

Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa

BRUNO HENRIQUE DE MORAES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA NANOESTRUTURADO CONTENDO
BROMIDRATO DE GALANTAMINA**

GUARAPUAVA- PR

2019

**Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa

BRUNO HENRIQUE DE MORAES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA NANOESTRUTURADO CONTENDO
BROMIDRATO DE GALANTAMINA**

Defesa apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Co-orientadora: Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes

GUARAPUAVA-PR

2019

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

M827d Moraes, Bruno Henrique de
Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado contendo bromidrato de galantamina / Bruno Henrique de Moraes. -- Guarapuava, 2019.
ix, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

Orientador: Najeh Maissar Khalil
Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Ricardo Yoshimitsu Miyahara, Jociane Ascari

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Galantamina. 3. Zeína. 4. Caseína. 5. Nanopartículas. 6. Farmacodinâmica. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 04/2019

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do pós-graduando Bruno Henrique de Moraes, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

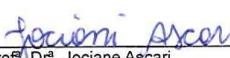
Aos vinte e seis dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove, às nove horas, na sala de aula PPGCF, *Campus* CEDETEG, sob a presidência do Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do pós-graduando **Bruno Henrique de Moraes**, constituída pelos professores: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil (orientador) - UNICENTRO, Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Myahara (Membro Titular) - UNICENTRO e Prof.ª Dr.ª Jociane Ascari (Membro titular) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da Banca e ao candidato das normas que regem a defesa de Dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. A seguir, o candidato passou à defesa de sua Dissertação de Mestrado intitulada: "**Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado contendo bromidrato de galantamina**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento, tendo sido o candidato aprovado. A Presidência ressaltou que a obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia está condicionada ao depósito da versão definitiva (impresa) da Dissertação, bem como das cópias em CD (PDF), com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador(a) no prazo de trinta dias, comprovante de submissão de artigo científico, e demais exigências da legislação vigente. O não atendimento ao prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Esta Ata de Defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do Programa e o título obtido deverá ser homologado pelo Comitê de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, CPS. Nada mais havendo a tratar foi lavrada esta Ata e assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Guarapuava, 26 de agosto de 2019.

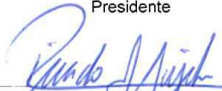
Observação (se necessário): _____

Alteração de Título: Sim Não

Novo título: _____


Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil,
UNICENTRO.
Presidente


Prof. Dr.ª Jociane Ascari,
UTFPR.
Membro Titular


Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Myahara,
UNICENTRO.
Membro Titular

- Ata de Defesa homologada pelo Colegiado do PPGCF, conforme Ata da Reunião n° _____, de ____/____/____.

- Título homologado pela CPS, conforme Resolução n° _____, de ____/____/____.
Este documento não substitui o diploma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, me suportou durante as minhas indecisões e me deram toda a estrutura que eu necessitei durante esse período.

Ao Prof^o Dr. Najeh Maissar Khalil e a Prof^a Dra. Rubiana Mara Mainardes por toda confiança, paciência e orientação, desde o início.

A minha companheira de vida, Elis Regina, que me ajudou a superar as adversidades e esteve do meu lado me incentivando nos momentos mais difíceis, te amo!!!

Aos novos e velhos amigos, aos momentos de descontração e por todas as risadas que reduziram a carga das responsabilidades que nos assombram em alguns períodos.

Aos companheiros de laboratório, que mostraram o caminho que eu deveria seguir na pesquisa e que irão me acompanhar para o resto da vida.

Aos funcionários(as) da Prati-Donaduzzi por me receber na empresa e me orientar em suas dependências.

A parceria entre a Fundação Araucária e a Prati-Donaduzzi que concedeu uma bolsa de estudos durante esse período.

E a todos que não foram mencionados, mas que contribuíram para a realização deste trabalho, deixo os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A doença de Alzheimer é um tipo de demência, que afeta principalmente pessoas idosas e ao longo dos anos observou-se uma crescente incidência desta patologia devido o envelhecimento populacional. A neurodegeneração causada por essa doença se sustenta principalmente na hipótese amiloide, onde ocorre a deposição do peptídeo beta amiloide, um metabólito solúvel que tende a se agregar e formar placas que conduzem a processos inflamatórios que podem levar a morte neuronal. O principal tratamento farmacológico, utilizado para a demência do tipo Alzheimer, é a utilização de compostos inibidores da colinesterase, que ao inibir as enzimas que reduzem os níveis de acetilcolina, fazendo com que haja uma elevação nos níveis desse neurotransmissor, reduzem assim a excreção da proteína precursora da amiloide. Dentre esses compostos inibidores temos a galantamina, que compete reversivelmente no sítio de ligação da acetilcolinesterase e modula alostéricamente os receptores nicotínicos, comercializada na forma de sal de bromidrato de galantamina foi o último entre os medicamentos de sua categoria a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Visando as características farmacodinâmicas da galantamina utilizou-se a nanotecnologia como estratégia, onde foi empregada a zeína e a policaprolactona para a formação da matriz polimérica das nanoestruturas obtidas para o carreamento do composto ativo. Para a formação das nanopartículas de zeína utilizou-se a técnica da dispersão líquido-líquido e a utilização de caseína como agente estabilizante, onde foram obtidos nanopartículas com diâmetro médio de $254,3 \pm 11$ nm, índice de polidispersão de $0,222 \pm 0,001$ e eficiência de encapsulação de 10,2%; diferentemente da formulação utilizando a técnica da nanoprecipitação com o polímero PCL, que apresentou diâmetro médio $263,2 \pm 8$, distribuição de $0,11 \pm 0,04$ e eficiência de encapsulação de 87,49 %, dando-se continuidade nos ensaios de caracterização físico-química, estabilidade, liberação em fluidos gastrointestinais e análises morfológicas apenas para as nanopartículas de PCL, que apresentou estabilidade em diferentes condições de armazenamento e manteve-se integra quando submetida aos ensaios de liberação em fluidos gástricos e intestinais, sendo assim uma opção para o carreamento da galantamina por via oral.

Palavras chaves: Galantamina, zeína, caseína, nanopartículas, farmacodinâmica.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a type of dementia that mainly affects the elderly and over the years, there has been a growing incidence of this disease due to population aging. The neurodegeneration caused by this disease is mainly supported by the amyloid hypothesis, where the deposition of amyloid beta peptide occurs, a soluble metabolite that tends to aggregate to form plaques that lead to inflammatory processes that can lead to neuronal death. The main pharmacological treatment used for Alzheimer's dementia is the use of cholinesterase inhibitor compounds, which by inhibiting the enzymes that reduce acetylcholine levels, causing an increase in the levels of this neurotransmitter, thus reducing the excretion of the precursor protein. of amyloid. Among these inhibitory compounds are galantamine, which is a reversible competitor of acetylcholinesterase and allosteric modulator of nicotinic receptors, marketed as a galantamine hydrobromide salt was the last of its category drugs to be approved by the Food and Drug Administration (FDA). To improve the pharmacodynamic characteristics of galantamine, nanotechnology was used as a strategy, where zein and PCL were used to form the polymeric matrix of the nanostructures obtained for the carriage of the active compound. For the formation of zein nanoparticles, the liquid-liquid dispersion technique and the use of casein as stabilizing agent were used, where nanoparticles were obtained with average diameter of 254.3 ± 11 nm, polydisperse index of 0.222 ± 0.001 and encapsulation efficiency of 10.2%; unlike the formulation using the PCL polymer nanoprecipitation technique, which had an average diameter of 263.2 ± 8 , a distribution of 0.11 ± 0.04 and an encapsulation efficiency of 87.49%, giving continuity in the tests physicochemical characterization, stability, release in gastrointestinal fluids and morphology studies only for PCL nanoparticles, That presented good stability under different storage conditions and remained intact when submitted to gastric and intestinal fluid release assays, thus being an option for oral galantamine transport.

