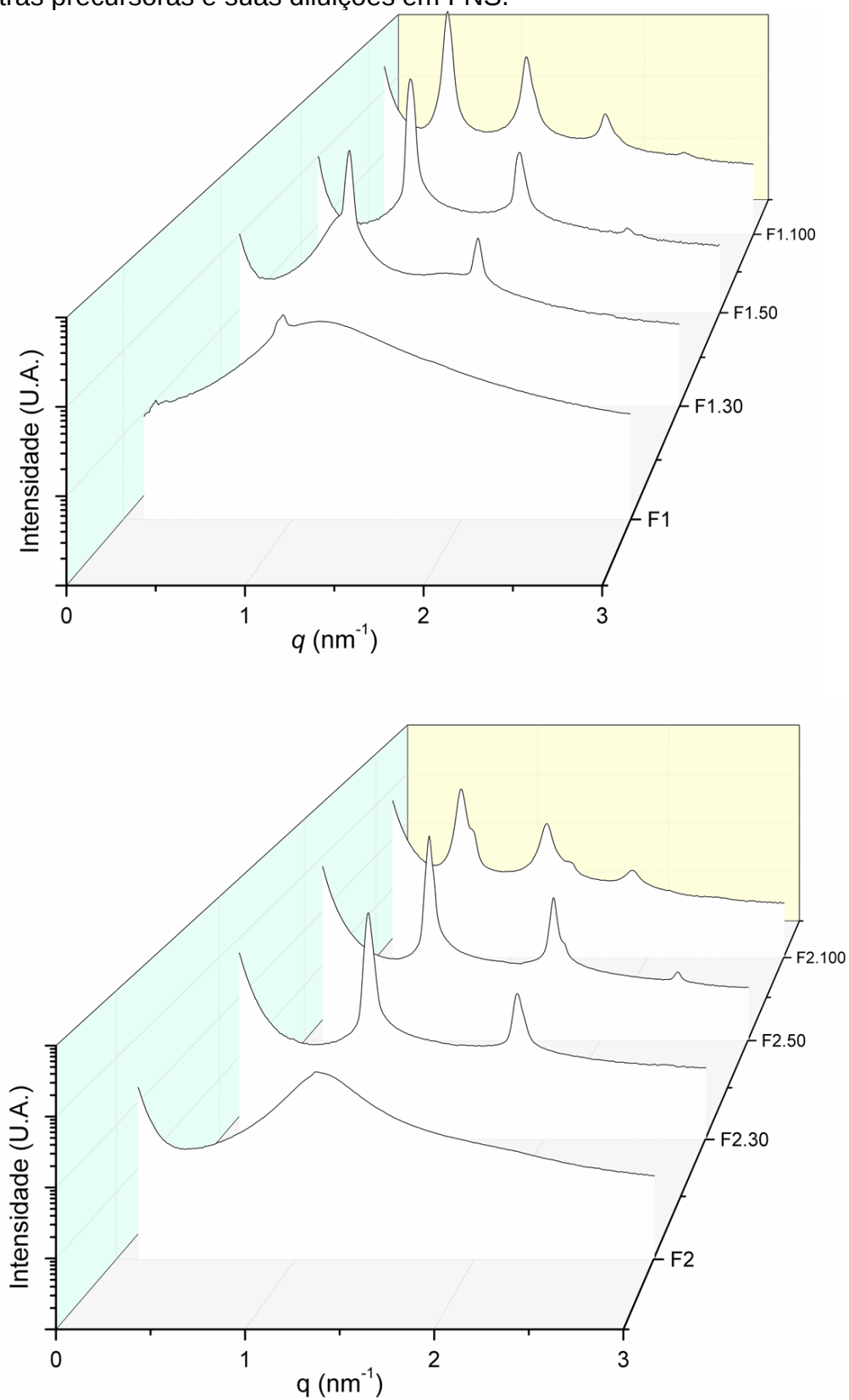
A incorporação de um quarto componente, no caso o RES, não foi capaz de alterar as propriedades físico-químicas dos sistemas aqui desenvolvidos. Os sistemas contendo RES obtiveram as mesmas capacidades de transição de mesofase quando comparado aos sistemas não carregados. Além do mais, a MPL evidenciou a formação de mesofase hexagonal após a diluição em FNS, o que contribuiu para a proposta de geleificação *in situ*.

5.7 Espalhamento de Raio-X à Baixo Ângulo (SAXS)

A caracterização das formulações através do SAXS foi feita através das curvas de intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q). Com as curvas foi possível avaliar através da correlação espacial entre os objetos espalhadores, as nanoestruturas dos sistemas em que se varia a proporção de fase aquosa.

Na Figura 36 para as amostras precursoras (F1 e F2) observa-se a presença de um pico alargado, característico de sistemas micelares e/ou microemulsionados. Estes dados corroboram com a MPL, que evidenciou campo escuro característico de sistemas isotrópico. Entretanto, para a formulação F1 pode-se notar a presença de um pico sem periodicidade típico de um arranjo mais organizado, podendo assim indicar o começo de uma organização do sistema localizado em uma região de transição de fases.

Figura 36. Difratogramas do espalhamento da raio-X à baixo ângulo (SAXS) das amostras precursoras e suas diluições em FNS.



Quando as formulações são diluídas é observado periodicidades entre os picos, porém o estreitamento dos picos é observado para as amostras contendo PC, uma vez que quando diluídas com 30% de FNS mostra uma transição de mesofase microemulsionada juntamente com um pico de maior intensidade. Já para diluição de 50% e 100% estes picos são bem estreitos, o que indica um maior nível de organização desses sistemas. Já para o sistema contendo O20, são observados picos bem definidos para a diluição de 30 e 50% de FNS. Mas, quando diluída para 100% com FNS, as curvas de SAXS mostram sobreposições de picos indicativo de mistura mesofásica.

A Tabela 3 mostra os valores de espalhamento do valor q em função das amostras precursoras e diluídas em FNS. É notável observar que há uma diminuição dos valores de q , tal qual é correlacionado com o aumento do objeto espalhado. De forma que a adição de água nos sistemas exibe uma tendência a aumentar o tamanho do objeto espalhado, em outras palavras, o volume de fase aquosa compartimentalizado nos sistemas está aumentado.

Tabela 3. Valores de espalhamento do vetor q (nm^{-1}) das amostras precursoras e suas diluições em FNS.

Amostras	Espalhamento do vetor q (nm^{-1})				
	q1	q2	q3	q4	q5
F1	-	-	-	-	-
F1-30	0.835	1.682	-	-	-
F1-50	0.783	1.565	2.340	-	-
F1-100	0.659	1.227	1.847	2.489	-
F2	-	-	-	-	-
F2-30	0.922	1.839	-	-	-
F2-50	0.843	1.682	-	-	-
F2-100	0.639	0.7098	1.259	1.431	1.900

Em geral, para sistemas líquido-cristalinos, a posição dos picos no gráfico $I(q)$ pode ser usada para identificar a nanoestrutura de fase (grupo de espaço cristalográfico) e dimensões da célula unitária. O grupo espacial cristalográfico é derivado combinando as posições relativas (em q) entre os picos de Bragg medidos para diferentes mesofases (MEZZENGA, 2012). A Tabela 4 apresenta os dados experimentais dos espaçadores estabelecidos para sistemas líquidos cristalinos liotrópicos.

Tabela 4. Taxa de espaçamento de pico de Bragg e Índices de Miller (h, k, l) para fase lamelar (L_α), hexagonal ($H_{I/II}$), cúbica face de diamante ($Pn3m$), cúbica primitiva ($Im3m$) e cúbica giróide ($Ia3d$).

	1	$\sqrt{2}$	$\sqrt{3}$	$\sqrt{4}$	$\sqrt{6}$	$\sqrt{7}$	$\sqrt{8}$	$\sqrt{9}$
L_α	110	—	—	220	—	—	—	300
$H_{I/II}$	10	—	11	20	—	21	—	—
$Pn3m$	—	110	111	200	211	—	220	221
$Im3m$	—	110	110	200	211	—	220	—
$Ia3d$	—	—	—	—	211	—	220	—

Adaptado para o português de: MEZZENGA (2012)

A análise dos difratogramas das amostras precursoras e diluídas em FNS forneceu as razões entre as distâncias interplanares e permitiu a identificação da fase líquido-cristalina conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Razões entre as distâncias interplanares, parâmetros de rede calculados e tipo de mesofase identificadas para as amostras.

	Razões entre as distâncias interplanares (d/d)					Parâmetro de rede (nm)		Mesofase
	d1	d2	d3	d4	d5	d	a	
F1	-	-	-	-	-	-	-	Microemulsão
F1-30	1.00	2.01			-	7.5	-	Lamelar
F1-50	1.00	2.00	2.99		-	8.0	-	Lamelar
F1-100	1.00	1.86	2.80	3.78	-	-	-	Hexagonal Cúbico
F2	-	-	-	-	-	-	-	Microemulsão
F2-30	1.00	2.00	-	-	-	6.8	-	Lamelar
F2-50	1.00	1.99	-	-	-	7.4	-	Lamelar
F2-100	1.00	-	1.97	-	2.97	9.8	-	Lamelar
	-	1.00	1.77	-	2.68	8.8	10.2	Hexagonal

As diluições das formulações contendo PC em 30 e 50% e as contendo O20 em 30 até 100% apresentaram curvas com picos bem definidos e através da correlação com periodicidade de 1:2:3, revelaram uma de fase lamelar. Para as amostras na maior diluição, contendo o tensoativo PC, exibindo picos poucos definidos e com ombros, porém sem uma periodicidade específica, indicando sua localização em uma região de transição de fase. A partir das distâncias interplanares foi estimada a mesofase formada, visto que os valores de 1,86 se assemelha à raiz de 3 e 2,80 com a raiz de 7 e ambos valores se aproximam das correlações com a

fase hexagonal. Por outro lado, o valor de 3,78 se aproxima de raiz quadrada entre 10 e 12 sendo indicativos para fase cúbica tipo primitiva ou giróide. Assim, esses dados são inconclusivos e pressupõe que esta diluição está em uma região de transição de fase.

Para a formulação F2-100, formada pelo O20, os dados se mostram mais conclusivos, mostrando uma periodicidade de 1:2:3, indicativa de mesofase lamelar. Porém, são exibidos valores de 1,77 e 2,68 que são aproximadas as distâncias de raiz quadrada de 3 e 7, respectivamente, e tais indicam formação de mesofase hexagonal. Igualmente, os dados sugerem uma mistura de fases líquido-cristalina e não mostram uma correlação exata entre as distâncias interplanares para essa amostra.

Sistemas de liberação nanoestruturados, como os sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL), representam uma plataforma promissora para administração bucal de fármacos, pois esses sistemas conseguem protegê-los da degradação físico-química além de aumentar o tempo de permanência da formulação no ambiente nasal, possibilitando uma liberação controlada do fármaco no local específico de ação. Os dados de SAXS permitiram evidenciar que os sistemas não diluídos se caracterizaram como microemulsão e com característica líquida, sendo fáceis de serem administrados, porém quando estes são diluídos em FNS, mostram-se com viscosidade elevada, os quais foram caracterizados como sistemas líquido-cristalinos com formação de mesofases distintas em função da quantidade de água adicionada.

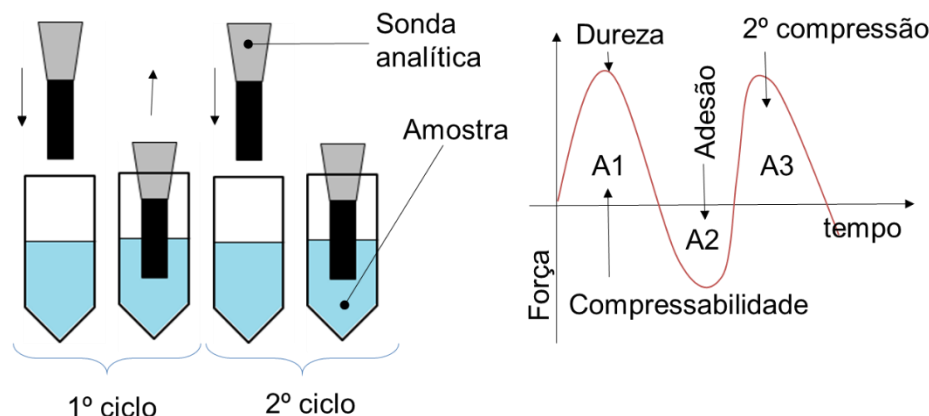
5.8 Análise do perfil de textura e análise por reologia

5.8.1 Análise do perfil de textura

A análise de perfil de textura foi realizada em analisador de textura, sendo possível avaliar as propriedades mecânicas, tais como, dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. A amostra é comprimida por uma sonda analítica e são obtidos parâmetros como (a) dureza: é o pico de força máxima obtido durante o primeiro ciclo de compressão; (b) compressibilidade: é o trabalho total requerido para deformar a amostra durante o primeiro ciclo de compressão da prova analítica; (c) adesividade: representa o trabalho requerido para vencer as forças atrativas entre a prova analítica e a amostra sendo analisada; e (d) coesão: é a razão entre a área positiva obtida durante a segunda compressão (A3) e a obtida durante a primeira compressão; Este

parâmetro mede a taxa que um material se rompe sob uma ação mecânica. O desenho esquemático da técnica se encontra na Figura 37.

Figura 37 – Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste TPA. A1: resistência à compressão; A2: adesão; A3: segundo ciclo de compressão.

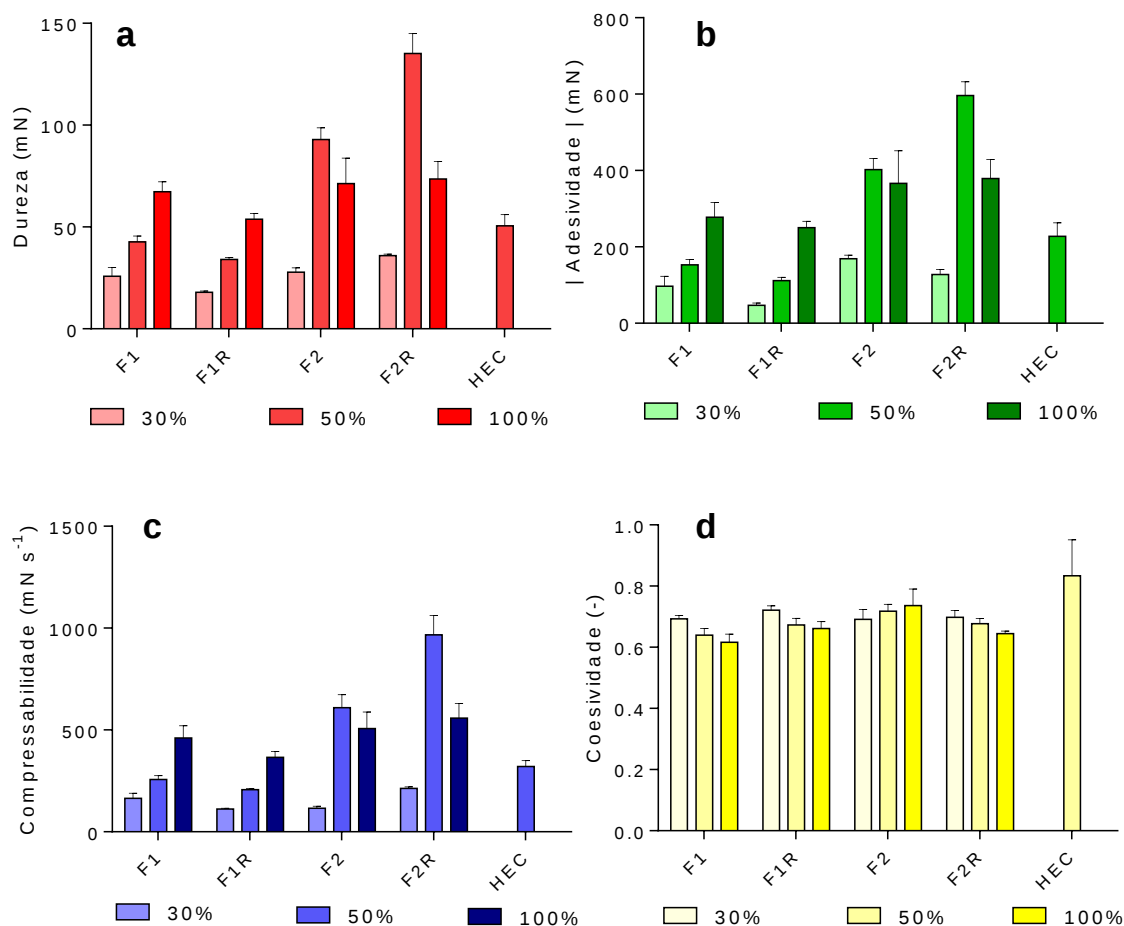


Fonte: FONSECA-SANTOS (2013)

Os testes de propriedades mecânicas das formulações são de grande importância no delineamento de sistema de liberação de fármacos (JONES *et al.*, 1996; BRUSCHI *et al.*, 2007; BRUSCHI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2013b). A Figura 38 representa os parâmetros estudados para as formulações, onde estas foram misturadas com FNS, a fim de simular as mudanças que podem ocorrer nas texturas dos sistemas quando entram em contato com a saliva presente no ambiente nasal.

Em geral, a diluição desses sistemas gera em um aumento da viscosidade, a qual tem uma influência sobre os valores de dureza e compressibilidade. Esses resultados corroboram com outros autores, que observaram que com o aumento das concentrações de polímeros em uma dispersão, a viscosidade aumenta, e geram valores dependentes e crescentes para dureza e compressibilidade (JONES *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 2002; BALOGLU *et al.*, 2011; OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2017). Ou seja, o aumento das concentrações de um polímero em uma dispersão tende a formar uma rede estrutural mais densa que é resistente à compressão (CARVALHO *et al.*, 2013a; CALIXTO *et al.*, 2015).

Figura 38 – Gráficos das medidas obtidas pelo TPA, obtendo os parâmetros de dureza (a), adesividade (b), resistência à compressão (c) e coesão (d) das amostras diluídas em FNS.

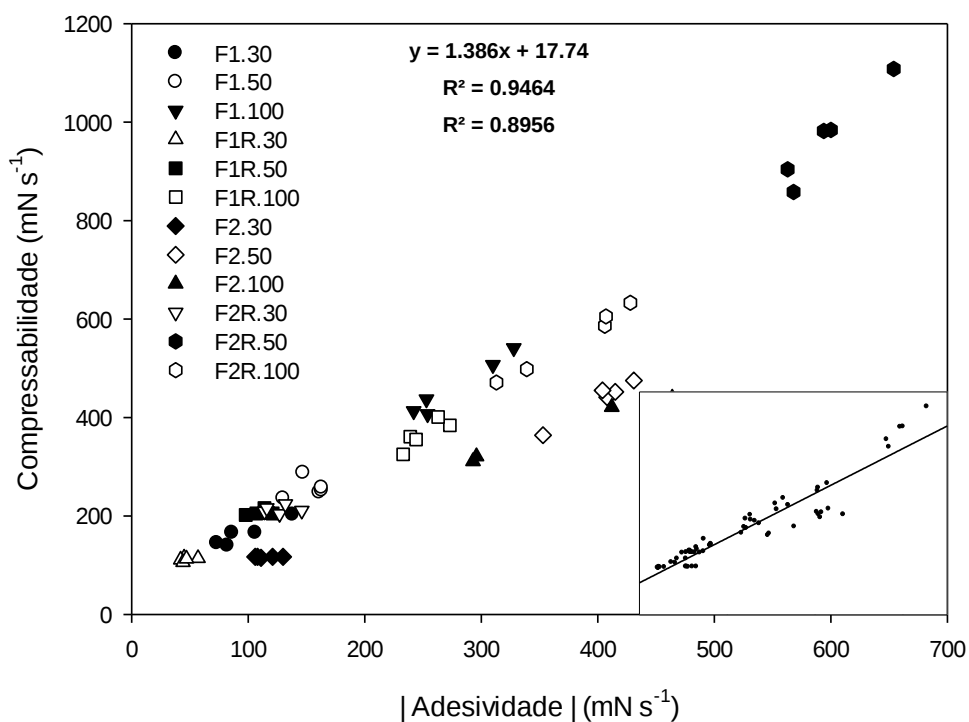
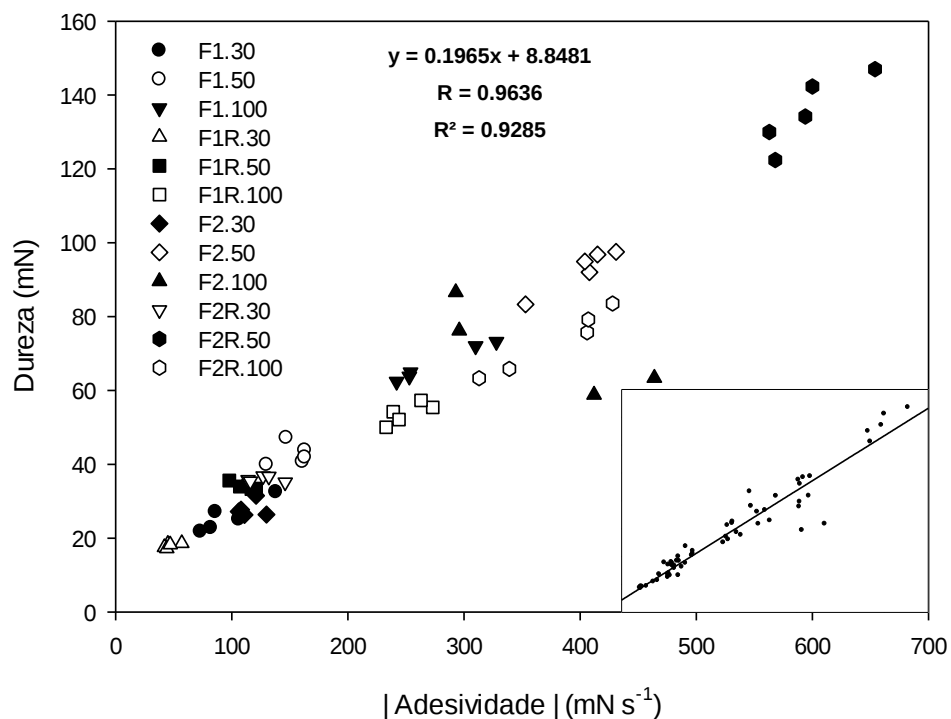


O parâmetro dureza está relacionado com a força máxima para ocorrer a deformação num material. As propriedades de adesividade estão relacionadas como a energia necessária para superar as forças atrativas entre a superfície da formulação com outros materiais com qual está em contato (JONES *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2009). Alguns trabalhos relatam que a adesividade é um parâmetro relacionado com as propriedades mucoadesivas, já que indica quanto um material pode aderir em uma superfície (JONES *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1997; BRUSCHI *et al.*, 2007), levando assim a um aderência melhor sobre a superfície da mucosa no local de aplicação. Obviamente, a mucoadesão é um processo complexo, e somente esta informação não deve ser levada unicamente, mas através desse parâmetro, pode ser utilizada como uma ferramenta para a seleção de potenciais amostras com estes propósitos de serem sistemas de liberação mucoadesivos. Os sistemas obtidos com PS não exibiram área de adesividade pela análise de TPA e então foram descontinuados.

Em geral, os parâmetros mostraram-se crescentes com a diluição da formulação em FNS. Nesse estudo, foi utilizado um gel de HEC à 2,5% (m/m) como um controle positivo, já que a literatura o descreve como um polímero formador de gel com propriedades mucoadesivas (FONSECA-SANTOS e CHORILLI, 2017). A adição de RES às formulações mostrou um ligeiro decréscimo nos valores das propriedades mecânicas destas contendo PC ou O20. Diluições de 100% das formulações em FNS para os sistemas contendo O20 evidenciaram perda dos valores das propriedades de textura; isso pode estar relacionado com uma menor interação do sistema com um alto conteúdo de água. Porém, esses sistemas mostraram características geleificadas e valores mecânicos acima ao gel de HEC na concentração de 2,5%. Por outro lado, os sistemas contendo PC mostraram valores mecânicos próximos com uma diluição de 100% quando comparados ao gel de HEC.

A Figura 39 mostra o gráfico de dispersão com todos os dados obtidos na análise mecânica. A Figura 39A mostra a adesividade em função da dureza das amostras analisado, onde é possível verificar que as variáveis são positivamente correlacionadas e o coeficiente de correlação de Pearson foi de 0,9636 (96,36%). A adesividade em função da compressibilidade das amostras foram analisado também (Figura 39B), onde é possível verificar que as variáveis são positivamente correlacionadas e o coeficiente de correlação de Pearson foi de 0,9464 (94,64%). Os dados aqui foram positivamente correlacionados já que os valores de adesividade são mostrados como uma força positiva (valor absoluto), entretanto essas correlações são negativas em função da compressibilidade ou da dureza.

Figura 39 – Gráficos de dispersão da (a) dureza em função da adesividade das amostras; e (b) da compressibilidade em função da adesividade das amostras. O gráfico no canto inferior direito mostra os dados plotados em função de uma regressão linear.



Os parâmetros básicos no desenho de formas farmacêuticas mucoadesivas são a facilidade de remoção da forma farmacêutica da embalagem primária, facilidade de aplicação do produto na região desejada e retenção no local de aplicação sem desintegração (SCHWARTZ, 1975). A dureza introduz a força necessária para fornecer a deformação de géis. Este parâmetro expressa a aplicabilidade do gel no local desejado. Os géis devem ter pouco valor de dureza para serem administrados facilmente à região nasal (JONES *et al.*, 2009). A compressibilidade define o trabalho necessário para a compactabilidade do produto ao longo de uma distância definida (JONES *et al.*, 1997) e expressa a remoção do gel preparado do recipiente e a simplicidade da disseminação no local da aplicação (JONES *et al.*, 1996). O valor de compressibilidade deve ser baixo para que se possa retirar o gel preparado do recipiente e para ser facilmente espalhado no epitélio da mucosa (TAN *et al.*, 2000). Os resultados do teste de mucoadesão mostram semelhança com os resultados de adesividade obtidos a partir da análise de perfil de textura (CEVHER *et al.*, 2008). O alto valor da coesão fornece recuperação estrutural completa após a aplicação de gel (TAN *et al.*, 2000).

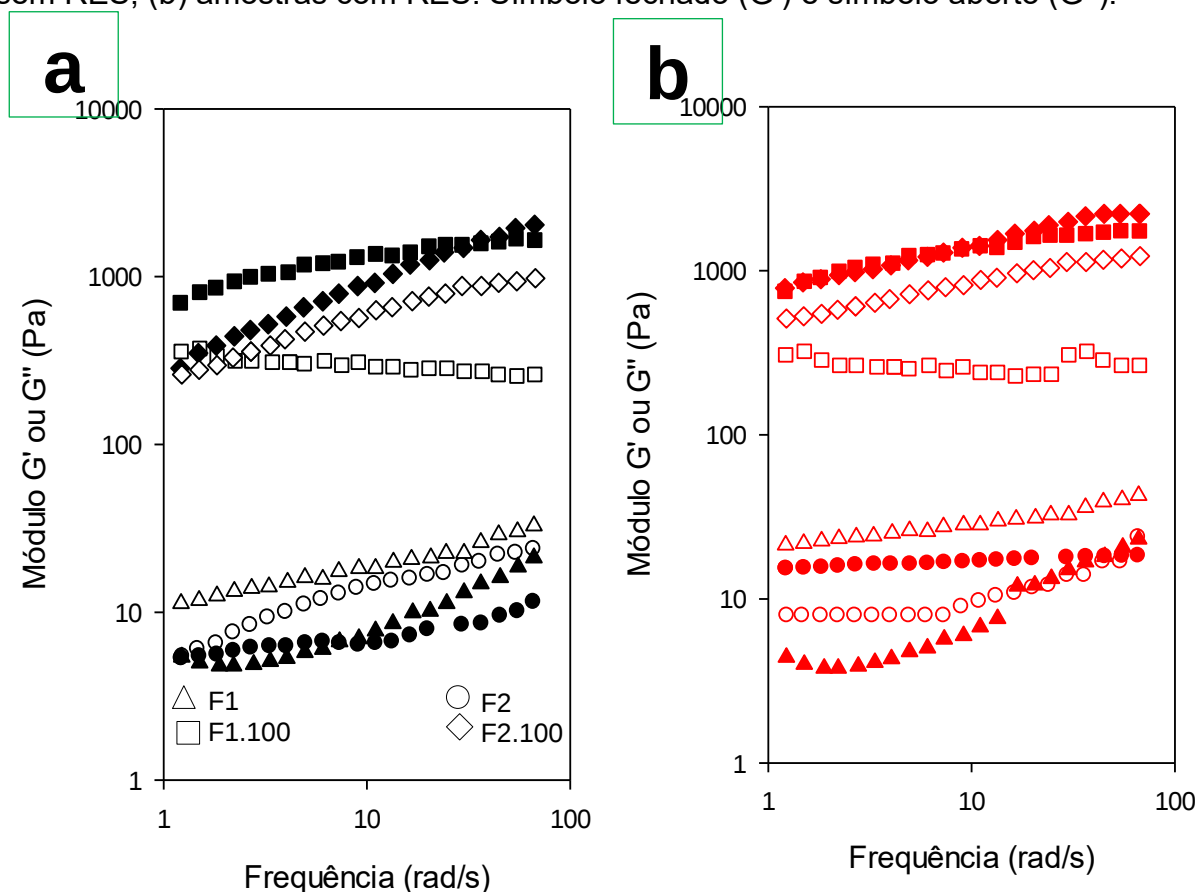
Sistemas farmacêuticos que modificam seu comportamento reológico quando entram em contato com o meio fisiológico aquoso são comumente empregados para atribuir as propriedades mucoadesivas e reológicas em um sítio anatômico específico (CARVALHO *et al.*, 2014). A avaliação do perfil de textura pode ser extremamente útil para caracterizar as mudanças nas propriedades mecânicas ocorridas nos sistemas misturados com o muco e, em conjunto com a reologia, podendo ser uma importante ferramenta para caracterizar a mucoadesão *in situ* (CARVALHO, 2012). Dessa forma, os sistemas aqui desenvolvidos possuem parâmetros mecânicos ideais que suportam a mucoadesão nasal.

5.8.2 Reologia oscilatória

Nos ensaios oscilatórios, a magnitude do módulo elástico G' é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema (CEULEMANS *et al.*, 2002). Três situações podem ser encontradas para uma dispersão polimérica: $G' \gg G''$ para um sistema interligado quimicamente, $G' > G''$ para cadeias mantidas por ligações secundárias, e $G' \leq G''$ para dispersões cujas moléculas estão apenas ligadas fisicamente. Sob uma tensão constante e em baixas frequências, sistemas mais empacotados apresentam o

módulo elástico G' maiores que o viscoso G'' e ambos são independentes da frequência que são representados por uma reta constante. Para sistemas mais fracamente estruturados, os módulos oscilatórios são dependentes da frequência e é observada nesse mesmo gráfico uma inclinação da curva (CEULEMANS *et al.*, 2002)

Figura 40. Reogramas obtidos com as medidas oscilatórias de varredura de frequência das amostras precursoras e das suas misturas com FNS. (a) Amostras sem RES, (b) amostras com RES. Símbolo fechado (G') e símbolo aberto (G'').



As amostras precursoras demonstraram ser mais viscosas do que elásticas ($G'' < G'$). No entanto, as formulações diluídas com FNS tornaram-se formulações elásticas ($G' > G''$), apresentando comportamentos semelhantes a gel com estruturas altamente organizadas (Figura 40). Os sistemas iniciais são característicos de MEs e apresentam comportamento viscoso já que são sistemas menos organizados e ordenados; entretanto, o aumento da frequência leva a valores de $G' > G''$ característicos de sistemas com comportamento viscoelástico (BERNEGOSSI *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2016). Para essas amostras os módulos mostraram ser dependentes da frequência, característico de sistemas

estruturalmente mais fracos e também característico de amostras mais líquidas (CARVALHO *et al.*, 2013b).

No intuito de se estabelecer uma análise quantitativa da dependência de G' com a frequência angular, determinou-se o valor de regressão a partir regressão exponencial dos dados obtidos a partir do espectro mecânico. os parâmetros S e n (da resistência do gel e expoente viscoelástico, respectivamente) são indicativos da densidade de reticulação no interior do gel, sendo que quanto mais alto for o valor de S , mais reticulada e forte é a estrutura do gel. Contrariamente, o valor de n diminui com o aumento da densidade de reticulação. Assim, altos valores de n indicam géis com estruturas mais fracas (SAXENA *et al.*, 2011).

Tabela 6. Valores de regressão linear (r^2), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) das amostras precursoras e das suas misturas com FNS.

Amostra	S	N	r^2
F1	0,503	0,8413	0,9958
F1.100	$1,4 \times 10^5$	0,0016	0,9797
F2	0,188	0,8130	0,9719
F2.100	530,30	0,3540	0,9978
F1R	1,1150	0,7097	0,9810
F1R.100	$1,5 \times 10^5$	0,0017	0,9819
F2R	199,5	0,1620	0,9915
F2R.100	1671,55	0,0039	0,9856

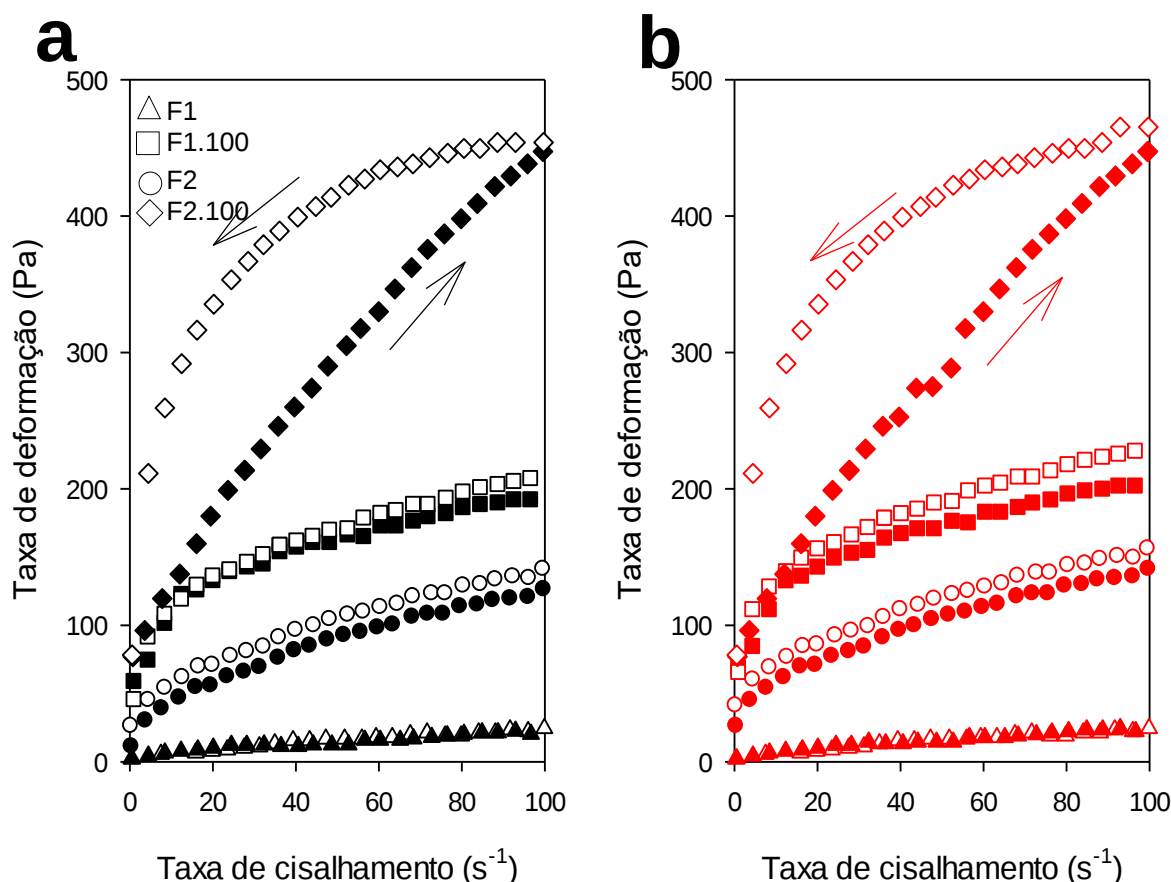
A análise quantitativa dos espectros mecânicos, na Tabela 6, mostrou resultados para S crescentes para os SPCL com e sem fármaco, indicando uma estruturação do sistema conforme ocorre a diluição, transitando para uma mesofase líquido cristalina. Os valores de n mostraram ser decrescente com o aumento de FNS, indicando uma organização mais complexa, e os valores de r foram próximos a 1, indicando que os sistemas são dependentes da frequência angular, porém com a diluição dos sistemas os valores de r sofrem uma discreta diminuição. Os dados quantitativos mostram que a adição de RES ao sistema gerou discretos valores maiores para S , indicando que o RES interage com as mesofases formadas, podendo levar à uma maior organização estrutural dos sistemas.

Os resultados mostram que todos os sistemas precursores de cristais líquidos em estudo neste trabalho misturados com FNS exibem módulos elásticos maiores que as mesmas formulações antes da mistura. Logo, pode ser concluído que o contato dos sistemas com o muco pode promover a formação de uma matriz líquido-cristalina com elasticidade superior à formulação precursora, logo, as misturas exibem sinergismo reológico, propriedade que pode contribuir para a mucoadesão do sistema de liberação.

5.8.3 Reologia de fluxo

As relações entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento de todas as formulações são mostradas nos programas da Figura 41. Todas as amostras exibiram pseudoplasticidade ou plasticidade. A pseudoplasticidade é devido à estrutura líquido-cristalina, a qual causa maior resistência ao fluxo (CARVALHO *et al.*, 2013a; CARVALHO *et al.*, 2013b). O comportamento pseudoplástico é uma propriedade desejável para formulações nasais porque as formulações pseudoplásticas experimentam a perda do fluxo quando uma tensão é aplicada, o que facilita a administração da formulação por um conta-gotas nasal ou um dispositivo tipo spray (ALSARRA *et al.*, 2011). Contudo, ao se retirar essa tensão, a formulação recuperará sua viscosidade inicial, permanecendo por mais tempo no ambiente nasal.

Figura 41. Reogramas de fluxo das amostras precursoras e das suas misturas com FNS. (a) Amostras sem RES, (b) amostras com RES. Símbolo fechado: curva ascendente; símbolo aberto: curva descendente.



As amostras também apresentam alto grau de trixotropia, área de histerese quando diluídas, devido à existência de forças de interações intermoleculares entre as regiões mais estruturadas, entretanto essa estruturação pode ser destruída com o aumento da velocidade de cisalhamento, mas é recuperada quando essa taxa de cisalhamento é cessada. A maioria dos medicamentos nasais é desenvolvida sob a forma de solução administrada como aerossol. Em alguns casos, essas soluções são tixotrópicas e são capazes de alterar suas propriedades físicas sob agitação para facilitar o fornecimento do fármaco e sua adesão à mucosa nasal (KOZMINSKI e KUPCZYK, 2015). A alta viscosidade presente na maioria dos pulverizadores comercialmente disponíveis mesmo após a quebra da estrutura é o fator que contribui para o aumento da residência prolongada do spray na cavidade nasal (LEE *et al.*, 2009).

As formulações exibiram valores de n menores a uma unidade (1), confirmando o comportamento de fluxo pseudoplástico. Após diluição em FNS, as formulações resultantes exibiram um ligeiro aumento nos valores do índice de consistência.

Tabela 7. Parâmetros de fluxo das amostras precursoras e das suas misturas com FNS.

Amostra	k (Pa.s ⁿ)	n	r ²	Classificação
F1	1,8748	0,5292	0,9408	Pseudoplástico
F1.100	60,5639	0,2555	0,9894	Plástico ^a
F2	14,6663	0,4658	0,9974	Plástico ^a
F2.100	35,2971	0,5505	0,9890	Plástico ^a
F1R	1,8465	0,5573	0,9716	Plástico ^a
F1R.100	68,9935	0,2375	0,9900	Plástico ^a
F2R	24,2245	0,3787	0,9916	Plástico ^a
F2R.100	34,1905	0,5572	0,9870	Plástico ^a

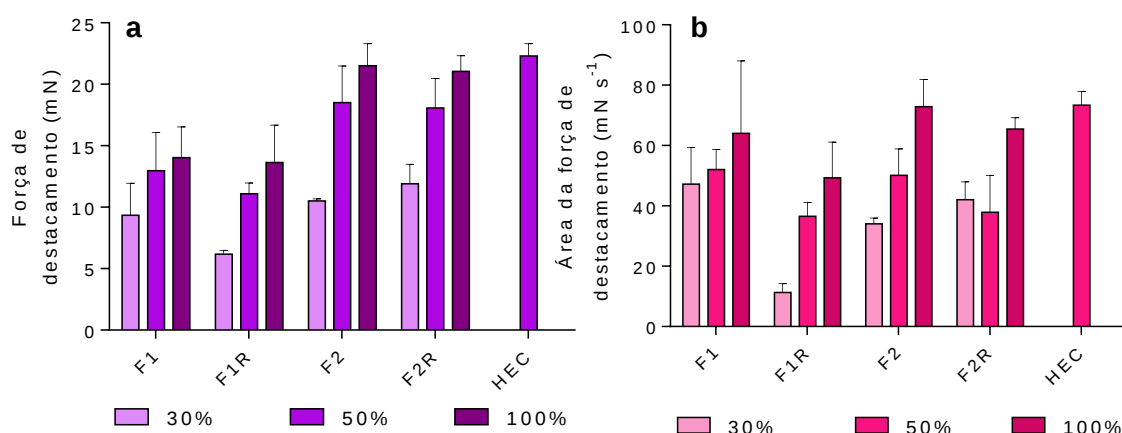
Nota: k: índice de consistência; n: índice de escoamento; ^a tensão de cedência

Materiais deste tipo têm sua estrutura reorientada na direção do fluxo e as interações intermoleculares que antes causavam resistência tornam-se menores, provocando afinamento do fluxo, conhecido como *shear thinning* (SCHRAMM, 2006). O afinamento do fluxo é uma vantagem na aplicação de sistemas de liberação semissólidos, pois facilita seu extravasamento através do frasco ou dispositivo que o contém, como tubos, conta-gotas e seringas, além de permitir o espalhamento da formulação no local de aplicação desejado.

5.9 Análise das propriedades mucoadesivas

Conforme descrito por CARVALHO (2012) as medidas de força interfacial não são adequadas para amostras líquidas. Estes resultados sugerem que a força de mucoadesão é amplamente influenciada pela viscoelasticidade do material. Por isso, não foi realizado o teste com a amostra precursora, somente com as diluídas em FNS. Para conceber sistemas de liberação de fármacos com propriedades mucoadesivas excelentes, como CLs, é necessário o desenvolvimento de testes de mucoadesão, com metodologias simples, que possam avaliar tais propriedades mucoadesivas (TAKEUCHI *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2014).

Figura 42 – Medidas da força de destacamento e área da força de destacamento das amostras diluídas FNS, utilizando disco de mucina.