Key words: Galantamine, zein, casein, nanoparticles, pharmacodynamic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala de comparação de materiais nanométricos (FONTE: o autor).	18
Figura 2. Representação da nanopartículas poliméricas (FONTE: o autor). ...	19
Figura 3. Estrutura Galantamina (FONTE: o autor).	25
Figura 4. Polimerização de ϵ -caprolactona (FONTE: o autor).	26
Figura 5. Esquema de obtenção de nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina (FONTE: o autor).	35
Figura 6. Esquema de obtenção de nanopartículas de zeína/caseína contendo bromidrato de galantamina (FONTE: o autor).	36
Figura 7 Distribuição de tamanhos das nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina.	44
Figura 8. Distribuição de tamanhos das nanopartículas de zeína/caseína carregadas com bromidrato de galantamina.	44
Figura 9. Curva analítica do bromidrato de galantamina solubilizada em metanol.	45
Figura 10. Espectros de infravermelho das (A) nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina, (B) nanopartículas de PCL vazias, (C) mistura física de PCL com bromidrato de galantamina, (D) PCL e (E) bromidrato de galantamina.	47
Figura 11. Difratogramas sobrepostos das (a) nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina, (b) nanopartículas de PCL vazias, (c) mistura física de PCL com bromidrato de galantamina, (d) PCL e (e) bromidrato de galantamina.	50
Figura 12. Diâmetro médio das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina \pm desvio padrão em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, n=3. Os tempos destacados com * apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).	52
Figura 13. Potencial zeta das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina \pm desvio padrão em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, n=3. Os tempos destacados com * apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).	52
Figura 14. Índice de polidispersão das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina \pm desvio padrão em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, n=3. Os tempos destacados com * apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).	53
Figura 15. Perfil de Liberação do bromidrato de galantamina a partir das nanopartículas de PCL no FGS (pH=1,2) e no FIS (pH=6,8). O ensaio foi conduzido durante 2h no FGS e por mais 4 h no FIS, a 37 °C e 150 rpm. Os resultados são expressados em média \pm DP (n=3).	54
Figura 16. Fotomicrografias das nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina obtidas por meio de MEV-FIB: A) Aumento de 150000 vezes B) Aumento de 12000 vezes.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de deterioração global da evolução da demência do tipo Alzheimer.	12
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação de bromidrato de galantamina.....	38
Tabela 3. Tamanho médio e IPD das nanopartículas de PCL e zeína/caseína carregadas.	43
Tabela 4. Eficiência de encapsulação das nanopartículas de PCL e zeína/caseína.	46
Tabela 5. Potencial zeta das nanopartículas de PCL carregadas e vazias.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRDA	Alzheimer Disease and Related Disorders Association
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DA	Doença de Alzheimer
DLS	Dynamic Light Scattering
DP	Desvio Padrão
DRX	Difração de Raio-X
EE	Eficiência de Encapsulação
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GDS	Global Deterioration Scale
IACH	Inibidores da Acetilcolinesterase
IPD	Índice de Polidispersão
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEV-FIB	Microscopia Eletrônica de Varredura de duplo feixe
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
NMDA	Subtipo de receptor de glutamato
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Polietileno Glicol
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-glicólico)
PS80	Polissorbato 80
PZ	Potencial Zeta

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	9
2.2 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	18
2.3 NANOPRECIPITAÇÃO	22
2.4 GALANTAMINA.....	23
2.5 POLICAPROLACTONA.....	26
2.6 POLISSORBATO 80	27
2.7 ZEÍNA.....	28
2.8 CASEÍNA.....	29
2.9 CARACTERIZAÇÕES E AVALIAÇÕES DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 REAGENTES	33
4.2 EQUIPAMENTO E ACESSÓRIOS.....	33
4.3 METODOLOGIA.....	34
4.3.1 Obtenção de nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina.	34
4.3.2 Obtenção de nanopartículas de zeína/caseína contendo bromidrato de galantamina.....	35
4.3.3 Caracterização físico-química das nanopartículas	37
4.3.3.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas.....	37
4.3.3.2 Potencial zeta.....	37
4.3.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier	37
4.3.3.4 Difração de Raio-X	38
4.3.3.5 Método analítico para quantificação do bromidrato de galantamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	38
4.3.3.6 Determinação de eficiência de encapsulação	39
4.3.3.7 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo bromidrato de galantamina.....	40

4.3.3.8 Liberação do bromidrato de galantamina das nanopartículas carregadas em fluido gástrico (FGS) e intestinal simulado (FIS)	40
4.3.3.9 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura de duplo feixe (MEV-FIB)	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PCL CONTENDO BROMIDRATO DE GALANTAMINA	42
5.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA/CASEÍNA CONTENDO BROMIDRATO DE GALANTAMINA	42
5.3 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	42
5.3.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão.....	42
5.3.2 Método analítico para a quantificação de bromidrato de galantamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	45
5.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas	45
5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	46
5.3.5 Potencial zeta.....	48
Letras diferentes significam desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e $\alpha < 0,05$).	48
5.3.6 Difração de Raio-X	49
5.3.7 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo bromidrato de galantamina.....	51
5.3.8 Liberação do bromidrato de galantamina das nanopartículas carregadas em fluido gástrico (FGS) e intestinal simulado (FIS)	53
5.3.9 Análise de MEV-FIB	55
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Com a aceleração do envelhecimento populacional, a incidência de doenças neurodegenerativas vêm crescendo de forma significativa, sendo a doença de Alzheimer (DA) o tipo de demência mais comum entre as doenças relacionadas com a idade, ocorrendo com mais frequência em grupos com idade avançada (KUKULL; HIGDON; BOWEN, 2002). As projeções futuras mostram que os casos de demências tendem a triplicar até 2050, devido ao envelhecimento populacional, destacando a busca por tratamentos eficazes como prioridade pelos países que comandam a economia mundial, tendo em vista que esses são os mais afetados devido a inversão da pirâmide etária (NORTON; MATTHEWS; BARNES, 2014).

Baseado no mecanismo fisiopatológico mais aceito como causador da DA, os inibidores da acetilcolinesterase (IACh) são os medicamentos indicados como primeira linha para o tratamentos das demências leves e moderadas (OHTA; DARWISH; HISHIKAWA, 2017). Essa categoria de medicamentos, utilizada para tratar a DA, faz com que a progressão da doença seja mais lenta, reduzindo os efeitos sobre a cognição, aumentando o tempo do paciente entre as fases inicial e intermediária da demência (BLONIECKI; AARSLAND; BLENNOW, 2017).

Dentre os IACh, destaca-se a galantamina, um alcaloide terciário utilizado no tratamento de demências, a qual foi isolada pela primeira vez de plantas da família Amarilledaceae, e tem como mecanismo de ação a competição reversível pela inibição da acetilcolinesterase e a modulação alostérica de receptores nicotínicos, reduzindo a progressão da doença em seus estágios iniciais (NAKANO; MATSUZONO; YAMASHITA, 2015). A galantamina é um composto hidrofílico que pode ser administrado por todas as vias e possui metabolização majoritariamente por via hepática, porém apresenta problemas relacionados à biodisponibilidade visto que é rapidamente processado e excretado na urina devido a sua solubilidade em água (PRVULOVIC; HAMPEL; PANTEL, 2010).

Para as características problemáticas relacionadas a disponibilidade, a nanotecnologia tem demonstrado ser uma importante ferramenta na

performance de compostos ativos, consistindo na manipulação da matéria a nível molecular para o desenvolvimento de dispositivos, materiais funcionais e sistemas com propriedades singulares (DIMER; FRIEDRICH; BECK, 2013). As nanopartículas poliméricas vêm sendo exploradas como carreadores de compostos que apresentam instabilidade em meio fisiológico, melhorando a distribuição de compostos ativos, minimiza a toxicidade e a manutenção da concentração do composto na faixa terapêutica (BROOKING; DAVIS; ILLUM, 2001).

Polímeros biodegradáveis têm sido usados na preparação de nanopartículas, por apresentar propriedades funcionais desejadas. Dentre estes a zeína, proteína de origem vegetal, e a policaprolactona (PCL), polímero sintético derivado da abertura do monômero ϵ -caprolactona, apresenta características como biocompatibilidade e atoxicidade; sendo este polímero hidrofóbico bastante utilizado em diversas metodologias para a obtenção de sistemas carreadores (DASH; KONKIMALLA, 2012).

Almejando a efetividade do tratamento da DA com a utilização de IACh incorporados a sistemas nanoparticulados, tornou-se relevante a utilização de sistemas carreadores de PCL, zeína e outros polímeros biodegradáveis, aspirando melhorar a eficácia terapêutica da galantamina.

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de nanoprecipitação dispersão líquido-líquido para a obtenção de nanopartículas, com o intuito de melhorar algumas características de disponibilidade do composto ativo utilizado e avaliar, por meio de caracterizações físico-químicas, estabilidade e análises em meio biológico; para identificar a eficiência do sistema.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Em 1907, Alois Alzheimer, um psiquiatra bávaro que tratava uma mulher com demência progressiva e até então desconhecida, foi o primeiro a descrever a característica principal dessa doença neurodegenerativa por meio de estudos histológicos, onde observou emaranhados neurofibrilares. Em 1910 o termo “Doença de Alzheimer”, que leva o sobrenome do primeiro descritor da demência pré-senil, foi inserido para diferenciar da demência comum (ZILKA; NOVAK, 2006).

Nota-se ao longo dos anos uma crescente incidência da DA devido ao envelhecimento populacional, sendo esse o principal fator de risco relacionado a doença (HEBERT; SCHERR; BIENIAS, 2003). Outros fatores de risco relativos com a DA, são: os antecedentes familiares (LAUTENSCHLAGER; CUPPLES; RAO, 1996) e o risco genético, que até recentemente só era relacionado com o gene apolipoproteína-E e atualmente sabe-se que algumas variantes raras em outros genes também podem desencadear a doença (HOLLINGWORTH; HAROLD; SIMS, 2011). Simulações feitas com base no censo de 2010 sugerem que até 2050 a incidência da DA triplique nos Estados Unidos. Esse aumento dramático vem sendo abordado como um desafio para a pesquisa na área das neurociências e para o governo norte americano, que tem acompanhado o progresso para a diminuição dessas projeções (HEBERT; WEUVE; SCHERR, 2013).

Os custos com a demência vão desde cuidados hospitalares, cuidadores, enfermeiras, casas de repouso, internamentos a prescrições médicas. Se somados, os custos gerados pela DA ultrapassam os 604 bilhões de dólares por ano no mundo todo, variando o custo por pessoa de acordo com o poder econômico do país (BOND; PRINCE; WINBLAD, 2013). Dependendo a fase em que a doença se encontra torna-se mais cara a manutenção do paciente, sendo que a medida em que este vai perdendo a cognição os custos com os cuidados vão se tornando mais elevados (MESTERTON; WIMO; BY, 2010). Aproximadamente 80% dos cuidadores são pessoas não pagas, menos de 10%

dos pacientes acabam por pagar esse serviço. Dentre esses cuidadores não pagos, podemos ver em sua grande maioria, os familiares que optam por realizar esse serviço devido aos altos valores cobrados pelos profissionais dessa área (THIES; BLEILER, 2011). As tarefas que são realizadas pelos cuidadores são numerosas, indo desde as necessidades mais básicas, como: manutenção da higiene, nutrição e segurança física; até as mais complexas, que exigem do cuidador maior sensibilidade, como: redução da ansiedade e agitação, estimulação da comunicação e independência em atividades que necessitam de autocuidado (PAES; ESPIRITO SANTO, 2005). Devido as responsabilidades, que envolvem os cuidados em tempo integral, observa-se as altas taxas de transtornos mentais e problemas físicos em cuidadores (RITCHIE; LOVESTONE, 2002).

Após a descoberta dos emaranhados neurofibrilares, poucos avanços foram feitos no campo da fisiopatologia da doença, até que determinaram a proteína *tau* como principal componente desses emaranhados e isso conduziu o foco dos estudos sobre essa proteína (IQBAL; ALONSO; CHEN, 2005). Com a aparição de um caso de Alzheimer familiar, os estudos se voltaram para proteína precursora da amiloide, onde através de mapeamento genético chegou-se a um gene localizado no cromossomo 21, muito perto de onde os estudos de ligação genética realizado com os membros da família afetados, haviam indicado. A proteína precursora da amiloide dá origem a beta amiloide, proteína de menor tamanho encontrada nas placas características da DA (MARX, 1991). Baseados em análises de indivíduos com síndrome de Down, visto que o gene da DA tem predileção pelo cromossomo 21, foi sequenciado o componente majoritário da beta amiloide, sendo esse estudo considerado o início da “hipótese amiloide” para a doença de Alzheimer (TANZI; BERTRAM, 2005).

A hipótese amiloide propõe que a neurodegeneração causada pela DA, pode ser explicada pela deposição do peptídeo beta amiloide, causado pelo desequilíbrio entre a produção e a retirada deste peptídeo. De acordo com a hipótese o acúmulo de beta amiloide no tecido cerebral é a principal influência na condução para o desenvolvimento da patologia (HARDY; SELKOE, 2002). Esse peptídeo é normalmente produzido pelo corpo, como um metabólito solúvel, e tende a se agregar formando placas difusas e compactas.

A patologia geralmente é associada as placas compactas, que são formados por beta amiloide (LORENZO; YANKNER, 1994). Ao redor dessas placas podemos observar a inflamação do tecido nervoso, podendo levar a neurodegeneração contribuindo assim com a progressão da perda neuronal. Sendo assim, o peptídeo beta amiloide é considerado uma proteína neurotóxica (PIKE; BURDICK; GLABE, 1993). Essa toxicidade se deve ao acúmulo de peptídeo beta amiloide e proteína precursora da amiloide na membrana das mitocôndrias, fazendo com que essa tenha um dano estrutural, induzindo assim a um acúmulo intracelular de Ca^{2+} e limitando a fonte de energia gerada para o funcionamento normal das células cerebrais (REDDY, 2009).

Atualmente o tratamento farmacológico tem como foco principal os compostos inibidores da colinesterase, que se apoiam na hipótese colinérgica. Ela propõe que a demência do tipo Alzheimer ocorra por conta de uma deficiência na produção de um neurotransmissor chamado acetilcolina, e isso faz com que a excreção de proteína precursora da amiloide solúvel diminua, levando assim a um maior acúmulo de beta amiloide (FRANCIS; PALMER; SNAPE, 1999). Todas as hipóteses relacionadas com a DA tem em comum o acúmulo de proteínas de forma anormal, desencadeando assim processos inflamatórios, que podem conduzir desordens neurodegenerativas devido à baixa tolerância dos neurônios (GIORDANO; SAMBAMURTI; ROGERS, 2004).

A incapacidade de realização de tarefas diárias, a redução da cognição, dificuldades na comunicação e locomoção, distúrbios comportamentais e perda de memória são alguns dos sintomas que o paciente acometido pela DA tende a apresentar durante a progressão dessa patologia (FINKEL; COHEN; MILLER, 1997), reduzindo assim a qualidade de vida tanto do paciente quanto dos seus cuidadores. Com a redução da qualidade de vida, o paciente acaba se tornando mais suscetível a outras doenças, que podem vir a debilita-lo e gerar maiores custos com cuidados de saúde (MASTERMAN; FAIRBANKS; CUMMINGS, 2005).

Por apresentar uma progressão sintomática temporal, pode se classificar a fase em que a DA se encontra de acordo com características que os pacientes apresentam, mesmo sendo uma doença que evolui de forma singular em cada indivíduo. A pré-demência, é o estágio anterior a DA, onde os pacientes têm reduções moderadas na capacidade de cognição, podendo ou não evoluir para

o estágio inicial da doença que não pode ser diagnosticado ainda nessa fase (PETERSEN, 2007). O estágio inicial é marcado pela conclusão do diagnóstico da doença, onde a diminuição da memória e da capacidade de aprendizagem tornam-se mais evidentes, porém a capacidade de comunicação de forma básica e a prática de atividades que não exijam habilidades cognitivas complexas ainda são desenvolvidas (KURZ, 1999). Durante o estágio intermediário observa-se uma redução significativa no vocabulário e isso faz com que a dificuldade na comunicação se torne algo evidente, sendo que nessa fase a independência da pessoa é totalmente afetada e as manifestações comportamentais tornam-se mais frequentes (TALER; PHILLIPS; TALER, 2014). No estágio avançado, que é a última fase da doença, a comunicação torna-se algo limitado a poucas palavras ou incapacidade total de se expressar verbalmente, nessa fase as pessoas com a doença tornam-se dependentes até para as tarefas mais simples por conta da limitação de movimentos, geralmente encontram-se acamados e com dificuldades na ingestão de alimentos. Essas fases da progressão da doença foram divididas em 7 estágios que foram denominados Global Deterioration Scale (GDS) (tabela 1), usado como parâmetro para distinguir a severidade da doença conforme ela venha a se manifestar clinicamente (AUER; REISBERG, 1997).

Tabela 1. Escala de deterioração global da evolução da demência do tipo Alzheimer.

Estágio GDS	Fase clínica	Característica clínica	Diagnostico
1- Sem declínio cognitivo	Normal	Nenhuma queixa subjetiva de déficits de memória. Sem déficits de memória após avaliação clínica.	Normal
2- Declínio cognitivo muito fraco	Esquecimento	Queixas de perda de memória, mas não aparente nas habilidades de trabalho ou socialização. Preocupação com a condição.	Normal com a idade
3- Declínio cognitivo fraco	Confusão precoce	Diminuição da habilidade de trabalho e social. Ansiedade leve e moderada.	Compatível com a DA inicial
4- Declínio cognitivo moderado	Confusão tardia	Inabilidade para realizar tarefas complexas.	DA fraca

5- Declínio cognitivo moderadamente severo	Pré-demência	Requer assistência para sobreviver. Perca de memória a curto prazo. Reconhece rapidamente os familiares. Comer continuamente. Dificuldades em escolher roupas	DA moderada
6- Declínio cognitivo severo	Demência moderada	Pode esquecer o nome de pessoas próximas. Inconsciência de problemas. Requer assistência em atividades diárias, personalidade e mudanças emocionais.	DA moderada a severa
7- Declínio cognitivo muito severo	Demência tardia	Perca da habilidade de falar e incapacidade de desenvolver qual quer tipo de tarefa.	DA severa

O diagnóstico primário é geralmente notado pela redução na capacidade de memorizar e na diminuição da cognição. Usando critérios clínicos que vão ajudar o profissional de saúde a reconhecer os sinais da doença, levando em consideração que dificilmente o paciente vai ao médico por suspeitar que está desenvolvendo algum tipo de demência (RABINS; BARRY; BUCKHOLTZ, 1997), a tempo de se buscar um tratamento que venha a reduzir a progressão da doença nos seus estágios iniciais. Quando o risco do desenvolvimento de demência é identificado, por meio de entrevistas que procuram sinais de reduções cognitivas significativas, o passo seguinte é procurar a causa dessa neurodegeneração, podendo ter sido causado por um motivo obvio, como um derrame cerebral, ou até mesmo através de uma intoxicação por metais pesados, que só são identificados através de análises específicas (DALY, 1998).