A mucoadesão dos sistemas precursores de cristais líquidos diluídos em FNS mostrou ser muito maior em relação a organização dos sistemas (Figura 42). Este resultado indica que a mudança para uma mesofase com estrutura mais rígida proporciona um aumento na força mucoadesiva. A mudança de mesofase promovida pela diluição dos sistemas em FNS aumentou acentuadamente os valores de área e pico de mucoadesão, mostrando que a transformação dos sistemas numa fase líquido-cristalina favorece a mucoadesão. A incorporação de RES diminuiu ligeiramente os valores de força de destacamentos para as amostras auto-organizadas com o PC ou O20. Os sistemas compostos por O20 demonstraram valores de mucoadesão e trabalho de mucoadesão semelhantes ao controle positivo, o gel de HEC. Por outro lado, os sistemas compostos por PC obtiveram metade da força nas diluições de 50% e 100% comparado ao gel de HEC.

Estudos anteriores realizados por outros autores relatam esse comportamento de transição de mesofase, em função de um fluido biológico, com o aumento das propriedades adesivas para aplicação em diversos sítios anatômicos, como a mucosa nasal (CARVALHO, F. C. *et al.*, 2010; CARVALHO, 2012; WU *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013b), mucosa bucal (NORLING *et al.*, 1992; DU *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014; BERNEGOSI *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016) e mucosa vaginal (RAMOS *et al.*, 2015; SALMAZI *et al.*, 2015) e os resultados aqui apresentados corroboram que a capacidade de mudança de fase pela diluição do sistema em FNS aumentando o potencial mucoadesivo.

Embora o processo de mucoadesão seja complexo e governado por diferentes forças e teorias, ainda assim possa ser explicado devido a água presente nas formulações participarem do processo de mucoadesão, assim como também o anfifílico pode interagir com os componentes da mucosa, por interações hidrofóbicas, forças van der Waals ou por ligações de hidrogênio, podendo ser isoladamente ou em conjunto (YU *et al.*, 2014). Para sistemas líquidos cristalinos a interação com a água presente na mucosa pode contribuir para esse processo tão complexo (NIELSEN *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2001; CREMONEZ *et al.*, 2013). O fato que os sistemas líquidos cristalinos sofram mudanças na sua mesofase e grau de estruturação, sugere-se que a água presente na mucosa possa interagir com domínios polares das estruturas formadas contribuindo para esse processo.

Com o desenvolvimento de materiais adesivos mais eficientes, é possível conceber sistemas com propriedades mucoadesivas adequadas para veiculação de vários fármacos para serem administrados por diferentes vias e, assim, controlar a liberação, diminuindo os efeitos sistêmicos indesejáveis ou melhorar a absorção e o transporte de fármacos pela membrana biológica (KOCKISCH *et al.*, 2001; CARVALHO, FLÁVIA CHIVA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2014).

5.10 Avaliação da citotoxicidade em agarose *overlay* em células L929

Para determinar se as formulações são citotóxicas em contato com células vivas, o ensaio de reatividade *in vitro* pela difusão em ágar foi realizado. Os resultados mostraram reatividade para controle positivo, o qual equivale a classificação como grau severo e para os sistemas microemulsionados testados foram classificados como moderados ou severos. Os sistemas compostos por PC (F1 e F1R) se mostraram menos citotóxicos quando comparados ao controle positivo, de forma contrária os sistemas compostos por O20 (F2 e F2R) foram igual ou superior quando comparados ao controle.

Devido à alta concentração de tensoativos no desenvolvimento dos sistemas, esses resultados já eram esperados e relatados na literatura (VIAN *et al.*, 1995; ARECHABALA *et al.*, 1999). Estudos com nanoemulsões mostraram um grau moderado de irritação no ensaio de agarose *in vitro* (DAL MAS *et al.*, 2016) e foram semelhantes aos resultados expostos aqui, por outro lado, em outro estudo

perfeito por mostrou que as microemulsões incorporadas em géis não foram tóxicas neste modelo.

Tabela 8. Resultados do potencial irritante para as formulações microemulsionadas com e sem resveratrol.

Amostra	Halo ^a (cm)	Grau	Classificação
Controle +	1,1 ± 0,1	4	Severo
Controle -	0,0	0	Ausência
F1	0,7 ± 0,1	3	Moderado
F1R	0,8 ± 0,1	3	Moderado
F2	1,0 ± 0,2	3	Moderado
F2R	1,2 ± 0,2	3 ou 4	Moderado/Severo

^a Média global da média dos quatro quadrantes (em triplicata)

Um número limitado de estudos tem utilizado este modelo para a predição de inocuidade de sistemas baseados em tensoativos, porém o método de difusão de agarose *in vitro* é uma alternativa ao teste de Draize para o ranqueamento de irritação ocular de produtos à base de tensoativos, além da conveniência como um ensaio de triagem na predição de irritação, avaliando a incorporação do corante vital vermelho neutro por células viáveis (O'BRIEN *et al.*, 1990; HORAN *et al.*, 2003).

Embora os dados apresentados aqui mostrem um grau moderado ou severo quanto a citotoxicidade, os dados de segurança apresentados pelo fabricantes do tensoativos mostram que para o PC, a dose letal (DL₅₀) aguda em ratos é de 3,0 mL/kg, não foram apresentados irritação dérmica em coelhos e tampouco pelo teste de contato em voluntários humanos, além de não apresentar irritação ocular em coelhos (CRODA, 2010). Para a Ficha de Segurança apresentada pela Croda para o O20, os dados de DL₅₀ em ratos são 2.9 g/kg e o teste de Draize em coelhos mostraram irritação cutânea e ocular média a moderada (CRODA, 2012).

Apesar de que as formulações demonstraram grau de moderada toxicidade no ensaio de difusão em ágar e foi evidenciado possível toxicidade pela literatura consultada, os tratamentos com as formulações em modelo de Alzheimer induzido pelo período de 14 dias não foi evidenciado sangramento nasal nos animais e presume-se uma segurança na utilização das formulações desenvolvidas.

5.11 Avaliação biológica das formulações em modelo animal de DA

A etiologia da DA esporádica ainda não está clara; entretanto, vários fatores de risco foram identificados para aumentar a chance de progressão da DA. Dentre esses fatores de risco, a neuroinflamação no cérebro tem sido implicada como um dos principais fatores de risco. No entanto, o mecanismo molecular subjacente ainda não é tão claro e o modelo de indução com STZ produz sintomas característicos semelhante da DA esporádica, por isso este modelo tem sido empregado para explorar o mecanismo fisiopatológico subjacente (KAMAT, 2015).

STZ é um composto de glucosamina-nitrosourea que foi originalmente identificado como um antibiótico. É tóxico para células beta do pâncreas e geralmente transportado através do transportador de glicose 2 e comumente usado para induzir diabetes experimental em animais (POPOVIČ *et al.*, 2001; TAMADDONFARD *et al.*, 2013). A administração de STZ pela via intracerebroventricular ou intraperitoneal produz cognição reduzida e aumento de agregados dos fragmentos A β , proteína tau total e depósitos de A β no cérebro (LIN *et al.*, 2014; WANG, L. *et al.*, 2017).

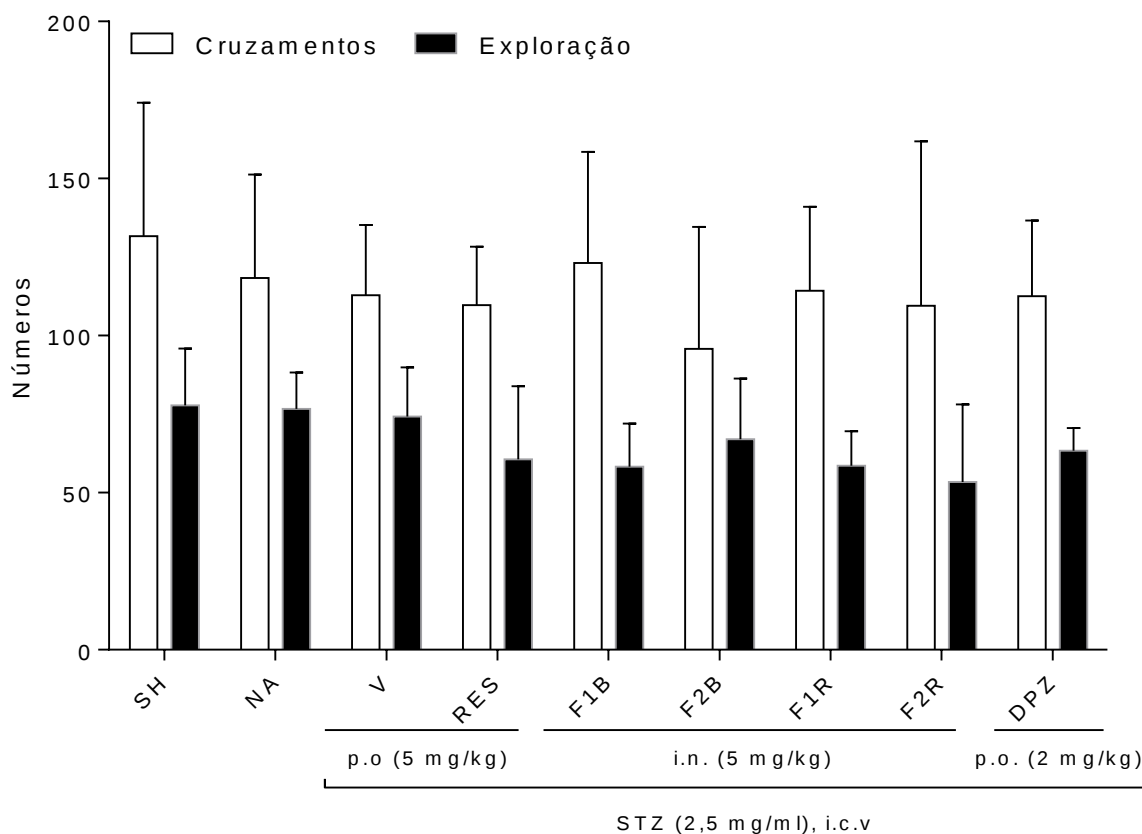
A administração de STZ no cérebro de ratos produz neuroinflamação, estresse oxidativo e alterações bioquímicas, o que é considerado um modelo experimental válido pelas alterações fisiopatológicas precoces na DA (GAO *et al.*, 2014). O déficit de aprendizado espacial induzido por STZ no teste do labirinto de água de Morris e fosforilação de tau no cérebro de ratos produzem DA esporádica experimentalmente (GAO *et al.*, 2014). A proteína tau e os agregados de A β têm papel na cascata patológica amiloidogênica levando ao sintoma de perda de memória e morte de neurônios. Também é evidenciado que a STZ aumenta apoptose neuronal via glycogen synthase kinase beta (GSK3 β) e a ativação desse receptor estimula o aumento da fosforilação da tau, a formação de emaranhados neurofibrilares e implicam na disfunção neuronal e sináptica, resultando na DA como patologia (PONCE-LOPEZ *et al.*, 2017).

A neuroinflamação é uma característica patológica da DA e precede a formação de placas e emaranhados de proteínas A β durante a progressão da DA (Kamat *et al.*, 2012). Existe uma pequena associação de neuroinflamação com a patogênese da DA e envolve a ativação de células gliais pela STZ (RAI *et al.*, 2014). A administração de STZ leva a um aumento dos mediadores neuroinflamatórios e o estresse oxidativo, os

quais contribuem para os processos neurodegenerativos (MISHRA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

O tratamento com as formulações pela via intranasal, fármaco livre pela via oral e os veículos, pela via oral e intranasal, demonstram que tais tratamentos não alteram o desempenho motor dos animais, o qual é representado pelo número de cruzamentos (*crossings*) e o número de posturas de exploração (*rearings*) ($p < 0,05$) quando avaliados no modelo de deambulação, o teste do CA (Figura 43). Dessa forma, o RES não teve capacidade, na concentração testada de 5 mg/kg, para alterar atividade exploratória dos animais e que está envolvida com atividade depressora do SNC ou miorrelaxante periférica, como também não apresenta propriedades sedativas ou sobre a ansiedade (medo) relacionados com a atividade ansiolítica/ansiogênica (ARCHER, 1973).

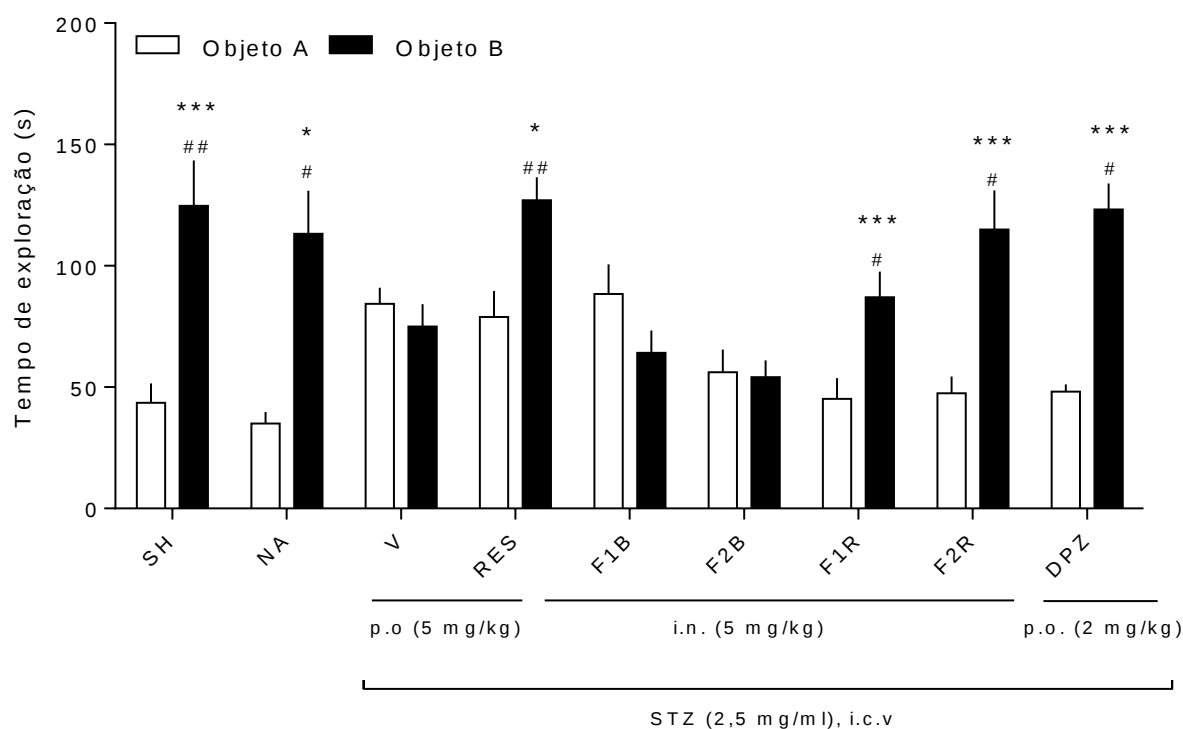
Figura 43. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre os parâmetros: número de cruzamentos (coluna branca) e número de postura de exploração (coluna preta). Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste Dunns e apresentaram $p < 0.05$. SH: sham (n=8); NA: naíve (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.



A Figura 44 apresenta a capacidade dos animais na preferência da exploração de um objeto novo. O grupo veículo não apresenta preferência pelo objeto novo e a exploração entre os dois objetos mostra-se em 50%. Por outro lado o tratamento pela via intranasal e oral apresentam uma preferência maior de exploração, com valores entre 100 e 150 segundos, muito similares aos animais tratados com a DPZ e os grupos sham e naíve. Nota-se também que a preferência pelo objeto A, que fora explorado no treino, tende a diminuir nos grupos tratados pela via intranasal e DPZ quando comparados ao veículo e ao RES administrado pela via oral, e aumentando pela predileção pelo objeto novo nesses grupos. A média tempo de exploração no objeto B foi significativamente diferente para os grupos tratados pela via oral $p \leq 0,01$ e intranasal com o RES ($p \leq 0,001$) quando comparado com o grupo veículo. A média

do número de exploração entre os objetos em cada grupo não diferiu para o grupo veículo e para as formulações brancas ($p > 0,05$).

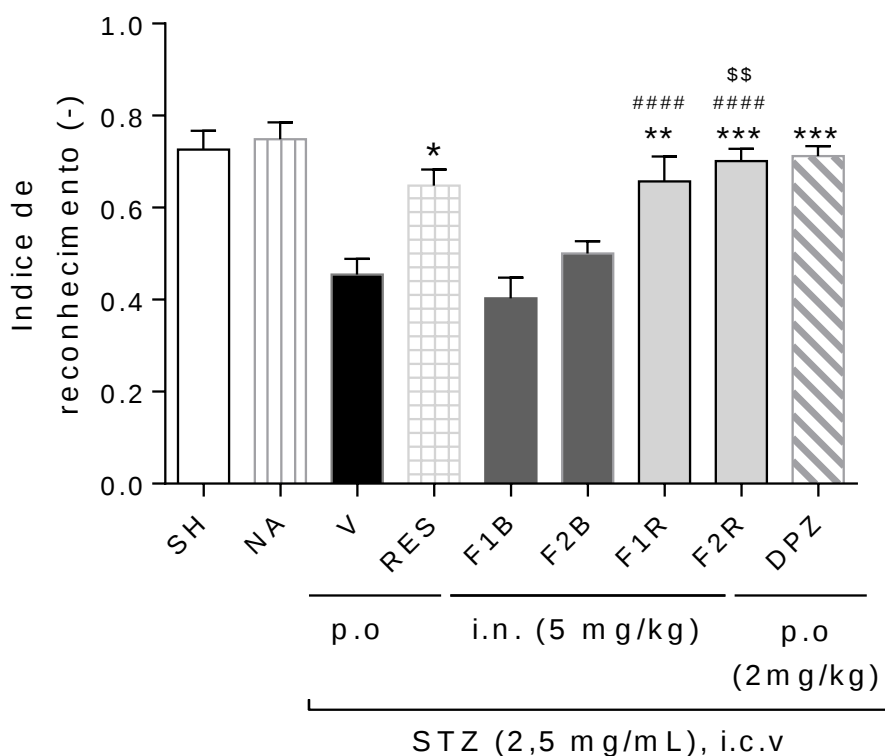
Figura 44. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre o tempo de exploração do objeto A (coluna branca) e objeto B (coluna preta). Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de Dunss e apresentaram $p < 0,05$ (*) e $p \leq 0.001$ (***) para a média do tempo de exploração comparada com objeto B do grupo veículo. Valores de $p < 0,05$ (#) e $p \leq 0.01$ (##) para a diferença da média de exploração de A e B em cada grupo de tratamento (teste de Mann-Whitney). SH: sham (n=8); NA: naíve (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.



Na Figura 45 mostram-se os valores de índice de reconhecimento de objeto que está relacionado por uma preferência inata pelo novo objeto, se o animal reconhece o objeto familiar, ele terá uma tendência para a exploração de um novo objeto (AULUEPTOW, 2017). Pode-se observar que o grupo veículo mostra uma depreciação do índice de reconhecimento, o que está relacionada com a progressão da doença e a falta de capacidade da aprendizagem (aquisição, consolidação e recordação) (BEVINS e BESHEER, 2006). Ambos os tratamentos mostraram altas taxas de índice de reconhecimento de objeto. O tratamento com RES para a via oral se mostrou eficaz

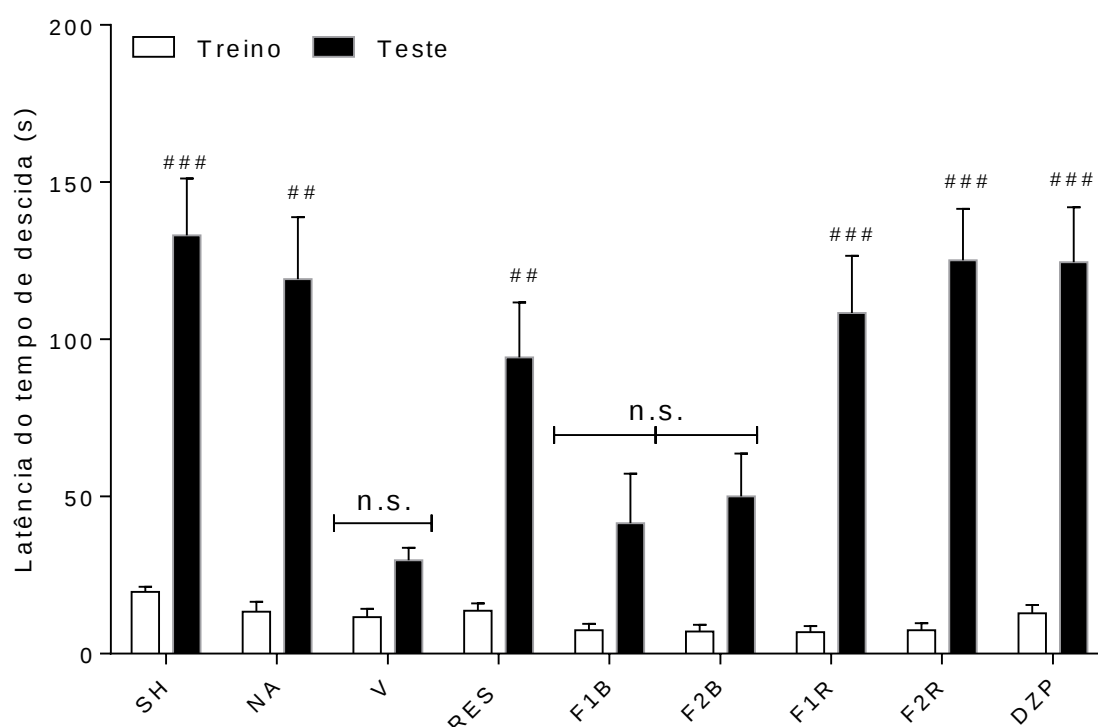
($p < 0,05$), mas quando os grupos pela intranasal e DPZ são comparados com o veículo, a média destes mostraram uma significância superior ($p \leq 0.001$). Desse modo, diferentes regiões cerebrais no processo de reconhecimento parecem estar envolvidas no processo de aprendizagem (ANTUNES e BIALA, 2012).