O diagnóstico da DA foi estabelecido pelo NINCDS (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke) e ADRDA (Alzheimer Disease and Related Disorders Association), embasado na exclusão de outros tipos de demência que tendem a apresentar características semelhantes a doença em questão (MCKHANN; DRACHMAN; FOLSTEIN, 1984). O diagnóstico precoce da doença, ou seja, antes dos sintomas se apresentarem, pode ser feito através da quantificação de proteínas do fluido cérebro-espinhal,

que irão servir como biomarcadores sensíveis para a detecção pré-sintomática da patologia (DE MEYER, GEERT; SHAPIRO, 2015).

Os métodos de prevenção, relacionados com a redução na frequência da DA não são consistentes, embora apresentem relações com fatores de risco, como o estresse oxidativo (BONDA; WANG; PERRY, 2010) e doenças cardiovasculares, ainda necessitam de pesquisas conclusivas em relação aos diversos compostos que propõe estes efeitos profiláticos. Alguns compostos farmacêuticos vêm sendo avaliados com relação a sua atividade preventiva, como os anti-inflamatórios não esteroidais, terapias de reposição hormonal, anti-hipertensivos, estatinas e imunoterapia; bem como nutracêuticos e fatores ligados ao estilo de vida (SZEKELY; BREITNER; ZANDI, 2007). Com o foco na redução global da incidência da DA, a pesquisa tem se voltado para a prevenção primária da doença, estudos vem sendo direcionados no desenvolvimento de vacinas. Entretanto, a prevenção secundária e terciária, que tende a parar ou a reduzir a progressão da doença, são as opções disponíveis até agora (THAL, 2006).

Diversas possibilidades terapêuticas vêm sendo exploradas na área da pesquisa farmacêutica, e os inibidores da acetilcolinesterase tem apresentado resultados positivos pelos efeitos paliativos relatados em paciente com a DA leve a moderada e foram escolhidos como tratamento de primeira linha para esta enfermidade (DOODY; STEVENS; BECK, 2001). Assim como os inibidores da acetilcolina, a memantina, antagonista parcial do NMDA (um dos subtipos de receptores de Glutamato), vem apresentando benefícios clinicamente significantes para pacientes nos estágios mais avançados da doença (RAJARAM; HERRMANN; LANCTO, 2009). Algumas propostas de novas abordagens farmacêuticas, apoiadas em estudos fisiopatológicos, contribuindo com novas classes de medicamentos, imunização a proteína beta amiloide, anti-inflamatórios, redutores de colesterol, quelantes de metais e antiagregantes de amiloide (SCARPINI; SCHELTENS; FELDMAN, 2003).

A vitamina E (alfa tocoferol) é um potente antioxidante, com conhecida ação protetiva nos neurônios, também mostrou-se clinicamente significativa principalmente em concomitância com inibidores da acetilcolinesterase (DYSKEN; SANO; ASTHANA, 2014), diferentemente de outros compostos antioxidantes, como o ômega-3 e o Ginkgo biloba (estrato seco), que através de

estudos concluiu-se que não apresentavam benefícios relevantes (BIRKS, 2009; FREUND-LEVI; ERIKSDOTTER-JO, 2006).

Levando em consideração a importância da aplicação das terapias não farmacológicas, visto que isto vem melhorando a manutenção de pacientes com DA leve a moderada, não se pode deixar de citar os exercícios físicos, programas para a estimulação mental e a terapia ocupacional, demonstrando resultados na aptidão física, redução de sintomas neuropsiquiátricos e redução da perda cognitiva (GRAFF; VERNOOIJ-DASSEN; THIJSEN, 2006; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2009; TERI; GIBBONS; MCCURRY, 2015). Outros tipos de terapias não farmacológicas menos usuais, como a terapia musical de improvisação, tem apresentado resultados satisfatórios na preservação da linguagem e devido à baixa exigência de habilidades motoras pode vir a ser trabalhada com pessoas em fases mais avançadas da doença (ALDRIDGE, 1994) e a terapia com luzes, que tem comprovadamente melhorado características comportamentais, reduzindo os sintomas de depressão e agitação (HANFORD; FIGUEIRO, 2013). Recentemente aplicou-se um novo modelo de tratamento em ratos, que consiste em luzes de led piscando a uma determinada frequência, que reduziu drasticamente a quantidade de beta amiloide nos modelos testados (“Unique visual stimulation may be new treatment for Alzheimer’s MIT News”, 2016).

As neurocirurgias também têm demonstrado um grande potencial na melhora das funções cognitivas, através de procedimentos como as infusões intraventriculares, estimulação neural elétrica, terapia genica, enxerto de tecido e instalação de dispositivos de estimulação eletrônica intracranianos (LAXTON; STONE; LOZANO, 2014). Podemos destacar a terapia gênica, que vem ganhando espaço para os tratamentos de diversos tipos de demência e tumores cerebrais, consistindo na modificação genética de algum tipo de fator que venha estimular as funções colinérgicas, reduzindo assim a progressão e os sintomas da demência (FISCHER; WICTORIN; BJÖRKLUND, 1987); e a estimulação neural elétrica, modulando funcionalmente a cascata de circuitos neurais por meio da aplicação de pulsos elétricos controlados (CARLSON; CLEARY; CETAS, 2010), principalmente no núcleo basal de Meynert e no Fornix, que são regiões profundas do cérebro onde pode ser notado acentuada neurodegeneração associada a DA (TSIVILIS; VANN; DENBY, 2008;

TURNBULL; MCGEER; BEATTIE, 2007). Essa estimulação profunda busca melhorar características clínicas que possam vir a ser útil nas funções cognitivas (LAXTON; LOZANO, 2013).

Baseado na hipótese amiloide a imunoterapia é abordada de forma ativa, quando são utilizadas proteínas sintéticas análogas ou pedaços da proteína desativada, estimulando assim os anticorpos a capturar e eliminar as proteína beta amiloides, diferindo assim da forma passiva da imunização, que consiste na implementação de anticorpos monoclonais, que podem trazer benefícios por meio de quatro mecanismos de ação: reduzem a agregação das proteínas que levam a formação de placas amiloides, induzem a fagocitose das beta amiloides, citotoxicidade induzida por meio do complexo formado entre o anticorpo e o antígeno, que levam a lise da célula alvo e formação de um complexo das proteínas que levam a degeneração neural com os anticorpos, formando assim um gradiente de concentração que vai induzir essas proteínas a irem para o sangue periférico, reduzindo assim a concentração cerebral (BARRERA-OCAMPO; LOPERA, 2016).

Outra terapia que está sendo abordada com sucesso em várias desordens psiquiátricas é a estimulação magnética transcraniana, esse método não invasivo, que ainda não foi totalmente elucidado, sugere que esses campos magnéticos modulam as redes neurais e regiões corticais diretamente, melhorando assim a memória, o aprendizado e a linguagem (COTELLI; CALABRIA; MANENTI, 2011; COTELLI; MANENTI; CAPPÀ, 2006; DEMIRTAS-TATLIDEDE; VAHABZADEH-HAGH; PASCUAL-LEONE, 2013).

A demência atingiu aproximadamente 24,2 milhões de pessoas em 2005 e vem tendo um aumento de 4,6 milhões por ano no mundo todo, sendo que em aproximadamente 70% desses casos podemos ver uma prevalência da demência do tipo Alzheimer. As maiores taxas de incidência da demência em pessoas acima de 60 anos são observadas na América do Norte e no Oeste Europeu, em seguida podemos ver América Latina e China (FERRI; PRINCE; BRAYNE, 2005). No Brasil a mudança ocorrida na pirâmide etária nas últimas décadas, desde a transição demográfica, fez com que as taxas de morbimortalidade ganhasse doenças neuropsiquiátricas e cardiovasculares, como protagonistas dos problemas de saúde pública, afetando principalmente a população idosa (SCHMIDT; DUNCAN; E SILVA, 2011), reduzindo assim, o

tempo médio de sobrevivência em 8,4 anos, quando diagnosticado próximo aos 65 anos de idade e com progressiva redução desse tempo conforme o diagnóstico for mais tardio (BROOKMEYER; CORRADA; CURRIERO, 2002). Os indicadores vem apresentando uma tendência de elevação das taxas de morbimortalidade relacionadas com a DA, indo no sentido inverso das causadas por doenças crônicas e cardiovasculares, para ambos os sexos (BROSSELIN; DUPORT; BLOCH, 2010) e essa elevação não se relaciona com a melhora dos meios de diagnóstico mas com a elevação do envelhecimento populacional (HALLBERG, 2009). Ainda há uma lacuna na pesquisa epidemiológica, e ainda sabe-se muito pouco sobre a distribuição e impacto em cada região do Brasil especificamente, dificultando assim um perfil mais abrangente das consequências da DA em nosso território (PINTO; BARBOSA; LUCENA, 2009).

Atualmente muitos esforços vêm sendo feitos, tanto para o desenvolvimento de novos fármacos e melhoras nos diagnósticos, para que a intervenção seja feita o quanto antes em pacientes acometidos pela DA, aumentando assim o tempo de sobrevivência e a qualidade de vida. Centenas de estudos com biomarcadores no fluido cérebro espinal estão sendo desenvolvidos obtendo resultados excelentes que estão sendo padronizados e validados, para que futuramente possa vir a ser usado como uma ferramenta para o diagnóstico precoce da DA (BLENNOW; ZETTERBERG; BLENNOW, 2018).

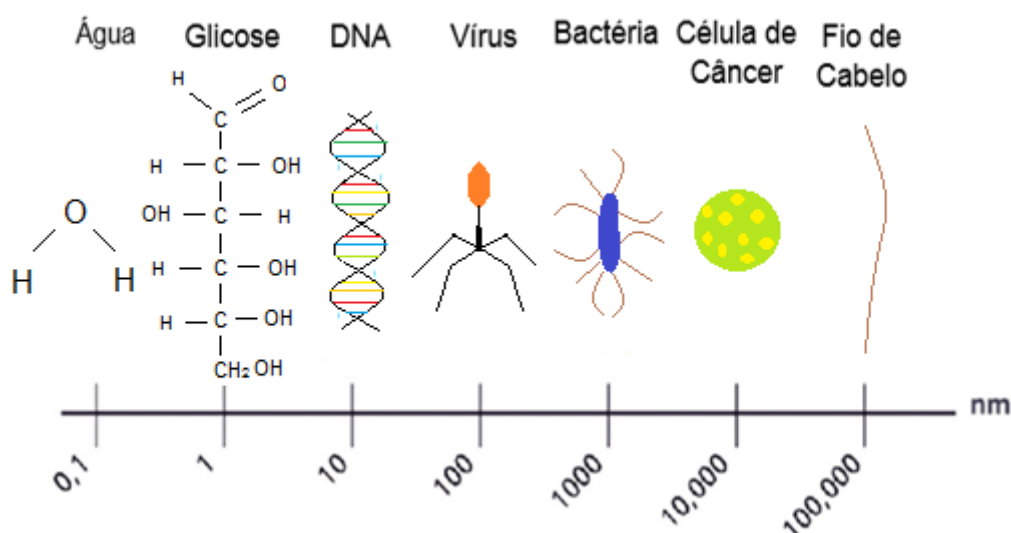
Os estudos observados, utilizando IACh, embasados na hipótese amiloide tem diminuído a progressão da doença mas ainda estão longe de representar uma cura, colocando em questão, através de evidências que apontam que os neurônios não colinérgicos também estão propensos a neurodegeneração, a hipótese mais aceita até agora como sendo a causa principal da patologia (SMALL; GREENFIELD, 2018).

O entendimento do mecanismo da doença, que é um pré-requisito para o desenvolvimento de medicamentos eficazes, requer modelos animais capazes de serem reproduzidos para que possam vir a ser utilizados em exames pré-clínicos e também modelos transgênicos que venham a ajudar em situações específicas, como na demência pré-senil (FRANCO; CEDAZO-MINGUEZ, 2014).

2.2 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Com o advento da nanotecnologia sendo abordada nas mais diversas áreas do conhecimento, o desenvolvimento de nanocompostos aplicados na farmacoterapia tem representado novas possibilidades de tratamento para muitas doenças (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2006). Devido ao tamanho, em escala nanométrica (representada na Figura 1) desses compostos, eles apresentam propriedades físicas e químicas que podem vir a representar melhorias farmacocinéticas e farmacodinâmicas de ativos farmacêuticos que possuem características problemáticas para a manutenção da faixa terapêutica e/ou entrega do composto no foco desejado (SALATA, O V; HOET, 2004). O uso de nanopartículas biodegradáveis representa um importante caminho no desenvolvimento de estruturas carreadoras específicas que são capazes de penetrar barreiras e manter a liberação sustentada por tempo prolongado do composto desejado (SAHOO; LABHASETWAR, 2003).

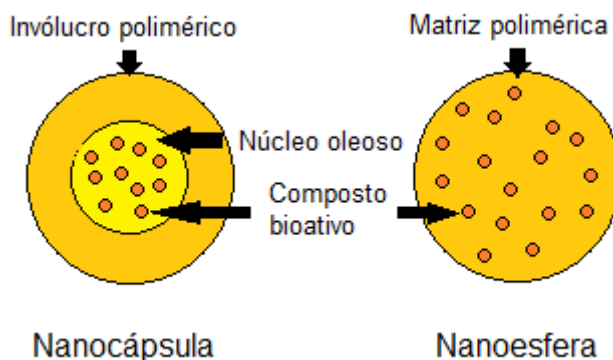
Figura 1. Escala de comparação de materiais nanométricos (FONTE: o autor).



As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com o tipo de material que foi utilizado na formação da estrutura molecular, podendo ser essas inorgânicas, lipídicas sólidas, lipossomos, nanotubos, dendrímeros e poliméricas; podendo apresentar organização estrutural na forma de nanocápsula, que possui uma camada polimérica envolvendo um interior oleoso agindo assim como um reservatório, ou uma nanoesfera, que é formado por uma

matriz polimérica maciça sem a presença do núcleo oleoso e com o composto ativo espalhado tanto no interior como na superfície da estrutura, representada na Figura 2 (SCHAFFAZICK; GUTERRES; DE LUCCA FREITAS, 2003).

Figura 2. Representação da nanopartículas poliméricas (FONTE: o autor).



Por apresentar características favoráveis e metodologias para obtenção relativamente simples, as nanopartículas poliméricas vem sendo extensivamente empregadas por apresentar propriedades de biocompatibilidade e estabilidade (EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Para que essa estruturas permaneçam estáveis e para que as características de entrega dos compostos ativos ocorram de forma racional e controlada, os componentes da formulação devem formar um complexo que venha a atender as necessidades requisitadas, envolvendo fatores complexos que irão definir o polímero e, muitas vezes, o copolímero adequado (DES RIEUX; FIEVEZ; GARINOT, 2006).

Dentre a grande variedade de polímeros empregados, temos os polímeros naturais (zeína, caseína, albumina), proteínas e polissacarídeos (quitosana, amido, celulose); e polímeros sintéticos, como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-coglicólico) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e poli (metil metacrilato). No geral, polímeros naturais tendem a apresentar um perfil de entrega mais acelerado e menor estabilidade quando comparados aos polímeros sintéticos. Isso se deve ao fato de que alguns polímeros são mais sensíveis por apresentarem diferenças na composição química, cristalinidade e peso molecular (BRANNON-PEPPAS, 1995). Tanto polímeros naturais quanto sintéticos não apresentam alta toxicidade, porém, a necessidade do uso de solventes orgânicos para os polímeros sintéticos é uma desvantagem quando comparado a polímeros naturais, que por muitas vezes são solúveis em soluções

aquosas, não sendo necessária a retirada, através de métodos de evaporação, do solvente utilizado (SCHÖLER; OLBRICH; TABATT, 2001).

Para a escolha da técnica de preparo das nanopartículas devemos escolher qual metodologia irá atender as diversas exigências relacionadas aos polímeros, estabilizantes, aos compostos ativos que serão empregados na formulação e o local de entrega desses compostos (HANS; LOWMAN, 2002). Uma das características de interesse em uma nanopartícula é a capacidade de carrear compostos ativos, que durante o preparo pode ocorrer por meio de um aprisionamento no momento da formação da nanopartícula ou a adsorção dos compostos ativos após essa formação, bem como a entrega do composto ativo de forma controlada e no local desejado, que ocorre por meio da fragilização do sistema polimérico fazendo com que ocorra um perfil de liberação de acordo com a degradação da estrutura polimérica, ocorrendo ela por meio de: desorção superficial, difusão através da matriz polimérica, difusão através da parede polimérica, erosão da matriz e processos combinados (SOPPIMATH, 2001).

Um fator importante na elaboração dos protocolos para a elaboração das formulações nanométricas é o tamanho das partículas e a distribuição destes tamanhos, destacando que esse atributo é crucial para a transposição de barreiras fisiológicas, proteção contra o sistema fagocitário, estabilidade da formulação e liberação, considerando que o tamanho da partícula é inversamente proporcional a sua superfície de contato (SINGH; LILLARD, 2009).