Figura 45. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento de objeto. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam o desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de Dunns e apresentaram $p < 0,05$ (*) e $p \leq 0.001$ (***) para a média do índice de reconhecimento com grupo veículo, $p \leq 0.0001$ (####) comparado com grupo F1B e $p \leq 0.01$ (\$\$) comparado ao grupo F2B (teste de Mann-Whitney). SH: sham (n=8); NA: naive (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.



Os resultados referentes aos efeitos dos tratamentos e da DZP em animais com DA induzida por STZ estão representados na Figura 46. Avaliando o desempenho dos animais nas sessões de treino e de teste, os resultados apresentados demonstram que o tratamento com STZ promove déficit cognitivo nos animais, uma vez que o grupo controle não aprende a tarefa da esQUIVA inibitória. Por outro lado, mensurando os resultados obtidos das sessões de teste, verifica-se que o tratamento dos animais com as formulações com RES e a DPZ revertem de forma estatisticamente significativa o déficit cognitivo ($p \leq 0.001$) induzido em tanto pela via intranasal quanto pela via oral.

Figura 46. Efeito da administração das formulações brancas e contendo RES pela via intranasal, veículo e RES pela via oral (5 mg/kg) sobre a latência do tempo de descida na EI. Colunas brancas representam as sessões de treino e as colunas pretas representam sessões de teste. Em cada coluna os dados são expressos como medianas seguidas dos intervalos interquartis (25-75). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de Dunns e apresentaram $p \leq 0,01$ (##) e $p \leq 0,001$ (###) para a média do índice de descida com grupo veículo, n.s comparado entre grupo treino e teste do mesmo tratamento (teste de Mann-Whitney). SH: sham (n=8); NA: naïve (n=6); V: veículo (n=11); RES: resveratrol (n=9); F1B: formulação branca contendo PC (n=11); F2B: formulação branca contendo O20 (n=11); F1R: formulação com RES contendo PC (n=11); F2R: formulação com RES contendo O20 (n=11); DPZ: donepezila (n=9); STZ: streptozotocina.



Os resultados indicam que o efeito da administração intranasal tende a ser superior ao efeito pela via oral na mesma dose ($p \leq 0,01$). Por outro lado, doses menores de 5 mg/kg não foram testadas; porém, doses menores podem ser menos ativas pela via oral, contudo podem exibir potência superior pela via nasal. Isto é, a via nasal pode exibir uma capacidade no direcionamento para o cérebro e uma forma de avaliar em trabalhos futuros seria o estudo com doses menores por ambas as vias.

A indução do DA por STZ apresenta aumento da expressão de proteínas e neurofilamentos da proteína β -amilóide, aumento da fosforilação da proteína Tau e diminuição dos níveis de expressão da sinapsina quando comparados aos animais não induzidos (RAVELLI *et al.*, 2017). Baseado no processo fisiopatológico da DA, postula-se o provável mecanismo de atuação do RES. Essa molécula demonstrou capacidade de despolimerização dos peptídeos β -amilóide ($A\beta$) por meio de um

mecanismo envolvendo proteossomas (MARAMBAUD *et al.*, 2005), mas não atuando sobre enzimas β e γ -secretases que clivam a APP em monômeros de $A\beta$ (RIVIERE *et al.*, 2007). Além disso, o RES ativa a transtirretina, uma proteína que sequestra a proteína β -amilóide e previne a agregação de proteínas no cérebro (BASTIANETTO *et al.*, 2007). O potencial neuroprotetor tem sido postulado pela ativação da proteína quinase C reativa (HAN *et al.*, 2004) - pode estimular a α -secretase e resultar em uma redução na produção de $A\beta$ (YANG *et al.*, 2007), aumentando os níveis de glutathiona intracelular (SAVASKAN *et al.*, 2003), diminuindo os níveis de malondialdeído, suprimindo a atividade da acetilcolinesterase e aumentando a relação de proteínas Bax / Bcl-X (L) envolvidas na apoptose dos neurônios (JANG e SURH, 2003; LUO e HUANG, 2006).

Na DA, a neurodegeneração induzida pelos peptídeos β -amilóides depende da participação das células da glia. A inibição da sinalização do fator nuclear kappa-beta (NF- κ B) na microglia indica um papel para a sinalização microglial do NF- κ B na mediação da toxicidade da $A\beta$. Estes achados mostram que o RES ativa a sirtuína (SIRT1) e reduz a sinalização de NF- κ B estimulada por $A\beta$, o que leva um efeito neuroprotetor (CHEN *et al.*, 2005). Devido à supressão de NF- κ B, a formação de óxido nítrico sintase, ciclooxigenase-2 (COX-2) e catepsina, bem como mediadores de óxido nítrico e prostaglandina E2 envolvidos na neuroinflamação também são reduzidos (KIM *et al.*, 2006).

Alguns estudos mostraram o potencial de RES contra taupatia relacionada à DA, exibindo redução dos níveis de proteína tau em ratos (AL-BISHRI *et al.*, 2017) e inibição da hiperfosforilação e agregação de tau no cérebro (PASINETTI *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016). Outro estudo concluiu que a capacidade do RES para proteger contra a hiperfosforilação da tau e estimular a desfosforilação da proteína tau está relacionada com a inibição da proteína GSK-3 β e CaMKII e com a inibição da proteína fosfatase 2 (PP2A) (WANG, R. *et al.*, 2017).

Todo esse volume de dados corrobora com a atividade biológica exibida pelo RES e suportam os resultados obtidos neste estudo. Adicionalmente, ambas as vias utilizadas aqui, a via oral e intranasal, obtiveram respostas biológicas com significância. Em estudos farmacológicos, é comumente utilizado tensoativos ou solventes orgânicos, como PS ou DMSO, para solubilizar compostos para serem mais fáceis administrados.

Nas administrações orais realizadas nos animais, solubilizou-se o RES em uma solução de PS à 0,5%. É notável o uso de micelas como uma estratégia para aumentar a solubilidade de fármacos e consequentemente a sua biodisponibilidade. O uso de RES em micelas foi proposto e investigado frente à absorção e biodisponibilidade em humanos. O estudo farmacocinético mostrou que a área sob a curva (AUC) de concentração plasmática do *trans*-RES foi 5,0 vezes e 10,6 vezes mais altas, respectivamente, após a micelização em relação ao fármaco livre (CALVO-CASTRO *et al.*, 2018).

Também, o RES é classificado pela SCB como classe II, ou seja, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade. Logo, a etapa limitante do processo de absorção é a sua baixa solubilidade. Na forma de micelas, o RES está na sua forma solúvel, circundado pelas caudas da cadeia polar do anfifílico, e sendo prontamente biodisponível. Esses achados apoiam aos dados de que na forma de dispersão molecular, o RES administrado pela via oral obteve resposta farmacológica no modelo de Alzheimer induzido por STZ.

A administração intranasal está emergindo como um método confiável para contornar a barreira hematoencefálica (BHE) e administrar uma ampla gama de agentes farmacêuticos ativos, incluindo moléculas pequenas e macromoléculas, fatores de crescimento, vetores virais e até mesmo células-tronco para o cérebro (MITTAL *et al.*, 2014). Esta via envolve os sistemas nervosos olfativos ou nervo trigêmeo que iniciam no cérebro e terminam na cavidade nasal no neuroepitélio olfatório ou no epitélio respiratório. Eles são as únicas porções expostas externamente do sistema nervoso central (SNC) e, portanto, representam o método mais direto de aporte não invasiva no cérebro (MITTAL *et al.*, 2014; CROWE *et al.*, 2018).

As formulações administradas pela via intranasal também denotam de atividade farmacológica no modelo de DA induzido. Essa atividade pode estar relacionada com a absorção direta da mucosa nasal para a corrente circulatória, o transporte do fármaco pela via bulbo olfativo até o cérebro ou pelos dois mecanismos. Embora neste trabalho não foi realizado nenhum estudo de direcionamento ou farmacocinética cerebral existem dados na literatura que podem fundamentar algumas hipóteses.

RAJPUT e BUTANI (2019) demonstraram que o RES em suspensão quando administrado em ratos pela via oral apresentou uma concentração de 188 ng/mL no plasma e cerca de 400 ng/mL no cérebro numa dose de 2 mg/mL, cerca de metade da dose utilizada neste estudo. Contrariamente, os autores administraram pela via

intranasal em um gel de gelatina, que sofre geleificação *in situ* por íons, e nele adicionaram nanopartículas lipídicas contendo RES e observaram que a concentração foi de 167 ng/mL no plasma e cerca de 1030 ng/mL no cérebro. Ou seja, a via intranasal mostrou uma capacidade 2,5 maior do aporte de RES no cérebro comparada com a via oral.

Um outro estudo mostrou que após a administração nasal de RES (0,2 mg) em uma suspensão aquosa, não foram observadas quantidades detectáveis do fármaco no sangue ou no LCR de ratos. Entretanto, a administração nasal da mesma dose de RES suspensa em uma solução de cloridrato de quitosana (7,5 mg/mL ou 7,5%), produziu quantidades detectáveis do fármaco no LCR dos ratos, em 60min após a administração nasal dessa suspensão com um valor de $1,30 \pm 0,30$ µg/mL (TROTITA *et al.*, 2018). Os autores relataram que natureza mucoadesiva da quitosana deve retardar a depuração mucociliar prolongando a retenção da formulação na cavidade nasal.

Quando uma solução de RES foi administrada pela via oral ou nasal na dose de 1,29 mg/kg em ratos mostrou que os parâmetros farmacocinéticos foram diferentes em função da via administrada (AHIRRAO e SHROTRIYA, 2017). A administração oral alcançou concentrações máximas de $133,7 \pm 4,1$ e $219,8 \pm 7,7$ ng/mL no plasma e no cérebro, respectivamente e a AUC foi de $921,7 \pm 63,5$ ng/mL/h no plasma e de $1077,9 \pm 25,5$ ng/mL/h no cérebro. Para a solução oral, os valores de concentrações máximas encontrados foram de $102,2 \pm 9,8$ e $286,5 \pm 7,89$ ng/mL.h no cérebro e no plasma, respectivamente. Os valores para a AUC foi de $921,7 \pm 63,5$ e $1077,9 \pm 25,5$ ng/mL.h para o plasma e para o cérebro, respectivamente. Nota-se que para a solução administrada pela via intranasal, a AUC foi superior em 1,4 vezes quando comparado com a via oral.

Foi demonstrado que nanossuspensões de RES administrados pela via intranasal e pela via oral mostraram um DTE de 458.2% e um DTP de 78,18% (HAO *et al.*, 2016). Como sugerido por WANG *et al.* (2003), valores de DTE > 1 poderiam confirmar o caminho direto do nariz para o cérebro. Os valores de DTP demonstraram que aproximadamente 78% das moléculas do fármaco foram absorvidas no cérebro diretamente da cavidade nasal, possivelmente através da via nariz-cérebro, e apenas parcialmente transportadas para o cérebro através do BBB da circulação sistêmica.

Por outro lado, mesmo que absorvido pela mucosa nasal ou pelo TGI o RES precisa permear pela BHE para chegar ao cérebro. RES pode atravessar pela BBB

(DE VRIES *et al.*, 2018), além de estudos reportarem que o RES possui capacidade de proteger a integridade da BHE em patologias e condições de estresse no SNC (CHANG *et al.*, 2010; POTTER *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2014; SHIN *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015). Sabe-se que na DA e em outras doenças neurodegenerativas, existe a ruptura da BHE e esta foi evidenciada por estudos de MRI e em tecidos *post-mortem* de pacientes (LIPSMAN *et al.*, 2018; SWEENEY *et al.*, 2018). Alguns autores sugerem que a disfunção da BHE desencadeará neuroinflamação e estresse oxidativo, então aumentará a atividade de β -secretase e γ -secretase e, finalmente, promoverá a geração de A β (WAN *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2018).

Um ensaio clínico de fase 2 foi realizado em 119 pacientes com DA leve a moderada. Os pacientes tomaram uma dose de 500 mg de RES ou placebo por dia durante 52 semanas e a dose foi aumentada em 500 mg a cada 13 semanas. Os resultados mostraram uma diminuição do volume ventricular e aumento do volume cerebral em comparação ao placebo, diminuição dos níveis de A β 40 no plasma e no LCR, e este estudo concluiu que RES cruzou a barreira hematoencefálica (BHE) e afetou o SNC (TURNER *et al.*, 2015).

Um estudo relatou que o diabetes induzido por STZ em ratos alterou a estrutura molecular das junções celulares da BHE e diminuíram a expressão da ocludina (CHEHADE *et al.*, 2002) e afetam diversas áreas cerebrais, incluindo o mesencéfalo, gânglios basais, córtex e hipocampo (HUBER *et al.*, 2006). Desta maneira, mesmo que a BHE não esteja integra no quadro patológico da DA, o RES é capaz de atravessar esta e exercer suas atividades específicas no SNC e nos alvos moleculares da DA.

Estes estudos supracitados acima corroboram com nossos dados biológicos, já que as formulações desenvolvidas aqui sofrem geleificação *in situ*, aumentando sua viscosidade e consequentemente podem retardar a depuração mucociliar e permanecer mais tempo na cavidade nasal. Portanto, os sistemas nasais formadores de gel *in situ* apresentam uma promessa considerável no fornecimento de terapêutica e rápido início de ação (KARAVASILIS e FATOUROS, 2016).

6 CONCLUSÃO

A construção de diagramas de fases permitiu verificar que é possível modular o comportamento de fases de sistemas compostos pelos anfifílicos de acordo com os requisitos exigidos pela via de administração. A associação dos anfifílicos com o ácido oleico permite projetar sistemas com diferentes propriedades reológicas e mecânicas, que podem ser exploradas para a via nasal.

O desenvolvimento de um método analítico para o RES permitiu conduzir estudos de solubilidade e permitem futuramente que os estudos de estabilidade possam ser conduzidos, além dos ensaios de liberação e permeação *in vitro*. Foi possível incorporar o RES na concentração de 5 mg/g de formulação. Os sistemas mostraram propriedades mecânicas quando diluídos, semelhantes ao hidrogel de HEC à 2,5%, como controle. Quando diluídos em FNS, os sistemas mostraram propriedades mucoadesivas. SAXS mostrou a capacidade dos sistemas microemulsionados em se auto-organizarem para um sistema líquido-cristalino de fase lamelar e hexagonal e fase hexagonal/cúbica. Análise de fluxo evidenciou que os sistemas possuem comportamento pseudoplástico e são potencialmente promissores para via nasal. Estes dados corroboram com outros trabalhos do grupo sobre a capacidade de geleificação *in situ* de formulações baseadas em tensoativo e mostra uma aplicabilidade potencial para a via nasal.

As formulações demonstraram grau moderado de citotoxicidade em modelo de difusão em ágar, embora não foram evidenciados sangramentos nasais nos animais tratados por 14 dias no ensaio biológico. Ademais, os estudos farmacológicos mostraram um efeito sobre a cognição dos animais e os sistemas administrados pela via nasal denotaram de atividade biológica em modelo de Alzheimer induzido por STZ com possíveis ação sobre o SNC. Os sistemas desenvolvidos mostraram-se promissores devido às propriedades mucoadesivas para a aplicabilidade na via nasal, além de seu fácil escalonamento e exequibilidade, e de não utilizar tecnologias e excipientes onerosos, e apontaram-se como uma plataforma de liberação e entrega do RES.

Perspectivas apontam que nestes sistemas podem ser incorporadas outras moléculas bioativas que possam ter importantes atividades biológicas em doenças do SNC para sua administração pela via intranasal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; HAYAT, K.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; ZHANG, X. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 139-157, 2013.
- ABISMAIL, B.; CANSELIER, J. P.; WILHELM, A. M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrason Sonochem**, v. 6, n. 1-2, p. 75-83, 1999.
- ACCILI, D.; MENGHI, G.; BONACUCINA, G.; MARTINO, P. D.; PALMIERI, G. F. Mucoadhesion dependence of pharmaceutical polymers on mucosa characteristics. **Eur J Pharm Sci**, v. 22, n. 4, p. 225-234, 2004.
- ADI. **World Alzheimer Report 2009**. Londres: Alzheimer's Disease International, 2009. 93
- AHIRRAO, M.; SHROTRIYA, S. In vitro and in vivo evaluation of cubosomal in situ nasal gel containing resveratrol for brain targeting. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 10, p. 1686-1693, 2017.
- AHMED, T.; JAVED, S.; JAVED, S.; TARIQ, A.; ŠAMEC, D.; TEJADA, S.; NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. M. Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 2622-2635, 2017.
- AL-BISHRI, W. M.; HAMZA, A. H.; FARRAN, S. K. Resveratrol treatment attenuates amyloid beta, Tau protein and markers of oxidative stress, and inflammation in Alzheimer's disease rat model. **Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.**, v. 6, p. 71-78, 2017.
- ALBERT, J. N. L.; EPPS III, T. H. Self-assembly of block copolymer thin films. **Materials Today**, v. 13, n. 6, p. 24-33, 2010.
- ALIABADI, H. M.; LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 139-162, 2006.
- ALMEIDA, L.; VAZ-DA-SILVA, M.; FALCÃO, A.; SOARES, E.; COSTA, R.; LOUREIRO, A. I.; FERNANDES-LOPES, C.; ROCHA, J.-F.; NUNES, T.; WRIGHT, L.; SOARES-DA-SILVA, P. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. S1, p. S7-S15, 2009.
- ALSARRA, I. A.; HAMED, A. Y.; ALANAZI, F. K.; NEAU, S. H. Rheological and mucoadhesive characterization of poly(vinylpyrrolidone) hydrogels designed for nasal mucosal drug delivery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 4, p. 573, 2011.
- ALZHEIMER'S-ASSOCIATION. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 4, p. 325-373, 2017.
- ALZHEIMER-ASSOCIATION. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 4, p. 459-509, 2016.

- ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin**, v. 64, p. 146-148, 1907.
- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm Res**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- AMOA, S. K. S.; DALLA VECCHIA, M. T.; PEDRINI, B.; CARNHELUTTI, G. L.; GONÇALVES, A. E.; DOS SANTOS, D. A.; BIAVATTI, M. W.; DE SOUZA, M. M. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 β ,10 α -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. **European Journal of Pharmacology**, v. 769, p. 195-202, 2015.
- AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 182-193, 2012.
- ANDLAUER, W.; KOLB, J.; SIEBERT, K.; FÜRST, P. Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 26, n. 2, p. 47-55, 2000.
- ANDRADE, J. D.; KING, R. N.; GREGONIS, D. E.; COLEMAN, D. L. Surface characterization of poly(hydroxyethyl methacrylate) and related polymers. I. Contact angle methods in water. **Journal of Polymer Science: Polymer Symposia**, v. 66, n. 1, p. 313-336, 1979.
- ANISIMOVA, N. Y. U.; KISELEVSKY, M. V.; SOSNOV, A. V.; SADOVNIKOV, S. V.; STANKOV, I. N.; GAKH, A. A. Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study. **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 88-88, 2011.
- ANSARI, N.; KHODAGHOLI, F. Natural Products as Promising Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease: Molecular Mechanism Aspect. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 4, p. 414-429, 2013.
- ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1-2, p. 44-52, 2007.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1-2, p. 142-147, 2009.
- _____. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 978-985, 2011.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.

- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ARECHABALA, B.; COIFFARD, C.; RIVALLAND, P.; COIFFARD, L. J.; DE ROECK-HOLTZHAUER, Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. **J Appl Toxicol**, v. 19, n. 3, p. 163-165, 1999.
- ARIGA, K.; HILL, J. P.; LEE, M. V.; VINU, A.; CHARVET, R.; ACHARYA, S. Challenges and breakthroughs in recent research on self-assembly. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 1, p. 014109, 2008.
- ARMSTRONG, M.; WALKER, S.; MAINS, J.; WILSON, C. G. Drug Delivery Across the Nasal Mucosa. In: (Ed.). **Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems**: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p.61-82. ISBN 9781118794203.
- ARNÁIZ, E.; ALMKVIST, O. Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 107, p. 34-41, 2003.
- ARRIGHI, H. M.; NEUMANN, P. J.; LIEBERBURG, I. M.; TOWNSEND, R. J. Lethality of Alzheimer Disease and Its Impact on Nursing Home Placement. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 24, n. 1, p. 90-95, 2010.
- ATANACKOVIĆ, M. T.; GOJKOVIĆ-BUKARICA, L. C.; CVEJIĆ, J. M. Improving the low solubility of resveratrol. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 13, n. 1, p. A25, 2012.
- ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I. **Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease**. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 9780128039601.
- ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Physical Pharmacy**. London: Pharmaceutical Press, 2008.
- AU-LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **JoVE**, n. 126, p. e55718, 2017.
- AULD, D. S.; KORNECOOK, T. J.; BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 3, p. 209-245, 2002.
- AVILA, J. Neuronal disorders: introduction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 17, p. 2191-2193, 2007.
- AWAD, T. S.; OKAMOTO, Y.; MASUM, S. M.; YAMAZAKI, M. Formation of Cubic Phases from Large Unilamellar Vesicles of Dioleoylphosphatidylglycerol/Monoolein Membranes Induced by Low Concentrations of Ca^{2+} . **Langmuir**, v. 21, n. 25, p. 11556-11561, 2005.