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para o preparo de nanopartículas, modificadas de acordo com os componentes da formulação e a morfologia desejada. Muitas dessas técnicas pode ser divididas em duas fases, sendo a primeira a obtenção de uma emulsão, que em alguns casos as nanopartículas se formam espontaneamente, e a segunda à formação do sistema nanoestruturado, onde geralmente o princípio utilizado nomeia o método (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Uma grande variedade de ligantes vem sendo incorporados na superfície das nanopartículas, permitindo que estes compostos sejam funcionalizados, para que possam ser usados na detecção de biomoléculas e células em diagnósticos de doenças, direcionamento da entrega de compostos ativos através de opsonização e proteção contra o sistema imunitário por meio de revestimentos poliméricos (MOUT; MOYANO; RANA, 2012). Dentre as

nanoestruturas podemos observar uma enorme quantidade de formatos entre esses sistemas particulados, formas que podem facilitar o funcionamento do carreador. Cada forma confere um perfil singular na cinética de liberação, que está relacionado a degradação do polímero, e na interação com células e órgãos. O controle das formas no momento do planejamento racional oferece a possibilidade de regular a interação das partículas com o local de ação, reduzindo a toxicidade do composto empregado, voltando a atenção para a geometria, que vem sendo explorado com interesse na especificidade conferida por essa característica, resultando assim no desenvolvimento de aplicações biomédicas mais eficiente e terapias, sem a necessidade de mudar a composição química do sistema (LIMA; ALVAREZ-LORENZO; MANO, 2016).

Estudos toxicológicos relacionados as nanopartículas vem expondo a importância no controle da produção e a exposição prolongada, visto que também podem representar futuramente um problema ambiental (STONE; JOHNSTON; CLIFT, 2007). Partículas ultrafinas e de material pouco solúvel, poeiras e nanopartículas sintetizadas, são uma preocupação quando aspiradas para o sistema respiratório, por apresentar caráter tóxico e inflamatório que podem conduzir ao estresse oxidativo. Para evitar esses problemas diversas caracterizações são empregadas em estudos toxicológicos, que irão avaliar características físico químicas e interações biológicas (OMLOR; NGUYEN; BALS, 2015).

Como parte do processo de desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, as caracterizações são pré-requisito que avaliam as propriedades para entender e prever possíveis interações fisiológicas que estão relacionadas a características, como: biodistribuição, distribuição dos tamanhos, toxicidade, propriedades superficiais, morfologia, estabilidade e interação do fármaco com o polímero (CRUCHO; TERESA, 2017). Por meio da interpretação dos resultados, obtidos nas caracterizações, podemos entender melhor a natureza e comportamento em meios fisiológicos, conseguindo por meio destes um melhor controle no processo de produção, maximizando o rendimento, e armazenamento, potencializando a estabilidade das formulações (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

Atualmente uma grande quantidade de formulações em estudo tem demonstrado resultados pré-clínicos e clínicos satisfatórios em tratamentos e

diagnósticos, envolvendo diversas patologias crônicas e agudas. Todo o potencial demonstrado pelas nanopartículas sugere que estas estruturas representem o futuro de tratamento de diversos tipos de câncer, reduzindo efeitos colaterais por meio de diversas técnicas de entrega controlada dos compostos ativos, por meio da criação de modelos terapêuticos inovadores, bem como os métodos diagnósticos, por biomarcadores acoplados a superfície de sistemas utilizados em diagnósticos por contraste (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2016).

A DA também tem sido foco para aplicações nanotecnológicas, tanto no tratamento quanto no diagnóstico, trazendo benefícios que vão desde a manutenção da faixa terapêutica, transposição de barreiras e métodos eficazes de identificação da patologia; outra vantagem é a possibilidade da administração intranasal, uma promissora rota de medicamentos para doenças neurológicas, desempenhando um papel importante na transposição da barreira hematoencefálica, direcionando esses imediatamente para o cérebro (FONSECA-SANTOS, 2015), visto que nanopartículas sem revestimentos específicos apresentam dificuldades para a transposição de barreiras.

O envelhecimento populacional faz com que ocorra uma prevalência de doenças e desordens do sistema nervoso central, fazendo com que a procura por uma terapêutica melhorada aumente com o tempo, despertando grande interesse comercial que estão sendo explorado para aplicações nos últimos 40 anos (PATEL; ZHOU; PIEPMEIER, 2012).

2.3 NANOPRECIPITAÇÃO

Dentre as diversas técnicas usadas para a formação de nanopartículas, a metodologia de nanoprecipitação, também pode ser chamada de deslocamento de solvente, que consiste em uma técnica simples, onde o polímero e a droga são dispersos em solvente que ao entrar em contato com o não solvente, que deve apresentar miscibilidade com a fase orgânica, ocorre uma precipitação das nanopartículas por meio de uma rápida dessolvatação, fazendo com que o polímero envolva o composto ativo (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005).

O mecanismo de formação dessas estruturas deve-se a turbulência entre as interfaces das duas fases líquidas, que estão em desequilíbrio, também conhecido como efeito Maragoni, envolvendo variações de tensão interfacial que podem advir por diversos fatores, como: a transferência de soluto da fase com maior viscosidade, gradiente de concentração perto da interface e concentração de polímero (FESSI; PUISIEUX; DEVISSAGUE, 1989).

Embora o método seja polivalente, podendo ser utilizado a partir de uma grande variedade de polímeros hidrofóbicos, ele vem sendo aplicado principalmente para a formação de partículas de PLGA e PCL, com a finalidade de aplicação relacionada a entrega de compostos (LEBOUILLE; STEPANYAN; SLOT, 2013).

Polímeros naturais também são utilizados nesta metodologia, tendo as proteínas como principais representantes desses biopolímeros, e vem ganhando importância em sistemas de entrega por apresentar diversas vantagens frente aos polímeros sintéticos, como a biocompatibilidade e biodegradação, geralmente sem a formação de produtos tóxicos. Uma importante vantagem que os biopolímeros apresentam é o baixo valor das proteínas utilizadas quando comparados aos polímeros sintéticos, por provir de fonte animal ou vegetal (MARTÍNEZ RIVAS; TARHINI; BADRI, 2017).

Algumas limitações relacionada a técnica de nanoprecipitação é a má captação de drogas hidrofílicas, que apresentam reduzida eficiência de encapsulação, a dificuldade de retirada dos solventes orgânicos utilizados para promover a solubilização do polímero e do composto ativo e as baixas concentrações de polímero utilizada nas metodologias que tendem a apresentar baixo rendimento por lote (AHLIN GRABNAR; KRISTL, 2011).

2.4 GALANTAMINA

A galantamina foi isolada pela primeira vez por uma variedade de espécies pertencentes à família Amarilledaceae, que é caracterizada por um grupo de alcaloides terciários bioativos (BERKOV; VILADOMAT; CODINA, 2012). Essas monocotiledôneas são identificadas devido à presença de duas folhas e uma flor branca, abrangendo 20 espécies de *Galanthus*, é comumente usada para

ornamentação, onde ficou popularmente conhecida por “flocos de neve” (RØNSTED; ZUBOV; BRUUN-LUND, 2013).

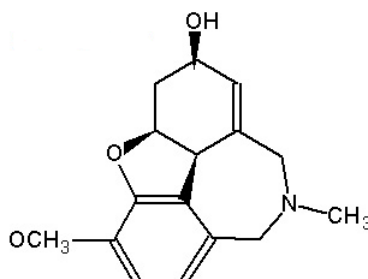
Atualmente, a galantamina passou a ser produzida através de diversos métodos por síntese (KODAMA; HAMASHIMA; NISHIDE, 2004), possibilitando rotas sintéticas de alto rendimento. A síntese deve-se ao elevado custo de extração do composto de uso clínico e a escassez de fontes naturais da matéria prima, tornando-se assim uma alternativa viável visando maior rendimento e menor custo (SHIEH; CARLSON, 1994).

O perfil farmacológico da galantamina (Figura 3) deve-se ao seu mecanismo de ação que além de inibir competitivamente de modo reversível a acetilcolinesterase, também age modulando alostéricamente os receptores nicotínicos. Essa dupla função farmacológica induz a uma maior concentração de acetilcolina e glutamato nas fendas sinápticas e redução da toxicidade dos peptídeos beta amilóides, que são os responsáveis pela formação de placas neuríticas, representando assim uma terapia promissora para combater a DA leve a moderada (LILIENFELD, 2002; SRAMEK; FRACKIEWICZ; CUTLER, 2000).