- BÄCKMAN, L.; JONES, S.; BERGER, A. K.; LAUKKA, E. J.; SMALL, B. J. Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, n. 3, p. 195-204, 2004.
- BALL, P. Polymers made to measure. **Nature**, v. 367, n. 6461, p. 323-324, 1994.
- BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D.; JONES, E. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019-1031, 2011.
- BALLARD, C. G.; GAUTHIER, S.; CUMMINGS, J. L.; BRODATY, H.; GROSSBERG, G. T.; ROBERT, P.; LYKETSOS, C. G. Management of agitation and aggression associated with Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 5, n. 5, p. 245-255, 2009.
- BALOGLU, E.; KARAVANA, S. Y.; SENYIGIT, Z. A.; GUNERI, T. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627-636, 2011.
- BANKS, W. A. Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. **BMC Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. S2, 2008.
- BANSIL, R.; STANLEY, E.; LAMONT, J. T. Mucin biophysics. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 635-657, 1995.
- BARNHAM, K. J.; BUSH, A. I. Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 222-228, 2008.
- BARNHAM, K. J.; CICCOTOSTO, G. D.; TICKLER, A. K.; ALI, F. E.; SMITH, D. G.; WILLIAMSON, N. A.; LAM, Y.-H.; CARRINGTON, D.; TEW, D.; KOCAK, G.; VOLITAKIS, I.; SEPAROVIC, F.; BARROW, C. J.; WADE, J. D.; MASTERS, C. L.; CHERNY, R. A.; CURTAIN, C. C.; BUSH, A. I.; CAPPAL, R. Neurotoxic, Redox-competent Alzheimer's β -Amyloid Is Released from Lipid Membrane by Methionine Oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 42959-42965, 2003.
- BARTOLOTTI, N.; LAZAROV, O. Lifestyle and Alzheimer's Disease: The Role of Environmental Factors in Disease Development. In: LAZAROV, O.; TESCO, G. (Ed.). **Genes, Environment and Alzheimer's Disease**. San Diego: Academic Press, 2016. p.197-237. ISBN 978-0-12-802851-3.
- BARTUS, R.; DEAN, R.; BEER, B.; LIPPA, A. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408-414, 1982.
- BARTUS, R. T. On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. **Experimental Neurology**, v. 163, n. 2, p. 495-529, 2000.
- BASTIANETTO, S.; BROUILLETTE, J.; QUIRION, R. Neuroprotective Effects of Natural Products: Interaction with Intracellular Kinases, Amyloid Peptides and a Possible Role for Transthyretin. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 10, p. 1720-1725, 2007.

- BEHL, C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 3, p. 301-323, 1999.
- BENTLEY, P.; DRIVER, J.; DOLAN, R. J. Modulation of fusiform cortex activity by cholinesterase inhibition predicts effects on subsequent memory. **Brain**, v. 132, n. 9, p. 2356, 2009.
- BERMAN, A. Y.; MOTECHIN, R. A.; WIESENFELD, M. Y.; HOLZ, M. K. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 35, 2017.
- BERNEGOSI, J.; CALIXTO, G.; SANCHES, P.; FONTANA, C.; CILLI, E.; GARRIDO, S.; CHORILLI, M. Peptide KSL-W-Loaded Mucoadhesive Liquid Crystalline Vehicle as an Alternative Treatment for Multispecies Oral Biofilm. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 37, 2016.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study recognition memory. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1306, 2006.
- BI, X. L.; YANG, J. Y.; DONG, Y. X.; WANG, J. M.; CUI, Y. H.; IKESHIMA, T.; ZHAO, Y. Q.; WU, C. F. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 185-193, 2005.
- BIERER, L. M.; HAROUTUNIAN, V.; GABRIEL, S.; KNOTT, P. J.; CARLIN, L. S.; PUROHIT, D. P.; PERL, D. P.; SCHMEIDLER, J.; KANOF, P.; DAVIS, K. L. Neurochemical Correlates of Dementia Severity in Alzheimer's Disease: Relative Importance of the Cholinergic Deficits. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 2, p. 749-760, 1995.
- BIESCHKE, J.; HERBST, M.; WIGLEND, T.; FRIEDRICH, R. P.; BOEDDRICH, A.; SCHIELE, F.; KLECKERS, D.; LOPEZ DEL AMO, J. M.; GRÜNING, B. A.; WANG, Q.; SCHMIDT, M. R.; LURZ, R.; ANWYL, R.; SCHNOEGL, S.; FÄNDRICH, M.; FRANK, R. F.; REIF, B.; GÜNTHER, S.; WALSH, D. M.; WANKER, E. E. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. **Nat Chem Biol**, v. 8, n. 1, p. 93-101, 2012.
- BISHARA, D.; SAUER, J.; TAYLOR, D. The pharmacological management of Alzheimer's disease. **Progress in Neurology and Psychiatry**, v. 19, n. 4, p. 9-16, 2015.
- BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 4-5, p. 267-277, 2009.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 368, n. 9533, p. 387-403, 2006.

- BONIN-GUILLAUME, S.; ZEKRY, D.; GIACOBINI, E.; GOLD, G.; MICHEL, J.-P. Impact économique de la démence. **La Presse Médicale**, v. 34, n. 1, p. 35-41, 2005.
- BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; KOOIJMANS, S. A. A.; DINIZ, H.; CALZZANI, R. A. J.; DE CARVALHO VICENTINI, F. T. M.; VAN DER MEEL, R.; DE ABREU FANTINI, M. C.; IYOMASA, M. M.; SCHIFFELERS, R. M.; BENTLEY, M. V. L. B. An in situ gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103-117, 2015.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.
- BRASIL. **RDC n. 166 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. 2017.
- BROWN, V. A.; PATEL, K. R.; VISKADURAKI, M.; CROWELL, J. A.; PERLOFF, M.; BOOTH, T. D.; VASILININ, G.; SEN, A.; SCHINAS, A. M.; PICCIRILLI, G.; BROWN, K.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; BRENNER, D. E. Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers: Safety, Pharmacokinetics, and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9003-9011, 2010.
- BRUSCHI, M. L. **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. 2015. 1-199
- BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. E.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; JONES, D. S. Precursor System of Liquid Crystalline Phase Containing Propolis Microparticles for the Treatment of Periodontal Disease: Development and Characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.
- BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074-2089, 2007.
- BURGHHAUS, L.; SCHÜTZ, U.; KREMPEL, U.; DE VOS, R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; WEVERS, A.; LINDSTROM, J.; SCHRÖDER, H. Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. **Molecular Brain Research**, v. 76, n. 2, p. 385-388, 2000.
- BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's disease. **BMJ**, v. 338, n. b158, 2009.
- BUSH, A. I. Copper, Zinc, and the Metallobiology of Alzheimer Disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 17, n. 3, p. 147-150, 2003.

- BUSH, A. I. The metal theory of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 33 Suppl 1, p. S277-281, 2013.
- BUTTERFIELD, D. A.; DRAKE, J.; POCERNICH, C.; CASTEGNA, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 12, p. 548-554, 2001.
- CACABELOS, R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 3-47, 1999.
- CAI, Z.; QIAO, P. F.; WAN, C. Q.; CAI, M.; ZHOU, N. K.; LI, Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 63, n. 4, p. 1223-1234, 2018.
- CAI, Z.; YAN, L. J.; LI, K.; QUAZI, S. H.; ZHAO, B. Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease. **Neuromolecular Med**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2012.
- CALIXTO, G.; GARCIA, M.; CILLI, E.; CHIAVACCI, L.; CHORILLI, M. Design and Characterization of a Novel p1025 Peptide-Loaded Liquid Crystalline System for the Treatment of Dental Caries. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 158, 2016.
- CALIXTO, G.; YOSHII, A. C.; ROCHA E SILVA, H.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; CHORILLI, M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 4, p. 490-496, 2015.
- CALIXTO, G. M. F.; VICTORELLI, F. D.; DOVIGO, L. N.; CHORILLI, M. Polyethyleneimine and Chitosan Polymer-Based Mucoadhesive Liquid Crystalline Systems Intended for Buccal Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 820-836, 2018.
- CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J. P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 55, n. 3, p. 323-328, 2003.
- CALVO-CASTRO, L. A.; SCHIBORR, C.; DAVID, F.; EHRT, H.; VOGGEL, J.; SUS, N.; BEHNAM, D.; BOSY-WESTPHAL, A.; FRANK, J. The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans is Significantly Increased by Micellar Solubilization. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 9, p. 1701057, 2018.
- CALVO, P.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.
- CAMONT, L.; COTTART, C. H.; RHAYEM, Y.; NIVET-ANTOINE, V.; DJELIDI, R.; COLLIN, F.; BEAUDEUX, J. L.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. **Anal Chim Acta**, v. 634, n. 1, p. 121-128, 2009.

- CAPIRALLA, H.; VINGTDEUX, V.; ZHAO, H.; SANKOWSKI, R.; AL-ABED, Y.; DAVIES, P.; MARAMBAUD, P. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Abeta-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. **J Neurochem**, v. 120, n. 3, p. 461-472, 2012.
- CARLESIMO, G. A.; OSCAR-BERMAN, M. Memory deficits in Alzheimer's patients: A comprehensive review. **Neuropsychology Review**, v. 3, n. 2, p. 119-169, 1992.
- CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina**. 2012. 163 Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- CARVALHO, F. C.; BARBI, M. S.; SARMENTO, V. H.; CHIAVACCI, L. A.; NETTO, F. M.; GREMIAO, M. P. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 4, p. 430-439, 2010.
- CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 1-17, 2010.
- CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2013a.
- CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIÃO, M. P. D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013b.
- CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, p. 203-213, 2014.
- CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The Use of Xanthan Gum in An Ophthalmic Liquid Dosage Form: Rheological Characterization of the Interaction With Mucin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1117-1127, 2002.
- CEVHER, E.; TAHA, M. A. M.; ORLU, M.; ARAMAN, A. Evaluation of Mechanical and Mucoadhesive Properties of Clomiphene Citrate Gel Formulations Containing Carbomers and Their Thiolated Derivatives. **Drug Delivery**, v. 15, n. 1, p. 57-67, 2008.
- CHAN, J.; MAGHRABY, G. M. M. E.; CRAIG, J. P.; ALANY, R. G. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 65-71, 2007.

- CHANG, H.-C.; TAI, Y.-T.; CHERNG, Y.-G.; LIN, J.-W.; LIU, S.-H.; CHEN, T.-L.; CHEN, R.-M. Resveratrol Attenuates High-Fat Diet-Induced Disruption of the Blood–Brain Barrier and Protects Brain Neurons from Apoptotic Insults. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 15, p. 3466-3475, 2014.
- CHANG, J.-H.; CHANG, H.-C.; CHEN, R.-M.; LIN, Y.-L.; CHEN, T.-L.; LIN, J.-W.; CHIU, W.-T. Resveratrol Protects against Oxidized LDL-Induced Breakage of the Blood-Brain Barrier by Lessening Disruption of Tight Junctions and Apoptotic Insults to Mouse Cerebrovascular Endothelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2187-2192, 2010.
- CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 195-208, 2006.
- CHAVES, M.; FINKELSZTEJN, A.; STEFANI, M. A. **Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- CHEHADE, J. M.; HAAS, M. J.; MOORADIAN, A. D. Diabetes-Related Changes in Rat Cerebral Occludin and Zonula Occludens-1 (ZO-1) Expression. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 3, p. 249-252, 2002.
- CHEN, J.; ZHOU, Y.; MUELLER-STEINER, S.; CHEN, L. F.; KWON, H.; YI, S.; MUCKE, L.; GAN, L. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. **J Biol Chem**, v. 280, n. 48, p. 40364-40374, 2005.
- CHEN, X.; YAN, S. D. Mitochondrial A β A potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. **IUBMB Life**, v. 58, n. 12, p. 686-694, 2006.
- CHEN, Y.; LIANG, X.; MA, P.; TAO, Y.; WU, X.; WU, X.; CHU, X.; GUI, S. Phytantriol-Based In Situ Liquid Crystals with Long-Term Release for Intra-articular Administration. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 846-854, 2015.
- CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 640-665, 2012.
- CHEN, Y. L.; GUI, S. Y.; LIANG, X.; WANG, S. M.; JIANG, X. J. Preparation and evaluation of intra-articular injectable sinomenine hydrochloride-loaded in situ liquid crystals. **Yaoxue Xuebao**, v. 51, n. 1, p. 132-139, 2016.
- CHENDKE, P. K.; FOGLER, H. S. Macrosonics in industry: 4. Chemical processing. **Ultrasonics**, v. 13, n. 1, p. 31-37, 1975.
- CHERNY, R. A.; ATWOOD, C. S.; XILINAS, M. E.; GRAY, D. N.; JONES, W. D.; MCLEAN, C. A.; BARNHAM, K. J.; VOLITAKIS, I.; FRASER, F. W.; KIM, Y.-S.; HUANG, X.; GOLDSTEIN, L. E.; MOIR, R. D.; LIM, J. T.; BEYREUTHER, K.; ZHENG, H.; TANZI, R. E.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits β -Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. **Neuron**, v. 30, n. 3, p. 665-676, 2001.

- CHERNY, R. A.; LEGG, J. T.; MCLEAN, C. A.; FAIRLIE, D. P.; HUANG, X.; ATWOOD, C. S.; BEYREUTHER, K.; TANZI, R. E.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Aqueous Dissolution of Alzheimer's Disease A β Amyloid Deposits by Biometal Depletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 33, p. 23223-23228, 1999.
- CHUNG, S.; YAO, H.; CAITO, S.; HWANG, J.-W.; ARUNACHALAM, G.; RAHMAN, I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 79-90, 2010.
- CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. **Nat Neurosci**, 2002.
- ČOLOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D.; BONDŽIĆ, A. M.; VASIĆ, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.
- COTTART, C.-H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J.-L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 1, p. 7-16, 2010.
- CRAFT, S. Insulin Resistance and Alzheimers Disease Pathogenesis: Potential Mechanisms and Implications for Treatment. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 147-152, 2007.
- CRAIG, L. A.; HONG, N. S.; MCDONALD, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 6, p. 1397-1409, 2011.
- CREMONEZ, C. P.; BENTLEY, M. V. L. B.; LARA, M. G. Characterization of swelling of lamellar phases of monoolein and water containing polyhexamethylene biguanide. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 545-553, 2013.
- CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R1, p. R12-R20, 2010.
- CRODA. **SAFETY DATA SHEET: PROCETYL™ AWS-LQ-(RB)**. 2010.
- _____. **SAFETY DATA SHEET: BRIJ™ O20-SS-(RB)**. 2012.
- CROWE, T. P.; GREENLEE, M. H. W.; KANTHASAMY, A. G.; HSU, W. H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sci**, v. 195, p. 44-52, 2018.
- CUMMINGS, J. L.; MORSTORF, T.; ZHONG, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 4, p. 37-37, 2014.

- D. ALLEN, D.; GALDZICKI, Z.; BRINING, S. K.; FUKUYAMA, R.; RAPOPORT, S. I.; SMITH, Q. R. Beta-amyloid induced increase in choline flux across PC12 cell membranes. **Neuroscience Letters**, v. 234, n. 1, p. 71-73, 1997.
- DAL MAS, J.; ZERMIANI, T.; THIESEN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; DA SILVA, K. A. B. S.; DE SOUZA, M. M.; MALHEIROS, A.; BRESOLIN, T. M. B.; LUCINDA-SILVA, R. M. Nanoemulsion as a carrier to improve the topical anti-inflammatory activity of stem bark extract of *Rapanea ferruginea*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4495-4507, 2016.
- DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 324-352, 2012.
- DE ALMEIDA, L.; TERUMI FUJIMURA, A.; DEL CISTIA, M. L.; FONSECA-SANTOS, B.; BRAGA IMAMURA, K.; MICHELS, P. A. M.; CHORILLI, M.; GRAMINHA, M. A. S. Nanotechnological Strategies for Treatment of Leishmaniasis--A Review. **J Biomed Nanotechnol**, v. 13, n. 2, p. 117-133, 2017.
- DE ARAUJO, P. R.; CALIXTO, G. M. F.; DA SILVA, I. C.; DE PAULA ZAGO, L. H.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, A. O.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. Mucoadhesive In Situ Gelling Liquid Crystalline Precursor System to Improve the Vaginal Administration of Drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 225, 2019.
- DE SANTI, C.; PIETRABISSA, A.; SPISNI, R.; MOSCA, F.; PACIFICI, G. M. Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. **Xenobiotica**, v. 30, n. 6, p. 609-617, 2000.
- DE VRIES, K.; STRYDOM, M.; STEENKAMP, V. Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. **Journal of Herbal Medicine**, v. 11, p. 71-77, 2018.
- DELBIANCO, M.; BHARATE, P.; VARELA-ARAMBURU, S.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrates in Supramolecular Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 1693-1752, 2016.
- DIANA, M. L.; EUGEN, B.; GEOFFREY, J. P.; AIKATERINI, L. Peptide Self-Assemblies for Drug Delivery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 22, p. 2277-2289, 2015.
- DJUPESLAND, P. G. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective—a review. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, n. 1, p. 42-62, 2013.
- DOKANIA, S.; JOSHI, A. K. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) – challenges and road ahead. **Drug Delivery**, v. 22, n. 6, p. 675-690, 2015.
- DU, J. D.; LIU, Q.; SALENTINIG, S.; NGUYEN, T.-H.; BOYD, B. J. A novel approach to enhance the mucoadhesion of lipid drug nanocarriers for improved drug delivery to

the buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1–2, p. 358–365, 2014.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; CUMMINGS, J. L.; DEKOSKY, S. T.; BARBERGER-GATEAU, P.; DELACOURTE, A.; FRISONI, G.; FOX, N. C.; GALASKO, D.; GAUTHIER, S.; HAMPEL, H.; JICHA, G. A.; MEGURO, K.; O'BRIEN, J.; PASQUIER, F.; ROBERT, P.; ROSSOR, M.; SALLOWAY, S.; SARAZIN, M.; DE SOUZA, L. C.; STERN, Y.; VISSER, P. J.; SCHELTENS, P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1118–1127, 2010.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; DEKOSKY, S. T.; BARBERGER-GATEAU, P.; CUMMINGS, J.; DELACOURTE, A.; GALASKO, D.; GAUTHIER, S.; JICHA, G.; MEGURO, K.; O'BRIEN, J.; PASQUIER, F.; ROBERT, P.; ROSSOR, M.; SALLOWAY, S.; STERN, Y.; VISSER, P. J.; SCHELTENS, P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 8, p. 734–746, 2007.

EVILEVITCH, A.; JÖNSSON, B.; OLSSON, U.; WENNERSTRÖM, H. Molecular Transport in a Nonequilibrium Droplet Microemulsion System. **Langmuir**, v. 17, n. 22, p. 6893–6904, 2001.

EVILEVITCH, A.; OLSSON, U.; JÖNSSON, B.; WENNERSTRÖM, H. Kinetics of Oil Solubilization in Microemulsion Droplets. Mechanism of Oil Transport. **Langmuir**, v. 16, n. 23, p. 8755–8762, 2000.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K. L. (Ed.). **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.195–240.

FEHÉR, A.; ERÖS, E. C. In situ forming lyotropic liquid crystalline systems containing metronidazole-benzoate. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 15, n. 5, p. 343–346, 2005.

FERREIRA, L. M. B.; KUROKAWA, S. S. S.; ALONSO, J. D.; CASSIMIRO, D. L.; SOUZA, A. L. R. D.; FONSECA, M.; SARMENTO, V. H. V.; REGASINI, L. O.; RIBEIRO, C. A. Structural and Thermal Behavior of Meglumine-Based Supra-Amphiphiles in Bulk and Assembled in Water. **Langmuir**, v. 32, n. 45, p. 11878–11887, 2016.

FERREIRA, S. T.; KLEIN, W. L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 4, p. 529–543, 2011.

FERRER, I.; GOMEZ-ISLA, T.; PUIG, B.; FREIXES, M.; RIBE, E.; DALFO, E.; AVILA, J. Current Advances on Different Kinases Involved in Tau Phosphorylation, and Implications in Alzheimers Disease and Tauopathies. **Current Alzheimer Research**, v. 2, n. 1, p. 3–18, 2005.

FINDER, V. H.; GLOCKSHUBER, R. Amyloid- β Aggregation. **Neurodegenerative Diseases**, v. 4, n. 1, p. 13-27, 2007.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. London: Pharmaceutical Press, 2006. 492

FONSECA-SANTOS, B. **Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal**. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

FONSECA-SANTOS, B.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUB, T. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. In-Situ Gelling Liquid Crystal Mucoadhesive Vehicle for Curcumin Buccal Administration and Its Potential Application in the Treatment of Oral Candidiasis. **J Biomed Nanotechnol**, v. 15, n. 6, p. 1334-1344, 2019.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, 2017.

FONSECA-SANTOS, B.; DOS SANTOS, A. M.; RODERO, C. F.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4553-4562, 2016.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4981-5003, 2015.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A. D.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 301-313, 2005.

FÖRSTL, H.; KURZ, A. Clinical features of Alzheimer's disease. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 249, n. 6, p. 288-290, 1999.

FRANCIOSO, A.; MASTROMARINO, P.; MASCI, A.; ERME, M.; MOSCA, L. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. **Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 237-245, 2014.

FRANCIS, P. T. The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. **CNS Spectrums**, v. 10, n. S18, p. 6-9, 2005.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 137-147, 1999.

FRANK, E. M. Effect of Alzheimer's disease on communication function. **Journal of the South Carolina Medical Association (1975)**, v. 90, n. 9, p. 417-423, 1994.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N. M.; IBRAHIM, H. G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 73-80, 2001.

GALGATTE, U. C.; KUMBHAR, A. B.; CHAUDHARI, P. D. Development of in situ gel for nasal delivery: design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. **Drug Deliv**, v. 21, n. 1, p. 62-73, 2014.

GAO, C.; LIU, Y.; JIANG, Y.; DING, J.; LI, L. Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3 β pathway in streptozotocin-induced alzheimer rat model. **Brain Pathol**, v. 24, n. 3, p. 261-269, 2014.

GARCIA-GARCIA, E.; ANDRIEUX, K.; GIL, S.; COUVREUR, P. Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 2, p. 274-292, 2005.

GARTI, N.; MEZZENGA, R.; SOMASUNDARAN, P. **Self-Assembled Supramolecular Architectures: Lyotropic Liquid Crystals**. New Jersey: Wiley, 2012. 1-378

GENDRON, T. F.; PETRUCELLI, L. The role of tau in neurodegeneration. **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 13, 2009.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G. A Century of Alzheimer's Disease. **Science**, v. 314, n. 5800, p. 777-781, 2006.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G.; JAKES, R.; RUTHERFORD, D.; CROWTHER, R. A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 3, n. 4, p. 519-526, 1989.

GONCALVES, A. E.; BURGER, C.; AMOAH, S. K.; TOLARDO, R.; BIAVATTI, M. W.; DE SOUZA, M. M. The antidepressant-like effect of Hedyosmum brasiliense and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 674, n. 2-3, p. 307-314, 2012.

GOODBY, J. W. G., G.; SPIESS, H. W.; VILL, V. **Handbook of Liquid Crystals**. Berlin: Wiley-VCH, 1998.

GOTTI, C.; MORETTI, M.; BOHR, I.; ZIABREVA, I.; VAILATI, S.; LONGHI, R.; RIGANTI, L.; GAIMARRI, A.; MCKEITH, I. G.; PERRY, R. H.; AARSLAND, D.; LARSEN, J. P.; SHER, E.; BEATTIE, R.; CLEMENTI, F.; COURT, J. A. Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease,

Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. **Neurobiology of Disease**, v. 23, n. 2, p. 481-489, 2006.

GOURAS, G. K.; BEAL, M. F. Metal Chelator Decreases Alzheimer β -Amyloid Plaques. **Neuron**, v. 30, n. 3, p. 641-642, 2001.

GRALLE, M.; FERREIRA, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 1, p. 11-32, 2007.

GRASSIN-DELYLE, S.; BUENESTADO, A.; NALINE, E.; FAISY, C.; BLOUQUIT-LAYE, S.; COUDERC, L.-J.; LE GUEN, M.; FISCHLER, M.; DEVILLIER, P. Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, n. 3, p. 366-379, 2012.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface Active Agents by HLB. **Journal of Cosmetic Science**, v. 1, p. 311-326, 1949.

_____. Calculation of HLB values of Nonionic Surfactants. **Journal of Cosmetic Science**, v. 5, p. 249-256, 1954.

GU, L.; LIU, C.; GUO, Z. Structural Insights into A β 42 Oligomers Using Site-directed Spin Labeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 18673-18683, 2013.

GUARENTE, L. Sirtuins, Aging, and Medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 23, p. 2235-2244, 2011.

GUERRERO, R. F.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Wine, resveratrol and health: a review. **Nat Prod Commun**, v. 4, n. 5, p. 635-658, 2009.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23-24, p. 1032-1040, 2010.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245-251, 2008.

HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 12, p. 1589-1599, 2001.

HAN, Y. S.; ZHENG, W. H.; BASTIANETTO, S.; CHABOT, J. G.; QUIRION, R. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. **Br J Pharmacol**, v. 141, 2004.

- HANE, F.; LEONENKO, Z. Effect of Metals on Kinetic Pathways of Amyloid- β Aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 101, 2014.
- HANE, F.; TRAN, G.; ATTWOOD, S. J.; LEONENKO, Z. Cu²⁺ Affects Amyloid- β (1–42) Aggregation by Increasing Peptide-Peptide Binding Forces. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59005, 2013.
- HANISCH, F.-G.; MÜLLER, S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. **Glycobiology**, v. 10, n. 5, p. 439-449, 2000.
- HAO, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; TONG, T.; ZHUANG, Q.; JIN, K.; CHEN, W.; TANG, H. Fabrication of an ionic-sensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 376-386, 2016.
- HARDY, J.; ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 383-388, 1991.
- HARDY, J.; MYERS, A.; WAVRANT-DE VRIEZE, F. Problems and Solutions in the Genetic Analysis of Late-Onset Alzheimer's Disease. **Neurodegenerative Diseases**, v. 1, n. 4-5, p. 213-217, 2004.
- HARDY, J.; SELKOE, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.
- HARKEMA, J. R.; CAREY, S. A.; WAGNER, J. G. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. **Toxicol Pathol**, v. 34, n. 3, p. 252-269, 2006.
- HASHIMOTO, M.; ROCKENSTEIN, E.; CREWS, L.; MASLIAH, E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **NeuroMolecular Medicine**, v. 4, n. 1, p. 21-35, 2003.
- HASSELMO, M. E. The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. **Current opinion in neurobiology**, v. 16, n. 6, p. 710-715, 2006.
- HASSELMO, M. E.; BOWER, J. M. Acetylcholine and memory. **Trends in Neurosciences**, v. 16, n. 6, p. 218-222, 1993.
- HE, C.-X.; HE, Z.-G.; GAO, J.-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 445-460, 2010.
- HE, X.; LI, Z.; RIZAK, J. D.; WU, S.; WANG, Z.; HE, R.; SU, M.; QIN, D.; WANG, J.; HU, X. Resveratrol Attenuates Formaldehyde Induced Hyperphosphorylation of Tau Protein and Cytotoxicity in N2a Cells. **Front Neurosci**, v. 10, p. 598, 2016.

- HENKIN, R. I. Intranasal delivery to the brain. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 480-480, 2011.
- HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101-108, 2003.
- HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. **Nature**, v. 152, n. 3847, p. 102-103, 1943.
- HOLSTEIN, M. Alzheimer's disease and senile dementia, 1885–1920: An interpretive history of disease negotiation. **Journal of Aging Studies**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 1997.
- HOLTZMAN, D. M.; JOHN, C. M.; GOATE, A. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. **Science translational medicine**, v. 3, n. 77, p. 77sr71-77sr71, 2011.
- HOOPER, N. M. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 2, p. 335-338, 2005.
- HORAN, I.; CLOTWORTHY, M.; FOKUNANG, C. N.; TOMKINS, P. T. The development of an in vitro screening strategy for topically applied products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 81-90, 2003.
- HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review. **Journal of Controlled Release**, v. 223, p. 85-98, 2016.
- HUANG, X.; CUAJUNGCO, M. P.; ATWOOD, C. S.; HARTSHORN, M. A.; TYNDALL, J. D. A.; HANSON, G. R.; STOKES, K. C.; LEOPOLD, M.; MULHAUP, G.; GOLDSTEIN, L. E.; SCARPA, R. C.; SAUNDERS, A. J.; LIM, J.; MOIR, R. D.; GLABE, C.; BOWDEN, E. F.; MASTERS, C. L.; FAIRLIE, D. P.; TANZI, R. E.; BUSH, A. I. Cu(II) Potentiation of Alzheimer A β Neurotoxicity: CORRELATION WITH CELL-FREE HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION AND METAL REDUCTION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 37111-37116, 1999.
- HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204-1222, 2012.
- HUBER, J. D.; VANGILDER, R. L.; HOUSER, K. A. Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 6, p. H2660-H2668, 2006.
- HUNTER, R. J. **Foundations of colloid science**. Oxford: Clarendon Press, 1989. ISBN 9780198551898.
- HURD, M. D.; MARTORELL, P.; DELAVANDE, A.; MULLEN, K. J.; LANGA, K. M. Monetary Costs of Dementia in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 14, p. 1326-1334, 2013.

HYDE, S. T. Identification of Lyotropic Liquid Crystalline Mesophases. In: HOLMBERG, K. (Ed.). **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: Wiley, v.2, 2002. p.299-332.

ICH. **Validation of Analytical Procedures**: International Conference on Harmonisation 2005.

ILLUM, L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 23, p. 1184-1189, 2002.

_____. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1, p. 187-198, 2003.

ILLUM, L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 3-17, 2004.

IQBAL, K.; DEL C. ALONSO, A.; CHEN, S.; CHOCHAN, M. O.; EL-AKKAD, E.; GONG, C.-X.; KHATOON, S.; LI, B.; LIU, F.; RAHMAN, A.; TANIMUKAI, H.; GRUNDKE-IQBAL, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1739, n. 2–3, p. 198-210, 2005.

ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular and Surface Forces**. 3. Oxford: Academic Press, 2011. 704

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surfaces Forces**. 2. New York: Academic, 1991.

ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 72, n. 0, p. 1525-1568, 1976.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635, 1998.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 26-30, 2002.

JANG, J. H.; SURH, Y. J. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 34, 2003.

JANN, M. W.; SHIRLEY, K. L.; SMALL, G. W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, n. 10, p. 719-739, 2002.

- JANNIN, B.; MENZEL, M.; BERLOT, J.-P.; DELMAS, D.; LANÇON, A.; LATRUFFE, N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 1113-1118, 2004.
- JAYASENA, T.; POLJAK, A.; SMYTHE, G.; BRAIDY, N.; MÜNCH, G.; SACHDEV, P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 4, p. 867-883, 2013.
- JELICIC, M. Implicit Memory Performance of Patients With Alzheimer's Disease: A Brief Review. **International Psychogeriatrics**, v. 7, n. 3, p. 385-392, 1995.
- JONES, B. E. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 11, p. 578-586, 2005.
- JONES, D. S.; BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H. G.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, p. 49-58, 2009.
- JONES, D. S.; LAWLOR, M. S.; WOOLFSON, A. D. Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): Rheological and mathematical interpretation of textural parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 9, p. 2090-2101, 2002.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, n. 2, p. 223-233, 1997.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, n. 12, p. 2229-2234, 1996.
- JONES, M.-C.; LEROUX, J.-C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, n. 2, p. 101-111, 1999.
- JOSE, S.; ANJU, S. S.; CINU, T. A.; ALEYKUTTY, N. A.; THOMAS, S.; SOUTO, E. B. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1, p. 6-13, 2014.
- JOTHEESWARAN, A. T.; WILLIAMS, J. D.; PRINCE, M. J. The predictive validity of the 10/66 Dementia diagnosis in Chennai, India – a three year follow-up study of cases identified at baseline. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 24, n. 3, p. 296-302, 2010.

- KALDAS, M. I.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 307-312, 2003.
- KAMAT, P. K. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 7, p. 1050-1052, 2015.
- KAR, S.; ISSA, A. M.; SETO, D.; AULD, D. S.; COLLIER, B.; QUIRION, R. Amyloid β -Peptide Inhibits High-Affinity Choline Uptake and Acetylcholine Release in Rat Hippocampal Slices. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 5, p. 2179-2187, 1998.
- KARASULU, H. Y. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 1, p. 119-135, 2008.
- KARAVASIL, C.; FATOUROS, D. G. Smart materials: In situ gel-forming systems for nasal delivery. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 157-166, 2016.
- KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 6, p. 511-535, 1997.
- KATO, T. **Liquid Crystalline Functional Assemblies and Their Supramolecular Structures**. New York: Springer, 2008.
- KATZMAN, R. The prevalence and malignancy of alzheimer disease: A major killer. **Archives of Neurology**, v. 33, n. 4, p. 217-218, 1976.
- KATZMAN, R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. **Alzheimer's & Dementia**, v. 4, n. 6, p. 378-380, 2008.
- KAUR, P.; GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K. In situ nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 1167-1176, 2016.
- KAVIRAJAN, H. Memantine: a comprehensive review of safety and efficacy. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 8, n. 1, p. 89-109, 2009.
- KEPP, K. P. Bioinorganic Chemistry of Alzheimer's Disease. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 10, p. 5193-5239, 2012.
- KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748-764, 2011.
- KIHARA, T.; SHIMOHAMA, S. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 64, n. 1, p. 99-105, 2004.
- KIM, Y. A.; LIM, S. Y.; RHEE, S. H.; PARK, K. Y.; KIM, C. H.; CHOI, B. T.; LEE, S. J.; PARK, Y. M.; CHOI, Y. H. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and

cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. **Int J Mol Med**, v. 17, n. 6, p. 1069-1075, 2006.

KIMATA, T.; SASAKURA, H.; OHNISHI, N.; NISHIO, N.; MORI, I. Thermotaxis of *C. elegans* as a model for temperature perception, neural information processing and neural plasticity. **Worm**, v. 1, n. 1, p. 31-41, 2012.

KNOBLOCH, M.; FARINELLI, M.; KONIETZKO, U.; NITSCH, R. M.; MANSUY, I. M. A β Oligomer-Mediated Long-Term Potentiation Impairment Involves Protein Phosphatase 1-Dependent Mechanisms. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 29, p. 7648-7653, 2007.

KOCKISCH, S.; REES, G. D.; YOUNG, S. A.; TSIBOUKLIS, J.; SMART, J. D. A direct-staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 1-2, p. 1-6, 2001.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331-352, 2016.

KOOP, H. S.; DE FREITAS, R. A.; DE SOUZA, M. M.; SAVI-JR, R.; SILVEIRA, J. L. M. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 229-236, 2015.

KOZMINSKI, M.; KUPCZYK, M. Thixotropy of nasal medications-its role in clinical practice. **Pneumonol Alergol Pol**, v. 83, n. 2, p. 157-163, 2015.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, p. S77-S98, 2002.

KRISTL, J.; TESKAČ, K.; CADDEO, C.; ABRAMOVIĆ, Z.; ŠENTJURC, M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 253-259, 2009.

KUHNLE, G.; SPENCER, J. P. E.; CHOWRIMOOTO, G.; SCHROETER, H.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K. S.; RICE-EVANS, C.; HAHN, U. Resveratrol Is Absorbed in the Small Intestine as Resveratrol Glucuronide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 1, p. 212-217, 2000.

LACK, C. D.; EL-AASSER, M. S.; VANDERHOFF, J. W.; FOWKES, F. M. Interfacial Phenomena of Miniemulsions. In: (Ed.). **Macro- and Microemulsions**: American Chemical Society, v.272, 1985. cap. 22, p.345-356. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-0896-4.

LAGOUGE, M.; ARGMANN, C.; GERHART-HINES, Z.; MEZIANE, H.; LERIN, C.; DAUSSIN, F.; MESSADEQ, N.; MILNE, J.; LAMBERT, P.; ELLIOTT, P. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, v. 127, 2006.

- LAHIRI, D. K.; FARLOW, M. R.; SAMBAMURTI, K.; GREIG, N. H.; GIACOBINI, E.; SCHNEIDER, L. S. A Critical Analysis of New Molecular Targets and Strategies for Drug Developments in Alzheimer's Disease. **Current Drug Targets**, v. 4, n. 2, p. 97-112, 2003.
- LAI, S. K.; WANG, Y.-Y.; WIRTZ, D.; HANES, J. Micro- and macrorheology of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 86-100, 2009.
- LAMBERT, M. P.; BARLOW, A. K.; CHROMY, B. A.; EDWARDS, C.; FREED, R.; LIOSATOS, M.; MORGAN, T. E.; ROZOVSKY, I.; TROMMER, B.; VIOLA, K. L.; WALS, P.; ZHANG, C.; FINCH, C. E.; KRAFFT, G. A.; KLEIN, W. L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6448-6453, 1998.
- LANCELOT, A.; SIERRA, T.; SERRANO, J. L. Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 4, p. 547-564, 2014.
- LANÇON, A.; DELMA, D.; OSMAN, H.; THÉNOT, J. P.; LATRUFFE, B. J. N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 4, p. 1132-1137, 2004.
- LANDES, A. M.; SPERRY, S. D.; STRAUSS, M. E.; GELDMACHER, D. S. Apathy in Alzheimer's Disease. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 49, n. 12, p. 1700-1707, 2001.
- LAPOINTE, N. E.; MORFINI, G.; PIGINO, G.; GAISINA, I. N.; KOZIKOWSKI, A. P.; BINDER, L. I.; BRADY, S. T. The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: Implications for filament toxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 2, p. 440-451, 2009.
- LARSSON, K. Cubic lipid-water phases: structures and biomembrane aspects. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 21, p. 7304-7314, 1989.
- LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: their use in drug delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 6, p. 417-424, 1994.
- LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88-98, 2009.
- LEE, J.; CULYBA, E. K.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. **Nat Chem Biol**, v. 7, n. 9, p. 602-609, 2011.
- LEE, J.; YOUNG, S. A.; KELLAWAY, I. W. Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 629-636, 2001.

LEHN, J.-M. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supramolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 27, n. 1, p. 89-112, 1988.

_____. Perspectives in Supramolecular Chemistry—From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 11, p. 1304-1319, 1990.

_____. **Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives**. New York: VHC, 1995.

LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A.; BODDE, H. E.; JUNGINGER, H. E. A surface energy analysis of mucoadhesion: contact angle measurements on polycarbophil and pig intestinal mucosa in physiologically relevant fluids. **Pharm Res**, v. 9, n. 1, p. 70-75, 1992.

LEI, P.; AYTON, S.; FINKELSTEIN, D. I.; ADLARD, P. A.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Tau protein: Relevance to Parkinson's disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 11, p. 1775-1778, 2010.

LEVY, M. Y.; BENITA, S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 66, n. 1-3, p. 29-37, 1990.

LIN, F.; JIA, J.; QIN, W. Enhancement of beta-amyloid oligomer accumulation after intracerebroventricular injection of streptozotocin, which involves central insulin signaling in a transgenic mouse model. **Neuroreport**, v. 25, n. 16, p. 1289-1295, 2014.

LIN, J.; WU, H.; TARR, P. T.; ZHANG, C. Y.; WU, Z.; BOSS, O.; MICHAEL, L. F.; PUIGSERVER, P.; ISOTANI, E.; OLSON, E. N.; LOWELL, B. B.; BASSEL-DUBY, R.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797-801, 2002.

LIN, T.-N.; WANG, Q.; SIMONYI, A.; CHEN, J.-J.; CHEUNG, W.-M.; Y. HE, Y.; XU, J.; SUN, A. Y.; HSU, C. Y.; SUN, G. Y. Induction of secretory phospholipase A2 in reactive astrocytes in response to transient focal cerebral ischemia in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 3, p. 637-645, 2004.

LIPSMAN, N.; MENG, Y.; BETHUNE, A. J.; HUANG, Y.; LAM, B.; MASELLIS, M.; HERRMANN, N.; HEYN, C.; AUBERT, I.; BOUTET, A.; SMITH, G. S.; HYNYNEN, K.; BLACK, S. E. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2336, 2018.

LITT, M. Comparative studies of mucus and mucin physicochemistry. **Ciba Found Symp**, v. 109, p. 196-211, 1984.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 614-628, 2012.

- LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A.; MAGAZ, S.; CALANDRA, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. **Advances in Condensed Matter Physics**, v. 2015, p. 22, 2015.
- LOVELL, M. A.; ROBERTSON, J. D.; TEESDALE, W. J.; CAMPBELL, J. L.; MARKESBERY, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 158, n. 1, p. 47-52, 1998.
- LUE, L.-F.; KUO, Y.-M.; ROHER, A. E.; BRACHOVA, L.; SHEN, Y.; SUE, L.; BEACH, T.; KURTH, J. H.; RYDEL, R. E.; ROGERS, J. Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 3, p. 853-862, 1999.
- LUO, L.; HUANG, Y. M. [Effect of resveratrol on the cognitive ability of Alzheimer's mice]. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 31, n. 4, p. 566-569, 2006.
- MA, T.; TAN, M.-S.; YU, J.-T.; TAN, L. Resveratrol as a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 350516, 2014.
- MA, X.; SUN, Z.; LIU, Y.; JIA, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, J. Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 22, p. 2050-2059, 2013.
- MADHUSOODANAN, S.; SHAH, P. Management of psychosis in patients with Alzheimer's disease: focus on aripiprazole. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 3, p. 491-501, 2008.
- MADHUSOODANAN, S.; SHAH, P.; BRENNER, R.; GUPTA, S. Pharmacological Treatment of the Psychosis of Alzheimer's Disease. **CNS Drugs**, v. 21, n. 2, p. 101-115, 2007.
- MAHDI JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 3, p. 475-485, 2006.
- MAHENDRA, N.; SCULLION, A.; HAMERSCHLAG, C. Cognitive-linguistic interventions for persons with dementia. **Topics in Geriatric Rehabilitation**, v. 27, n. 4, p. 278-288, 2011.
- MAIER-SALAMON, A.; HAGENAUER, B.; WIRTH, M.; GABOR, F.; SZEKERES, T.; JAGER, W. Increased transport of resveratrol across monolayers of the human intestinal Caco-2 cells is mediated by inhibition and saturation of metabolites. **Pharm Res**, v. 23, n. 9, p. 2107-2115, 2006.
- MALMSTEN, M. Liquid Crystals. In: (Ed.). **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**: CRC Press, 2002a. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). ISBN 978-0-8247-0804-7.

_____. **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**. New York: CRC Press, 2002b. 366

MALMSTEN, M. **Surfactants and polymers in drug delivery**. New York: Marcel Dekker, 2002. 348

MALMSTEN, M. Phase Transformations in Self-Assembly Systems for Drug Delivery Applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 63-72, 2007.

MARAGOS, W. F.; GREENAMYRE, J. T.; PENNEY JR, J. B.; YOUNG, A. B. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. **Trends in Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 65-68, 1987.

MARAMBAUD, P.; ZHAO, H.; DAVIES, P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **J Biol Chem**, v. 280, 2005.