Este alcaloide fenantrênico (Figura 3) pode ser administrado com segurança por todas as vias, porém a mais elucidada em estudos de cinética e dinâmica é a via oral. A disponibilidade deste composto varia de 85 a 100% por via oral e é imediatamente absorvido, tendo o T_{max} no intervalo de 0,5 a 2 horas e $T_{1/2}$ de 5 a 7 horas. A metabolização ocorre em sua grande maioria na via hepática, onde as isoenzimas CYP catalisam a galantamina em outros compostos que são eliminados majoritariamente na urina (JANN; SHIRLEY; SMALL, 2002).

O interesse terapêutico deste potente inibidor da IACh, que até então era usado para reversão de bloqueio neuromuscular pós-anestesia, miopatias e neuropatias periféricas, veio em 1982, quando avanços nos estudos com pacientes geriátricos com disfunções de memória, conduziram a hipótese colinérgica como sendo uma possível causa para a DA. O uso da galantamina para o tratamento da demência foi patenteado e o depósito foi feito em 1986 (MUCKE, 2015).

Figura 3. Estrutura Galantamina (FONTE: o autor).



O tratamento farmacológico atual, utilizado na DA leve a moderada, resume-se na administração de uma alta dose de vitamina E combinada com um inibidor da colinesterase. Aprovados pela FDA para o tratamento da demência, os inibidores da colinesterase têm demonstrado eficácia na função cognitiva, motora e comportamental dos pacientes. A galantamina é uma das opções farmacológicas de primeira linha entre os inibidores da colinesterase, por não apresentar hepatotoxicidade, possuir poucas interações medicamentosas significativas e efeitos colaterais moderados, como: Náusea, diarreia e anorexia (BONNER; PESKIND, 2002).

Comercializada na forma de sal de bromidrato, a galantamina foi o último entre os principais medicamentos da sua categoria a ser aprovado pela FDA mas foi o primeiro a tornar-se disponível na forma genérica. Encontrado nas concentrações de 4mg, 8mg e 12mg, a Razadyne®IR (nomeado como Reminyl®IR em alguns países), medicamento referencial da galantamina, pode também ser apresentado na forma ER (liberação estendida) com concentrações de 8mg, 16mg e 24mg. A forma ER da Razadyne® tornou mais cômoda a administração, reduzindo a frequência de duas doses para uma dose ao dia, melhorando a adesão dos pacientes ao tratamento (HING; PIOTROVSKY; KIMKO, 2005).

Para melhorar as características farmacodinâmicas e a adesão ao tratamento, a busca por diferentes estratégias alternativas pelas mais diversas rotas de administração é o foco principal dos estudos em andamento relacionados ao composto. Dentre essas estratégias, os sistemas transdérmicos e nasais se tornaram uma opção para pacientes que tem limitações na ingestão oral, bem como a nanotecnologia, que vem contribuindo na redução de efeitos colaterais, pela sua especificidade de atuação em um tecido alvo, e redução das

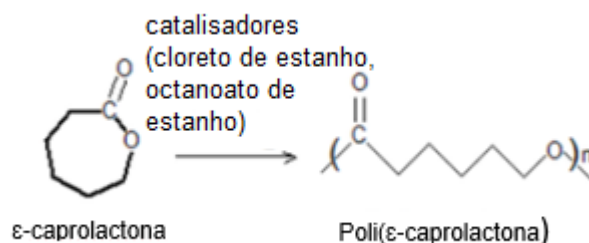
doses diárias, aumentando assim a adesão ao tratamento (DI STEFANO; IANNITELLI; LASERRA, 2011).

2.5 POLICAPROLACTONA

Os polímeros biodegradáveis vem atraindo a atenção das indústrias voltadas para a produção de materiais por serem uma alternativa sustentável para a solução de problemas ambientais, sendo a PCL o mais antigo polímero biodegradável acessível no mercado e apresentando aplicabilidades em diversos setores da tecnologia que vão desde o desenvolvimento de adesivos até aplicações na engenharia de tecidos corporais (KONG; YU; PEI, 2017).

A PCL é um poliéster alifático produzido a partir de petróleo bruto que apresenta hidrofobicidade e biodegradabilidade que pode variar desde alguns meses até anos, dependendo do meio ao qual está exposto, grau de cristalinidade do polímero e as condições de degradação (LABET; THIELEMANS, 2009). É um polímero sintético versátil, tendo um baixo ponto de fusão, e possui propriedades que podem ser alteradas conforme a variação da cristalinidade, como a solubilidade e a velocidade de degradação (SARASAM; MADIHALLY, 2005). A síntese da PCL ocorre pela abertura do anel cíclico do monômero de ϵ -caprolactona (Figura 4), que pode ser catalisado por uma grande variedade de catalisadores afetando de forma diferenciada o peso molecular e a estrutura química do polímero (MOHAMED; YUSOH, 2015).

Figura 4. Polimerização de ϵ -caprolactona (FONTE: o autor).



Dentre as diversas aplicações da PCL, a utilização desse polímero no campo da farmácia e biotecnologia é promissor, levando em consideração as características inerentes, como a biocompatibilidade, podendo ser utilizado no desenvolvimento de fios de sutura biodegradáveis, próteses e sistemas de

liberação de fármacos, como: microesferas, nanopartículas, dendrímeros, micelas, filmes e hidrogéis (DASH; KONKIMALLA, 2012).

O PCL é um material hidrofóbico termoplástico semi-cristalino que apresenta solubilidade em uma grande variedade de solventes orgânicos, dentre eles o tetrahidrofurano, clorofórmio, benzeno, tolueno, cloreto de metileno, tetracloreto de carbono, 2-nitropropano e hidropirano de ciclohexanona; e parcialmente solúvel em acetonitrila, dimetil fumarato, acetona, etil acetato e 2-butanona (SABIR; XU; LI, 2009).

O preparo de estruturas nanométricas para a liberação controlada utilizando a PCL apresenta vantagens que vão além de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, que é a capacidade de incorporação de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular em sua matriz. Essa singularidade relacionada a PCL e a metodologia de formação por nanoprecipitação ocorre devido a formação de poros interconectados na matriz que possibilitam a internalização de compostos solúveis em água (CHANG; WANG; PERRIE, 2010). A possibilidade de formulações híbridas com polímeros naturais é de grande interesse, levando em conta que a sinergia entre as características dos compostos traz vantagens no controle da liberação e na afinidade do sistema polimérico pelo composto ativo (DADKHAH TEHRANI; PARSAMANESH, 2017).

2.6 POLISSORBATO 80

O polissorbato 80 (PS80), também chamado comercialmente de Tween® 80, é um tensoativo amplamente utilizado na indústria, por apresentar aplicabilidades funcionais que vão além das suas propriedades emulsificantes, sendo indispensável no desenvolvimento de produtos no campo farmacotécnico, cosmético e alimentício (EMA; HARA; MATSUMOTO, 2008).

Os surfactantes não aniônicos conhecidos como Tweens diferenciam-se pelas quantidade de frações de oxietileno, sendo o Tween 80 o mais utilizado em aplicações farmacêuticas por ser um material não tóxico e por melhorar características de permeabilidade de barreiras fisiológicas devido a sua natureza estrutural como tensoativo (KAUR; MEHTA, 2017). Outra importante função atribuída ao PS80 é a melhora da biodisponibilidade oral, através da estimulação causada pelo ácido oleico, que é liberado através da digestão intestinal do

surfactante, podendo levar a melhora na excreção de quilomícrons, favorecendo assim, a absorção de drogas lipofílicas e transporte linfático (SEEBALLUCK; LAWLESS; ASHFORD, 2004).

As nanoformulações utilizadas para o transporte e entrega de compostos ativos em lugares específicos, vem incorporando de forma conveniente o PS80 para aplicação de metodologias para a formulação de nanopartículas e para a melhora na estabilidade. Por necessitar de tensoativo a maioria das nanoestruturas poliméricas, formadas por meio de um processo de emulsão, necessitam do PS80 ou outro tipo de polissorbatos, bem como o método de nanoprecipitação. As nanopartículas poliméricas tendem a apresentar certa instabilidade, podendo levar a agregações das partículas e outras características não desejadas com o passar do tempo, que podem ser evitadas pela incorporação do PS80, que irá estabilizar a formulação por meio da competição com os polímeros pelas interfaces hidrofóbicas que poderiam se agregar (MARTOS; KOCH; JISKOOT, 2017).

Por se tratar de um tensoativo muito empregado no desenvolvimentos de diversos produtos, o PS80 ganhou visibilidade principalmente no setor alimentar e ganhando cada vez mais espaço como adjuvante farmacotécnico, muito explorado em diversas formulações de sistemas carreadores e de liberação controlada.

2.7 ZEÍNA

A zeína é um tipo de proteína de armazenamento, encontrada em abundância no milho, pertencente ao grupo das prolaminas, que foram nomeadas assim devido a quantidade de prolina em sua composição (SHUKLA; CHERYAN, 2001). Possui característica predominantemente hidrofóbicas e são subdivididas em 4 grupos que diferem em massa molar e solubilidade diferenciada em soluções hidroetanólicas (ESEN, 1986).