MARK, L. P.; PROST, R. W.; ULMER, J. L.; SMITH, M. M.; DANIELS, D. L.; STROTTMANN, J. M.; BROWN, W. D.; HACEIN-BEY, L. Pictorial Review of Glutamate Excitotoxicity: Fundamental Concepts for Neuroimaging. **American Journal of Neuroradiology**, v. 22, n. 10, p. 1813-1824, 2001.

MARTIN, L.; LATYPOVA, X.; WILSON, C. M.; MAGNAUDEIX, A.; PERRIN, M.-L.; YARDIN, C.; TERRO, F. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 289-309, 2013.

MARTTIN, E.; SCHIPPER, N. G. M.; VERHOEF, J. C.; MERKUS, F. W. H. M. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, n. 1, p. 13-38, 1998.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635, 2006.

MASSOUD, F.; LÉGER, G. C. Pharmacological Treatment of Alzheimer Disease. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 56, n. 10, p. 579-588, 2011.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.

MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D. E.; LEHR, C. M. **Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development**. New York: Marcel Dekker, 1999. 696

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631-639, 2004.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.

_____. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MCLEAN, C. A.; CHERNY, R. A.; FRASER, F. W.; FULLER, S. J.; SMITH, M. J.; KONRAD, V.; BUSH, A. I.; MASTERS, C. L. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v. 46, n. 6, p. 860-866, 1999.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 8, 2012.

MENDOZA, E.; MIRANDA-BARRIENTOS, J. A.; VAZQUEZ-ROQUE, R. A.; MORALES-HERRERA, E.; RUELAS, A.; DE LA ROSA, G.; FLORES, G.; HERNANDEZ-ECHEAGARAY, E. In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. **Neuroscience**, v. 280, p. 156-170, 2014.

MENET, M.-C.; BARON, S.; TAGHI, M.; DIESTRA, R.; DARGÈRE, D.; LAPRÉVOTE, O.; NIVET-ANTOINE, V.; BEAUDEUX, J.-L.; BÉDARIDA, T.; COTTART, C.-H. Distribution of trans-resveratrol and its metabolites after acute or sustained administration in mouse heart, brain, and liver. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 8, p. 1600686-n/a, 2017.

MEZZENGA, R. Physics of Self-Assembly of Lyotropic Liquid Crystals. In: GARTI, N.; SOMASUNDARAN, P.; MEZZENGA, R. (Ed.). **Self-assembled supramolecular architectures : lyotropic liquid crystals**. Hoboken: Wiley, 2012. p.1-20.

MINATI, L.; EDGINTON, T.; GRAZIA BRUZZONE, M.; GIACCONE, G. Reviews: Current Concepts in Alzheimer's Disease: A Multidisciplinary Review. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®**, v. 24, n. 2, p. 95-121, 2009.

MISHRA, S. K.; SINGH, S.; SHUKLA, S.; SHUKLA, R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. **Neurochem Int**, v. 113, p. 56-68, 2018.

MITSUSHIMA, D.; SANO, A.; TAKAHASHI, T. A cholinergic trigger drives learning-induced plasticity at hippocampal synapses. **Nature Communications**, v. 4, 2013.

- MITTAL, D.; ALI, A.; MD, S.; BABOOTA, S.; SAHNI, J. K.; ALI, J. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. **Drug Deliv**, v. 21, n. 2, p. 75-86, 2014.
- MOLINUEVO, J. L.; LLADO, A.; RAMI, L. Memantine: targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and other dementias. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**, v. 20, n. 2, p. 77-85, 2005.
- MORRISON, E. E.; COSTANZO, R. M. Morphology of the human olfactory epithelium. **J Comp Neurol**, v. 297, n. 1, p. 1-13, 1990.
- MORTAZAVI, S. A.; CARPENTER, B. G.; SMART, J. D. An investigation of the rheological behaviour of the mucoadhesive/mucosal interface. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 83, n. 1-3, p. 221-225, 1982.
- MUDHER, A.; LOVESTONE, S. Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands? **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 1, p. 22-26, 2002.
- MUZZIO, M.; HUANG, Z.; HU, S.-C.; JOHNSON, W. D.; MCCORMICK, D. L.; KAPETANOVIC, I. M. Determination of resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in plasma by LC–MS/MS and their pharmacokinetics in dogs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, n. Supplement C, p. 201-208, 2012.
- NAKANO, M.; TESHIGAWARA, T.; SUGITA, A.; LEESAJAKUL, W.; TANIGUCHI, A.; KAMO, T.; MATSUOKA, H.; HANDA, T. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic Acid/Pluronic F127 System. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9283-9288, 2002.
- NEVES, A. R.; QUEIROZ, J. F.; REIS, S. Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 27, 2016.
- NIELSEN, L. S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems: I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 231-239, 1998.
- NIH. Medical Dictionary. 2017a. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/mplusdictionary.html>>.
- _____. NCI Dictionary of Cancer Terms. 2017b. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>>. Acesso em: 01.01.2017.
- NILSBERTH, C.; WESTLIND-DANIELSSON, A.; ECKMAN, C. B.; CONDRON, M. M.; AXELMAN, K.; FORSELL, C.; STENH, C.; LUTHMAN, J.; TEPLow, D. B.; YOUNKIN, S. G.; NASLUND, J.; LANNFELT, L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A[beta] protofibril formation. **Nat Neurosci**, v. 4, n. 9, p. 887-893, 2001.

- NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRÖM, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S. S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 9, p. 687-692, 1992.
- NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; MUNTEAN, C. Ultraviolet Irradiation of Trans-Resveratrol and HPLC Determination of Trans-Resveratrol and Cis-Resveratrol in Romanian Red Wines. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 10, p. 920-927, 2012.
- NYGÅRD, L. Instrumental activities of daily living: a stepping-stone towards Alzheimer's disease diagnosis in subjects with mild cognitive impairment? **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 107, p. 42-46, 2003.
- O'BRIEN, K. A. F.; JONES, P. A.; ROCKLEY, J. Evaluation of an agarose overlay assay to determine the eye irritation potential of detergent-based products. **Toxicology in Vitro**, v. 4, n. 4, p. 311-313, 1990.
- O'NEIL, M. J.; HECKELMAN, P. E.; KOCH, C. B.; ROMAN, K. J.; KENNY, C. M.; D'ARECCA, M. R. **The Merck Index**. 4. ed. Whitehouse Station: Merck Publishing, 2006.
- OHNISHI, S.; TAKANO, K. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 5, p. 511-524, 2004.
- OKAMOTO, Y.; MASUM, S. M.; MIYAZAWA, H.; YAMAZAKI, M. Low-pH-Induced Transformation of Bilayer Membrane into Bicontinuous Cubic Phase in Dioleoylphosphatidylserine/Monoolein Membranes. **Langmuir**, v. 24, n. 7, p. 3400-3406, 2008.
- OLIVEIRA CARDOSO, V. M. D.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; EVANGELISTA, R. C.; DAFLON GREMIÃO, M. P. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 317-333, 2017.
- OLMSTED, S. S.; PADGETT, J. L.; YUDIN, A. I.; WHALEY, K. J.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 4, p. 1930-1937, 2001.
- PARDESHI, C. V.; BELGAMWAR, V. S. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 7, p. 957-972, 2013.
- PARDRIDGE, W. M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. **NeuroRX**, v. 2, n. 1, p. 3-14, 2005.
- PARMAR, N.; SINGLA, N.; AMIN, S.; KOHLI, K. Study of cosurfactant effect on nanoemulsifying area and development of lercanidipine loaded (SNEDDS) self

nanoemulsifying drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 327-338, 2011.

PARSONS, C. G.; STÖFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 6, p. 699-723, 2007.

PASINETTI, G. M.; WANG, J.; HO, L.; ZHAO, W.; DUBNER, L. Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 6, p. 1202-1208, 2015.

PATEL, R.; PATEL, T. N. Liquid crystals and their application in the field of drug delivery. In: FANUN, M. (Ed.). **Colloids in Drug Delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p.311-336.

PATERSON, D.; NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 75-111, 2000.

PEPPAS, N. A.; BURI, P. A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. **Journal of Controlled Release**, v. 2, p. 257-275, 1985.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v. 17, n. 16, p. 1553-1561, 1996.

PERRY, E.; MARTIN-RUIZ, C.; LEE, M.; GRIFFITHS, M.; JOHNSON, M.; PIGGOTT, M.; HAROUTUNIAN, V.; DANIEL BUXBAUM, J.; NÄSLAND, J.; DAVIS, K.; GOTTI, C.; CLEMENTI, F.; TZARTOS, S.; COHEN, O.; SOREQ, H.; JAROS, E.; PERRY, R.; BALLARD, C.; MCKEITH, I.; COURT, J. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 393, n. 1-3, p. 215-222, 2000.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-129, 2012.

PICCIOTTO, M. R.; ZOLI, M. Nicotinic receptors in aging and dementia. **Journal of Neurobiology**, v. 53, n. 4, p. 641-655, 2002.

PIMPLIKAR, S. W. Reassessing the Amyloid Cascade Hypothesis of Alzheimer's Disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 6, p. 1261-1268, 2009.

PONCE-LOPEZ, T.; HONG, E.; ABASCAL-DÍAZ, M.; MENESES, A. Role of GSK3 β and PP2A on regulation of Tau phosphorylation in hippocampus and memory impairment in ICV-STZ animal model of Alzheimer's disease. **Advances in Alzheimer's Disease**, v. 6, n. 01, p. 13, 2017.

- POPOVIĆ, M.; BIESELS, G.-J.; ISAACSON, R. L.; GISPEN, W. H. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. **Behavioural Brain Research**, v. 122, n. 2, p. 201-207, 2001.
- POTTER, K. A.; BUCK, A. C.; SELF, W. K.; CALLANAN, M. E.; SUNIL, S.; CAPADONA, J. R. The effect of resveratrol on neurodegeneration and blood brain barrier stability surrounding intracortical microelectrodes. **Biomaterials**, v. 34, n. 29, p. 7001-7015, 2013.
- PRESTON, ALISON R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R764-R773, 2013.
- PRILLER, C.; BAUER, T.; MITTEREGGER, G.; KREBS, B.; KRETZSCHMAR, H. A.; HERMS, J. Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 27, p. 7212-7221, 2006.
- PRINCE, L. M. A theory of aqueous emulsions I. Negative interfacial tension at the oil/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 23, n. 2, p. 165-173, 1967.
- PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E.; WIMO, A.; RIBEIRO, W.; FERRI, C. P. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 1, p. 63-75, 2013.
- PUESKUELEV, G.; ZARNOREC.O; KABAIVANOV, V. Influence of polyvinylpyrrolidone (PVP) during synthesis of ultrafine emulsions. **Journal of Photographic Science**, v. 22, n. 5, p. 235-238, 1974.
- PUGLIELLI, L.; FRIEDLICH, A. L.; SETCHELL, K. D. R.; NAGANO, S.; OPAZO, C.; CHERNY, R. A.; BARNHAM, K. J.; WADE, J. D.; MELOV, S.; KOVACS, D. M.; BUSH, A. I. Alzheimer disease β -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2556-2563, 2005.
- PUZZO, D.; PRIVITERA, L.; LEZNIK, E.; FÀ, M.; STANISZEWSKI, A.; PALMERI, A.; ARANCIO, O. Picomolar Amyloid- β Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 53, p. 14537-14545, 2008.
- QIN, W.; HAROUTUNIAN, V.; KATSEL, P.; CARDOZO, C. P.; HO, L.; BUXBAUM, J. D.; PASINETTI, G. M. PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. **Arch Neurol**, v. 66, n. 3, p. 352-361, 2009.
- QIU, H.; CAFFREY, M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. **Biomaterials**, v. 21, n. 3, p. 223-234, 2000.
- QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329-344, 2010.
- RAHMAN, M. A.; HUSSAIN, A.; HUSSAIN, M. S.; MIRZA, M. A.; IQBAL, Z. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug

delivery system (SEDDS/SMEDDS). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 1, p. 1-19, 2013.

RAI, S.; KAMAT, P. K.; NATH, C.; SHUKLA, R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 117, p. 104-117, 2014.

RAINA, P.; SANTAGUIDA, P.; ISMAILA, A.; ET AL. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: Evidence review for a clinical practice guideline. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 5, p. 379-397, 2008.

RAJPUT, A. P.; BUTANI, S. B. Resveratrol anchored nanostructured lipid carrier loaded in situ gel via nasal route: Formulation, optimization and in vivo characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 214-223, 2019.

RAJSHREE, L. S.; ANIL, B. J.; PADMA, V. D. Microemulsions and Nanoemulsions for Targeted Drug Delivery to the Brain. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 1, p. 119-133, 2011.

RAMMES, G.; DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Pharmacodynamics of Memantine: An Update. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 1, p. 55-78, 2008.

RAMOS, M. A. S.; CALIXTO, G.; DE TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; DO SSANTOS, L. C.; DE ALMEIDA, M. T. G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7455-7466, 2015.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Stabilization of Phase Inversion Temperature Nanoemulsions by Surfactant Displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 7059-7066, 2010.

RASGON, N.; JARVIK, L. Insulin Resistance, Affective Disorders, and Alzheimer's Disease: Review and Hypothesis. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 2, p. M178-M183, 2004.

RASMUSSEN, D. D. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. **Behavioural Brain Research**, v. 115, n. 2, p. 205-218, 2000.

RAVELLI, K. G.; ROSÁRIO, B. D. A.; CAMARINI, R.; HERNANDES, M. S.; BRITTO, L. R. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 31, n. 3, p. 327-333, 2017.

RAWLINS, M. D. Cutting the cost of drug development? **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 4, p. 360-364, 2004.

REDDY, P. H.; TRIPATHI, R.; TROUNG, Q.; TIRUMALA, K.; REDDY, T. P.; ANEKONDA, V.; SHIRENDEB, U. P.; CALKINS, M. J.; REDDY, A. P.; MAO, P.;

- MANCZAK, M. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 5, p. 639-649, 2012.
- REGE, S. D.; GEETHA, T.; GRIFFIN, G. D.; BRODERICK, T. L.; BABU, J. R. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 218, 2014.
- REGER, M. A.; WATSON, G. S.; FREY, W. H.; BAKER, L. D.; CHOLERTON, B.; KEELING, M. L.; BELONGIA, D. A.; FISHEL, M. A.; PLYMATE, S. R.; SCHELLENBERG, G. D.; CHERRIER, M. M.; CRAFT, S. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 3, p. 451-458, 2006.
- REHMAN, F. U.; SHAH, K. U.; SHAH, S. U.; KHAN, I. U.; KHAN, G. M.; KHAN, A. From nanoemulsions to self-nanoemulsions, with recent advances in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). **Expert Opinion on Drug Delivery**, p. 1-16, 2016.
- REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 3, p. 137-152, 2011.
- REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640-651, 2014.
- REN, X.; SVIRSKIS, D.; ALANY, R. G.; ZARGAR-SHOSHTARI, S.; WU, Z. In-situ phase transition from microemulsion to liquid crystal with the potential of prolonged parenteral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, n. 1-2, p. 130-137, 2012.
- RIVIERE, C.; RICHARD, T.; QUENTIN, L.; KRISA, S.; MERILLON, J. M.; MONTI, J. P. Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. **Bioorg Med Chem**, v. 15, 2007.
- ROBAKIS, N. Mechanisms of neuronal death in familial Alzheimer disease and therapeutic implications. **Neurobiology of Aging**, v. 39, p. S14, 2016.
- ROBERT, A.; LIU, Y.; NGUYEN, M.; MEUNIER, B. Regulation of Copper and Iron Homeostasis by Metal Chelators: A Possible Chemotherapy for Alzheimer's Disease. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 5, p. 1332-1339, 2015.
- ROBINSON, K.; MOCK, C.; LIANG, D. Pre-formulation studies of resveratrol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 9, p. 1464-1469, 2015.
- RODERO, C. F.; FIORAMONTI CALIXTO, G. M.; CRISTINA DOS SANTOS, K.; SATO, M. R.; APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, M.; MIRÓ, M. S.; RODRÍGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E.; CHORILLI, M. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 4491-4504, 2018.

- ROTCHES-RIBALTA, M.; ANDRES-LACUEVA, C.; ESTRUCH, R.; ESCRIBANO, E.; URPI-SARDA, M. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 5, p. 375-382, 2012.
- SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E.; WATZKE, H. J.; MICHEL, M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 204-214, 2006.
- SALE, S.; VERSCHOYLE, R. D.; BOOCOCK, D.; JONES, D. J. L.; WILSHER, N.; RUPARELIA, K. C.; POTTER, G. A.; FARMER, P. B.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 3, p. 736-744, 2004.
- SALMAZI, R.; CALIXTO, G.; BERNEGOSI, J.; APARECIDO DOS, M.; RAMOS, S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. A Curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4815-4824, 2015.
- SANTOS, A. C.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. J. New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 8, n. 8, p. 973-990, 2011.
- SANTOS, K. C. D. **Avaliação do potencial de sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração nasal de rifampicina aplicáveis na terapia da tuberculose**. 2018. 150 Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- SANTOS, M. A.; CHAND, K.; CHAVES, S. Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327–328, p. 287-303, 2016.
- SANTOS, S. D.; MEDRONHO, B.; SANTOS, T. D.; ANTUNES, F. E. Amphiphilic Molecules in Drug Delivery Systems. In: COELHO, J. (Ed.). **Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment**. New York: Springer 2013. p.35-85. (Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine).
- SAVASKAN, E.; OLIVIERI, G.; MEIER, F.; SEIFRITZ, E.; WIRZ-JUSTICE, A.; MULLER-SPAHN, F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. **Gerontology**, v. 49, 2003.
- SAVELIEFF, M. G.; LEE, S.; LIU, Y.; LIM, M. H. Untangling Amyloid- β , Tau, and Metals in Alzheimer's Disease. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 856-865, 2013.
- SAVVA, G. M.; ZACCAI, J.; MATTHEWS, F. E.; DAVIDSON, J. E.; MCKEITH, I.; BRAYNE, C. Prevalence, correlates and course of behavioural and psychological

symptoms of dementia in the population. **The British Journal of Psychiatry**, v. 194, n. 3, p. 212, 2009.

SAWDA, C.; MOUSSA, C.; TURNER, R. S. Resveratrol for Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1403, n. 1, p. 142-149, 2017.

SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **Int J Biol Macromol**, v. 48, n. 2, p. 263-270, 2011.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. **Gene**, v. 286, n. 1, p. 81-89, 2002.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555-563, 2011.

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; DA ROSA, M. M.; RUBIN, M. A.; CHITOLINA SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1, p. 42-48, 2009.

SCHNEIDER, L. S.; MANGIALASCHE, F.; ANDREASEN, N.; FELDMAN, H.; GIACOBINI, E.; JONES, R.; MANTUA, V.; MECOCCHI, P.; PANI, L.; WINBLAD, B.; KIVIPELTO, M. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. **Journal of Internal Medicine**, v. 275, n. 3, p. 251-283, 2014.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1677-1680, 1959.

SCHWARTZ, N. O. Adaptation of the sensory texture profile method to skin care products. **Journal of Texture Studies**, v. 6, n. 1, p. 33-42, 1975.

SELKOE, D.; MANDELKOW, E.; HOLTZMAN, D. Deciphering Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, 2012.

SELKOE, D. J. Amyloid β -Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18295-18298, 1996.

_____. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

SENGUPTA, A.; KABAT, J.; NOVAK, M.; WU, Q.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 357, n. 2, p. 299-309, 1998.

- SERGEANT, N.; BRETTEVILLE, A.; HAMDANE, M.; CAILLET-BOUDIN, M. L.; GROGNET, P.; BOMBOIS, S.; BLUM, D.; DELACOURTE, A.; PASQUIER, F.; VANMECHELEN, E. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. **Expert Rev Proteomics**, v. 5, 2008.
- SERGIDES, C.; CHIRILĂ, M.; SILVESTRO, L.; PITTA, D.; PITTAS, A. Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 1, p. 164-170, 2016.
- SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.
- SHADAB, A. P.; ZEENAT, I.; SYED, M. A. Z.; SUSHMA, T.; DIVYA, V.; GAURAV, K. J.; ADNAN, A.; NITIN, J.; JIGAR, R. L.; ROOP, K. K.; FARHAN, J. A. CNS Drug Delivery Systems: Novel Approaches. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 1, p. 71-89, 2009.
- SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.
- SHIMOHAMA, S.; TANIGUCHI, T.; FUJIWARA, M.; KAMEYAMA, M. Changes in Nicotinic and Muscarinic Cholinergic Receptors in Alzheimer-Type Dementia. **Journal of Neurochemistry**, v. 46, n. 1, p. 288-293, 1986.
- SHIN, J. A.; OH, S.; AHN, J.-H.; PARK, E.-M. Estrogen receptor-mediated resveratrol actions on blood-brain barrier of ovariectomized mice. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 2, p. 993-1006, 2015.
- SHU, X.-H.; WANG, L.-L.; LI, H.; SONG, X.; SHI, S.; GU, J.-Y.; WU, M.-L.; CHEN, X.-Y.; KONG, Q.-Y.; LIU, J. Diffusion Efficiency and Bioavailability of Resveratrol Administered to Rat Brain by Different Routes: Therapeutic Implications. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 491-501, 2015.
- SILVA, L. F. D.; GUERRA, C. C.; CZERMAINSKI, A. B. C.; FERRARI, L.; BERGOLD, A. M. Validation of a chromatographic method to routine analysis of trans-resveratrol and quercetin in red wines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 335-343, 2017.
- SINGH, B.; BANDOPADHYAY, S.; KAPIL, R.; SINGH, R.; KATARE, O. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 26, n. 5, p. 427-521, 2009.
- SINGH, R. M.; KUMAR, A.; PATHAK, K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 10, n. 1, p. 115-130, 2013.
- SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v. 324, n. 2-4, p. 107-269, 2000.

SLOANE, P. D. Advances in the treatment of Alzheimer's disease. **Am Fam Physician**, v. 58, n. 7, p. 1577-1586, 1589-1590, 1998.

SLOMKOWSKI, S.; ALEMÁN, J. V.; GILBERT, R. G.; HESS, M.; HORIE, K.; JONES, R. G.; KUBISA, P.; MEISEL, I.; MORMANN, W.; PENCZEK, S.; STEPTO, R. F. T. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2229-2259, 2011.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

_____. Theories of Mucoadhesion. In: (Ed.). **Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems**: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p.159-174. ISBN 9781118794203.

SMART, J. D.; KELLAWAY, I. W. *In vitro* techniques for measuring mucoadhesion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 34, n. 12 S, p. 70P-70P, 1982.

SMITH, M. A.; ROTTKAMP, C. A.; NUNOMURA, A.; RAINA, A. K.; PERRY, G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1502, n. 1, p. 139-144, 2000.

SOLANS, C.; KUNIEDA, H. **Industrial Applications of Microemulsions**. New York: Marcel Dekker, 1997.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2012.

SOLEAS, G. J.; ANGELINI, M.; GRASS, L.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Absorption of trans-resveratrol in rats. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.335, 2001. p.145-154. ISBN 0076-6879.

SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030-2075, 2014.

SOUZA, C.; WATANABE, E.; BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DE ABREU FANTINI, M. C.; LARA, M. G. Mucoadhesive System Formed by Liquid Crystals for Buccal Administration of Poly(Hexamethylene Biguanide) Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 12, p. 3914-3923, 2014.

SOUZA, M. M.; MELLO E SOUZA, T.; VINADE, E. R.; RODRIGUES, C.; CHOI, H. K.; DEDAVID E SILVA, T. L.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Effects of Posttraining Treatments in the Posterior Cingulate Cortex on Short- and Long-Term Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 77, n. 2, p. 202-210, 2002.

- SPALLETTA, G.; MUSICCO, M.; PADOVANI, A.; PERRI, R.; FADDA, L.; CANONICO, V.; TREQUATTRINI, A.; PETTENATI, C.; CALTAGIRONE, C.; PALMER, K.; ROZZINI, L. Neuropsychiatric Symptoms and Syndromes in a Large Cohort of Newly Diagnosed, Untreated Patients With Alzheimer Disease. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 1026-1035, 2010.
- SPICER, P.; SMALL, W., II; SMALL, W.; LYNCH, M.; BURNS, J. Dry Powder Precursors of Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles (cubosomes). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 4, n. 4, p. 297-311, 2002.
- SQUIRE, L. R.; STARK, C. E. L.; CLARK, R. E. THE MEDIAL TEMPORAL LOBE. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 279-306, 2004.
- SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Mucoadhesion of pectin as evidence by wettability and chain interpenetration. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 458-467, 2008.
- STREIT, W. J. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 1, p. 1-8, 2004.
- STROZYK, D.; LAUNER, L. J.; ADLARD, P. A.; CHERNY, R. A.; TSATSANIS, A.; VOLITAKIS, I.; BLENNOW, K.; PETROVITCH, H.; WHITE, L. R.; BUSH, A. I. Zinc and copper modulate Alzheimer A β levels in human cerebrospinal fluid. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 7, p. 1069-1077, 2009.
- STUART, A. L. The Molecular Basis of Memantine Action in Alzheimers Disease and Other Neurologic Disorders: Low-affinity, Uncompetitive Antagonism. **Current Alzheimer Research**, v. 2, n. 2, p. 155-165, 2005.
- SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, p. 133, 2018.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.
- TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1583-1594, 2005.
- TALER, V.; PHILLIPS, N. A. Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A comparative review. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 30, n. 5, p. 501-556, 2008.
- TAMADDONFARD, E.; FARSHID, A. A.; ASRI-REZAEE, S.; JAVADI, S.; KHOSRAVI, V.; RAHMAN, B.; MIRFAKHRAEE, Z. Crocin improved learning and memory impairments in streptozotocin-induced diabetic rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 1, p. 91-100, 2013.

- TAN, Y. T. F.; PEH, K. K.; AL-HANBALI, O. Effect of carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, rheological, and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. **AAPS PharmSciTech**, v. 1, n. 3, p. 69-78, 2000.
- TATSCH, M. F.; DE CAMPOS BOTTINO, C. M.; AZEVEDO, D.; HOTOTIAN, S. R.; MOSCOSO, M. A.; FOLQUITTO, J. C.; SCALCO, A. Z.; LOUZÃ, M. R. Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer Disease and Cognitively Impaired, Nondemented Elderly From a Community-Based Sample in Brazil: Prevalence and Relationship With Dementia Severity. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 438-445, 2006.
- TAYLOR, P.; RADIC, Z. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 281-320, 1994.
- TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 821-827, 2003.
- TERRY, R. D.; MASLIAH, E.; SALMON, D. P.; BUTTERS, N.; DETERESA, R.; HILL, R.; HANSEN, L. A.; KATZMAN, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Ann Neurol**, v. 30, 1991.
- THAKUR, R. K.; VILLETTE, C.; AUBRY, J. M.; DELAPLACE, G. Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 285-293, 2008.
- THORNE, R. G.; FREY, W. H. Delivery of Neurotrophic Factors to the Central Nervous System. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 12, p. 907-946, 2001.
- TIIMAN, A.; PALUMAA, P.; TÕUGU, V. The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease – Metal ions. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 367-378, 2013.
- TIRABOSCHI, P.; HANSEN, L.; THAL, L.; COREY-BLOOM, J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. **Neurology**, v. 62, n. 11, p. 1984-1989, 2004.
- TODD, S.; BARR, S.; ROBERTS, M.; PASSMORE, A. P. Survival in dementia and predictors of mortality: a review. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 28, n. 11, p. 1109-1124, 2013.
- TOLARDO, R.; ZETTERMAN, L.; BITENCOURTT, D. R.; MORA, T. C.; DE OLIVEIRA, F. L.; BIAVATTI, M. W.; AMOAH, S. K. S.; BÜRGER, C.; DE SOUZA, M. M. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense*

and isolated sesquiterpene lactones in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 63-70, 2010.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

TROTTA, V.; PAVAN, B.; FERRARO, L.; BEGGIATO, S.; TRAINI, D.; DES REIS, L. G.; SCALIA, S.; DALPIAZ, A. Brain targeting of resveratrol by nasal administration of chitosan-coated lipid microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, p. 250-259, 2018.

TURNER, P. R.; O'CONNOR, K.; TATE, W. P.; ABRAHAM, W. C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 1, p. 1-32, 2003.

TURNER, R. S.; THOMAS, R. G.; CRAFT, S.; VAN DYCK, C. H.; MINTZER, J.; REYNOLDS, B. A.; BREWER, J. B.; RISSMAN, R. A.; RAMAN, R.; AISEN, P. S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v. 85, n. 16, p. 1383-1391, 2015.

UCHOA, M. F.; MOSER, V. A.; PIKE, C. J. Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 43, p. 60-82, 2016.

URPÍ-SARDÀ, M.; JÁUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; JAEGER, W.; MIKSITS, M.; COVAS, M. I.; ANDRES-LACUEVA, C. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 3149-3155, 2005.

VAN BROECK, B.; VAN BROECKHOVEN, C.; KUMAR-SINGH, S. Current Insights into Molecular Mechanisms of Alzheimer Disease and Their Implications for Therapeutic Approaches. **Neurodegenerative Diseases**, v. 4, n. 5, p. 349-365, 2007.

VERMA, G.; HASSAN, P. A. Self assembled materials: design strategies and drug delivery perspectives. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 40, p. 17016-17028, 2013.

VIAN, L.; VINCENT, J.; MAURIN, J.; FABRE, I.; GIROUX, J.; CANO, J. P. Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. **Toxicol In Vitro**, v. 9, n. 2, p. 185-190, 1995.

VIAN, M. A.; TOMAO, V.; GALLET, S.; COULOMB, P. O.; LACOMBE, J. M. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 224-229, 2005.

- VIJAYAKUMAR, M. R.; KUMARI, L.; PATEL, K. K.; VUDDANDA, P. R.; VAJANTHRI, K. Y.; MAHTO, S. K.; SINGH, S. Intravenous administration of trans-resveratrol-loaded TPGS-coated solid lipid nanoparticles for prolonged systemic circulation, passive brain targeting and improved in vitro cytotoxicity against C6 glioma cell lines. **RSC Advances**, v. 6, n. 55, p. 50336-50348, 2016.
- VINGTDEUX, V.; DRESES-WERRINGLOER, U.; ZHAO, H.; DAVIES, P.; MARAMBAUD, P. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. **BMC Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. S6, 2008.
- VINGTDEUX, V.; GILIBERTO, L.; ZHAO, H.; CHANDAKKAR, P.; WU, Q.; SIMON, J. E.; JANLE, E. M.; LOBO, J.; FERRUZZI, M. G.; DAVIES, P.; MARAMBAUD, P. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. **J Biol Chem**, v. 285, n. 12, p. 9100-9113, 2010.
- WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 9-15, 2011.
- WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos**, v. 32, 2004.
- WALSH, D. M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J. V.; CULLEN, W. K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; ROWAN, M. J.; SELKOE, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid [beta] protein potentially inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 535-539, 2002.
- WAN, W.; CHEN, H.; LI, Y. The potential mechanisms of Abeta-receptor for advanced glycation end-products interaction disrupting tight junctions of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. **Int J Neurosci**, v. 124, n. 2, p. 75-81, 2014.
- WANG, F.; JIANG, X.; LU, W. Profiles of methotrexate in blood and CSF following intranasal and intravenous administration to rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1, p. 1-7, 2003.
- WANG, H.-W.; PASTERNAK, J. F.; KUO, H.; RISTIC, H.; LAMBERT, M. P.; CHROMY, B.; VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L.; STINE, W. B.; KRAFFT, G. A.; TROMMER, B. L. Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. **Brain Research**, v. 924, n. 2, p. 133-140, 2002.
- WANG, J.; YU, J.-T.; WANG, H.-F.; MENG, X.-F.; WANG, C.; TAN, C.-C.; TAN, L. Pharmacological treatment of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, 2014.
- WANG, K.; SONG, F.; WANG, H.; WANG, J.-H.; SUN, Y. Quetiapine Attenuates the Neuroinflammation and Executive Function Deficit in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 8, 2019.

- WANG, L.; LIU, W.; FAN, Y.; LIU, T.; YU, C. Effect of rosiglitazone on amyloid precursor protein processing and A β clearance in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 20, n. 5, p. 474-480, 2017.
- WANG, R.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZHANG, C. Resveratrol ameliorates spatial learning memory impairment induced by A β ₁₋₄₂ in rats. **Neuroscience**, v. 344, p. 39-47, 2017.
- WANG, X.; LIU, G.; MA, J.; GUO, S.; GAO, L.; JIA, Y.; LI, X.; ZHANG, Q. In situ gel-forming system: an attractive alternative for nasal drug delivery. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 30, n. 5, p. 411-434, 2013.
- WARNKEN, Z. N.; SMYTH, H. D. C.; WATTS, A. B.; WEITMAN, S.; KUHN, J. G.; WILLIAMS, R. O. Formulation and device design to increase nose to brain drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 213-222, 2016.
- WASHINGTON, N.; WASHINGTON, C.; WILSON, C. **Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption**. 2nd edition. Londres: Taylor & Francis, 2001. 211
- WAŚIK, A.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 851-860, 2017.
- WATKINS, P. B.; ZIMMERMAN, H. J.; KNAPP, M. J.; GRACON, S. I.; LEWIS, K. W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with alzheimer's disease. **JAMA**, v. 271, n. 13, p. 992-998, 1994.
- WATSON, G. S.; CRAFT, S. The Role of Insulin Resistance in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **CNS Drugs**, v. 17, n. 1, p. 27-45, 2003.
- WATTS, P.; SMITH, A. PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 6, n. 5, p. 543-552, 2009.
- WEKSLER, B.; ROMERO, I. A.; COURAUD, P. O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. **Fluids Barriers CNS**, v. 10, n. 1, p. 16, 2013.
- WENK, G. L. The Nucleus Basalis Magnocellularis Cholinergic System: One Hundred Years of Progress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 67, n. 2, p. 85-95, 1997.
- WENNERSTRÖM, H.; BALOGH, J.; OLSSON, U. Interfacial tensions in microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 291, n. 1-3, p. 69-77, 2006.
- WENTRUP, A.; OERTEL, W. H.; DODEL, R. Once-daily transdermal rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease. **Drug design, development and therapy**, v. 2, p. 245-254, 2008.

- WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, 2005.
- WHITESIDES, G. M.; MATHIAS, J. P.; SETO, C. T. Molecular self-assembly and nanochemistry: A chemical strategy for the synthesis of nanostructures. **Science**, v. 254, n. 5036, p. 1312-1319, 1991.
- WHO. Dementia. Fact sheet. 2016. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en>>. Acesso em: 24/11/2016.
- WIELAND, G.; GERD, J.; PETER, R. Functional Neurochemistry of Alzheimers Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 3, p. 265-293, 2004.
- WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M.-J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 1, p. 48-77, 2011.
- WIMO, A.; JÖNSSON, L.; BOND, J.; PRINCE, M.; WINBLAD, B. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 9, n. 1, p. 1-11.e13, 2010.
- WINSLOW, B. T.; ONYSKO, M. K.; STOB, C. M.; HAZLEWOOD, K. A. Treatment of Alzheimer disease. **Am Fam Physician**, v. 83, n. 12, p. 1403-1412, 2011.
- WINSOR, P. A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, n. 0, p. 376-398, 1948.
- WU, H.; HU, K.; JIANG, X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 10, p. 1159-1168, 2008.
- WU, H.; LI, J.; ZHANG, Q.; YAN, X.; GUO, L.; GAO, X.; QIU, M.; JIANG, X.; LAI, R.; CHEN, H. A novel small Odorranalectin-bearing cubosomes: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on amyloid- β 25–35-treated rats following intranasal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 368-378, 2012.
- WYSS-CORAY, T.; ROGERS, J. Inflammation in Alzheimer Disease—A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, p. a006346, 2012.
- XIA, M.; CHENG, X.; YI, R.; GAO, D.; XIONG, J. The Binding Receptors of A β : an Alternative Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 455-471, 2016.
- XIA, P.; CHEN, H.-S. V.; ZHANG, D.; LIPTON, S. A. Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 33, p. 11246, 2010.

- YAGHMUR, A.; DE CAMPO, L.; SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E.; GLATTER, O. Emulsified Microemulsions and Oil-Containing Liquid Crystalline Phases. **Langmuir**, v. 21, n. 2, p. 569-577, 2004.
- _____. Control of the Internal Structure of MLO-Based Isosomes by the Addition of Diglycerol Monooleate and Soybean Phosphatidylcholine. **Langmuir**, v. 22, n. 24, p. 9919-9927, 2006.
- YAGHMUR, A.; KRIECHBAUM, M.; AMENITSCH, H.; STEINHART, M.; LAGGNER, P.; RAPPOLT, M. Effects of Pressure and Temperature on the Self-Assembled Fully Hydrated Nanostructures of Monoolein–Oil Systems. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 1177-1185, 2009.
- YAMADA, M.; CHIBA, T.; SASABE, J.; NAWA, M.; TAJIMA, H.; NIIKURA, T.; TERASHITA, K.; AISO, S.; KITA, Y.; MATSUOKA, M.; NISHIMOTO, I. Implanted cannula-mediated repetitive administration of A β 25–35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 139-146, 2005.
- YANG, H.-Q.; PAN, J.; BA, M.-W.; SUN, Z.-K.; MA, G.-Z.; LU, G.-Q.; XIAO, Q.; CHEN, S.-D. New protein kinase C activator regulates amyloid precursor protein processing in vitro by increasing α -secretase activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 381-391, 2007.
- YANG, Y.; MARSHALL-BRETON, C.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 398-406, 2012.
- YANKNER, B.; DUFFY, L.; KIRSCHNER, D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. **Science**, v. 250, n. 4978, p. 279-282, 1990.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 9, p. 422-433, 2004.
- YU, C.; GEUN SHIN, Y.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J. W.; SUP LEE, Y.; HIRSCHELMAN, W. H.; PEZZUTO, J. M.; MEHTA, R. G.; VAN BREEMEN, R. B. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 12, p. 1907-1914, 2002.
- YU, T.; ANDREWS, G. P.; JONES, D. S. Mucoadhesion and Characterization of Mucoadhesive Properties. In: NEVES, J.; SARMENTO, B. (Ed.). **Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals Biology, Challenges and Strategies**. London: Springer, 2014. p.35-58.
- ZANA, R. Microemulsions. **Heterogeneous Chemistry Reviews**, v. 1, n. 2, p. 145-157, 1994.

ZAREI, M.; BECKMANN, C. F.; BINNEWIJZEND, M. A. A.; SCHOONHEIM, M. M.; OGHABIAN, M. A.; SANZ-ARIGITA, E. J.; SCHELTENS, P.; MATTHEWS, P. M.; BARKHOF, F. Functional segmentation of the hippocampus in the healthy human brain and in Alzheimer's disease. **NeuroImage**, v. 66, p. 28-35, 2013.

ZATTA, P.; DRAGO, D.; BOLOGNIN, S.; SENSI, S. L. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 7, p. 346-355, 2009.

ZHAO, H. F.; LI, N.; WANG, Q.; CHENG, X. J.; LI, X. M.; LIU, T. T. Resveratrol decreases the insoluble A β 1–42 level in hippocampus and protects the integrity of the blood–brain barrier in AD rats. **Neuroscience**, v. 310, p. 641-649, 2015.

ZOTOVA, E.; NICOLL, J. A. R.; KALARIA, R.; HOLMES, C.; BOCHE, D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-1, 2010.

ANEXO A – CÓPIA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UNIVALI)



PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNIVALI

Protocolo: 058/18p	Data: 12/12/2018
Título: Efeito nootrópico de sistemas precursores de cristais líquidos contendo trans-resveratrol administrados pela via intranasal em modelo de Alzheimer em camundongos	
Coordenador do Projeto: Márcia Maria de Souza	
Executores: Bruno da Fonseca dos Santos	
Colaboradores: Camila André Cazarin, Ana Elisa Gonçalves,	
Objetivo geral Investigar as propriedades nootrópicas <i>in vivo</i> de formulações contendo RES sobre os déficits cognitivos de camundongos com Alzheimer induzido.	
Objetivos específicos:	
I. Avaliar a ação nootrópica de formulações contendo RES pela administração intranasal em modelos induzidos de DA em camundongos,	
II. Avaliar o efeito de memória aversiva (esquiva inibitória), memória espacial (reconhecimento de objetos) e deambulação (campo aberto) das formulações nesse modelo animal.	

I. RESUMO:

A doença de Alzheimer (DA) é uma **desordem neurodegenerativa** que consiste na causa mais comum de demência. Essa patologia cursa comprometimento da memória, declínio cognitivo e com sintomas neuropsiquiátricos associados, com destaque para a ansiedade. O **trans-resveratrol (RES)** é um fitoconstituente e esse composto tem sido estudado como **promissor candidato a fármacos** para o tratamento da DA, apresentando importantes propriedades de **inibição da acetilcolinesterase** e **atividade contra a agregação β -amiloide**. O presente estudo visa investigar a propriedade desse composto veiculado em um **sistema nanoestruturado** e administrado pela via nasal sobre **deficits cognitivos** de camundongos fêmeas Swiss (3 meses de idade, cerca de 25 a 30 g) com Alzheimer induzido por **estreptozotocina (STZ 2,5 mg/mL, i.c.v.)**. Após a indução, os animais foram divididos em grupos distintos: G1 – Sham (grupo operado, mas sem indução da DA); G2 – STZ/Veículo; G3 – Naive (grupo não operado e não tratado), G4 e G5 (grupo tratados com as formulações, RES 5mg/kg i.n.). Após, foram tratados por 15 dias e submetidos a **testes de memória aversiva (esquiva inibitória)**, **memória espacial (reconhecimento de objetos)** e **deambulação (campo aberto)**. Os resultados **esperados** são a melhora significativa do déficit cognitivo induzido pela STZ com o **tratamento usando as formulações**, tanto no teste da esquiva inibitória quanto no teste de reconhecimento de objetos. Em conjunto, os **resultados obtidos** irão sugerir que o composto em estudo apresenta potencial para a **terapêutica da DA** no que **tange a melhora dos sintomas** de comprometimento da memória e ansiedade.

II. ANÁLISE:

- **Data de início e término:** ADEQUADO. Dez/2018 à Fev/2019
- **Qualificação da equipe e treinamento:** ADEQUADO.
- **Justificativa do projeto:** ADEQUADO.
- **Detalhamento dos procedimentos experimentais:** ADEQUADO.
- **Condições de manutenção:** ADEQUADO.
- **Número de animais solicitados e planejamento estatístico:** INADEQUADO – Verificar parecer.
- **Espécie, linhagem e sexo:** ADEQUADO. Camundongo, Swiss, Fêmea.



III. PARECER: *Ad referendum*

- Item 9: Recomendamos citar ou indicar 1 ou 2 referências bibliográficas para justificar o “n” amostral de 15 exemplares (Planejamento).
- Item 9.1, tabela 4. Verificar o detalhamento na tabela de número de animais do experimento 4, (cita 90 exemplares), mas a soma é 100 na tabela, sendo 2 grupos Naive.

De acordo com todos os itens acima descritos, o projeto fica pendente – *Ad referendum*, para que todos os pontos abordados sejam respondidos pelos autores do projeto.

IV. REANÁLISE: **Aprovado**

Todos os itens listados acima foram devidamente corrigidos.

V. PARECER FINAL: **Aprovado**

David Til
Coordenador CEUA/UNIVALI