Além de ser um material biodegradável e biocompatível, também possui boas propriedades mecânicas, de plasticidade e resistência térmica e por se tratar de um biomaterial não gera preocupação quanto a formação de compostos tóxicos para o organismo, que são de grande interesse para aplicações

industriais, principalmente no setor alimentício e farmacêutico (CORRADINI; CURTI; MENIQUETI, 2014). A utilização da zeína em aplicações biomédicas vem sendo intensivamente pesquisada, tendo destaque nas áreas de produção de biofilmes, entrega de drogas através de estratégias utilizadas pela nanomedicina (DEFRATES; MOORE; BORGESI, 2018).

Muitos biopolímeros estão sendo testados para a utilização em sistemas de entregas, formados por nanocarreadores, e a zeína tem demonstrado boas propriedades de liberação controlada e estabilidade em ambiente fisiológico (LUO; WANG; TENG, 2013). A formação de nanoestruturas utilizando estas prolaminas apresentam metodologias rápidas e eficientes, quanto as suas características físico-químicas, porém apresentam maior afinidade para encapsular compostos lipofílicos (PATEL; VELIKOV, 2014).

Reconhecido pela FDA como um excipiente seguro para a utilização em fármacos administrados tanto pela via oral quanto a parenteral, a zeína vem ganhando espaço nos estudos de nanopartículas de liberação controlada, órteses cardiovasculares e diversas aplicações no campo nutracêutico (PODARALLA; PERUMAL, 2012), representando uma possível alternativa no desenvolvimento de biopolímeros.

2.8 CASEÍNA

A caseína é uma proteína de origem animal, sendo ela uma das principais proteínas presentes no leite. Dentre as diversas formas de obtenção da caseína, a partir do leite, temos a precipitação da caseína através da redução do pH, que forma agregados facilmente separáveis através de centrifugação (FOX; MCSWEENEY, 2003).

Assim como a zeína, as caseínas são abundantes em prolina, e também são divididas em subfrações. Essas frações podem ser reconhecidas pelas suas diferentes quantidades de grupos carboxílicos e fosfatos. Estas proteínas possuem características anfipáticas e a massa molar varia de 19 e 25 kDa e seu ponto isoelétrico é de 4,6 (HOLLAR; LAW; DALGLEISH, 1991).

Por apresentar características poliméricas e biodegradáveis, esta proteína despertou o interesse no campo biomédico e está sendo extensivamente estudada nas mais diversas aplicações, devido a sua versatilidade química e similaridade com tecidos que constituem o organismo (VAZ; FOSSEN; TUIL, 2002).

A caseína apresenta grande potencial no desenvolvimento de micro e nanopartículas, que facilitam sua funcionalidade em sistemas de liberação controlada devido a suas propriedades físico-químicas, entretanto sua aplicação é voltada para compostos hidrofóbicos (PENALVA; ESPARZA; IRACHE, 2015). Quando associada com outros biopolímeros, a caseína confere maior estabilidade eletroestática as nanopartículas, dando-lhes maior resistência a tratamentos térmicos e mecânicos, sendo assim um interessante agente estabilizador (SHAPIRA; ASSARAF; EPSTEIN, 2010).

2.9 CARACTERIZAÇÕES E AVALIAÇÕES DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

No processo de desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada, alguns métodos são utilizados na investigação e caracterização das nanopartículas, com o intuito de reconhecer os atributos físico-químicos e relacioná-los com o sistema fisiológico, a fim de melhorar o desempenho da formulação (MÜLLER-GOYMANN, 2004). Os testes de avaliação da estabilidade também nos mostram como o produto irá se comportar após a sua fabricação, avaliando a morfologia tamanho e distribuição das partículas, sedimentação, potencial zeta, estado de cristalinidade e estabilidade química (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

O tamanho de partícula é um importante parâmetro de controle de produção e qualidade utilizado na caracterização e na avaliação da estabilidade de nanopartículas, podendo ser avaliado o diâmetro médio, índice de poli dispersão (IPD) e distribuição de tamanho. Por meio desta análise podemos detectar tendências de agregações e posteriores precipitações e sedimentações das nanosuspensões (GAUMET; VARGAS; GURNY, 2008).

A determinação do potencial zeta, que é a avaliação do potencial elétrico formado na superfície de pequenas partículas em suspensão, está intimamente relacionada com a estabilidade e morfologia da superfície da partícula. A técnica para avaliar o potencial zeta consiste na afinidade da carga superficial de acordo com a sua mobilidade eletroforética (XU, 2008).

Dentre as avaliações químicas utilizadas, tanto na caracterização de novos compostos quanto nos testes de estabilidade, a eficiência de encapsulação (EE), que avalia a quantidade de composto ativo foi internalizado nas nanopartículas, pode se dar tanto pela forma direta quanto indireta. A técnica mais empregada para a separação do composto livre é a ultracentrifugação, onde a fração de medicamento que não foi aprisionado no momento de formação da nanopartícula fica no líquido sobrenadante (CHO; HOLBACK; LIU, 2013).

Os estudos voltados para análise da estabilidade das formulações apreciam a capacidade do produto final em manter a sua integridade química, física, microbiológica e biofarmacêuticas; durante um período que determinará a sua validade de acordo com limites especificados previamente, que irão indicar se o produto está perdendo o seu efeito terapêutico ou até mesmo acompanhar a formação de produtos de degradação que possam vir a comprometer a segurança do usuário (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999)

Os ensaios de estabilidade dividem-se em estudo acelerado, de acompanhamento e de longa duração; que seguem diretrizes que irão simular alguns fatores extrínsecos de acordo com a região em que o ensaio será realizado. Os fatores que devemos observar durante o estudo de estabilidade podem ser intrínsecos e extrínsecos, destacando-se: temperatura, umidade, luz, hidrólise e oxidação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização de um sistema polimérico nanoestruturado contendo bromidrato de galantamina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanopartículas de PCL, pelo método da nanoprecipitação, e zeína/caseína, usando a metodologia de dispersão de líquido-líquido, ambas contendo galantamina;
- Determinar a eficiência de encapsulação da galantamina nas nanopartículas;
- Caracterizar as nanopartículas de acordo com os parâmetros físico-químicos: diâmetro médio, IPD, distribuição de tamanho, potencial zeta, interação do composto e polímero (Difração de Raio-X e Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier);
- Avaliar a estabilidade sob diferentes condições de temperatura e
- Avaliar o perfil de liberação gastrointestinal do bromidrato de galantamina;
- Avaliar a morfologia das nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

- Água ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18,2 MΩ/cm);
- D(+) Sacarose P.A. (Vetec, Brasil);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Acetona (Vetec®);
- Cloreto de potássio (KCl) (Biotec®);
- Poli(ε-caprolactona) (PCL) media massa molar ~14,000 e 10,000 (Sigma-Aldrich®);
- Tween 80-Polysorbato 80 (Sigma-Aldrich®);
- Bromidrato de Galantamina (Jubilant Generics®);
- Ácido fórmico (Sigma-Aldrich®);
- Zeína (Sigma-Aldrich, EUA);
- NaCl (Biotec, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Biotec, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec, Brasil);
- Etanol 95% (Fmaia, Brasil);
- Caseinato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA);

4.2 EQUIPAMENTO E ACESSÓRIOS

- Agitador de tubos tipo Vórtex (Quimis®);
- Balança analítica-AUY220 (Shimadzu®);
- Bomba a vácuo- TE 058 (Tecnal ®);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (Waters® 2695 Alliance com detector de Arranjo de Diodo DAD 2998);
- Equipamento de espalhamento dinâmico de luz (Light Scattering-Brookhaven® 90 Plus);

- Equipamento para análise do potencial z- ZetaSizer ZS (Malvern®);
- Evaporador rotativo M-120 (Marconi®);
- Membranas filtrantes de acetato de celulose de 0,22 µm e PTFE 0,45 µm (Millipore®);
- Micropipetas (Labmate®);
- Sistema de ultrapurificação de água (MilliQ Gradiente Millipore®);
- Placa de aquecimento com agitação (Go-Stirrer®);
- Espectrômetro de Infravermelho Frontier (Perkin Elmer®);
- Difratorômetro de raio-x MiniFlex 600 (Rigaku®);
- Metalizador SCD 050 (Baltec®);
- Microscópio eletrônico de varredura de duplo feixe Scios (FEI®).

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Obtenção de nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina.

As nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina foram obtidas através da metodologia de nanoprecipitação, proposto por Fessi et al., (1989), com modificações.

Pesou-se 32,3mg da PCL, que foram dissolvidas em 3 ml de acetona sob agitação e aquecimento. Paralelamente, preparou-se uma solução estoque de bromidrato de galantamina em acetona 85%, na concentração de 3,23 mg/ml. Ainda sob agitação, gotejou-se 2ml da solução de bromidrato de galantamina sobre a que contém a PCL, resultando em uma fase orgânica. Posteriormente a fase orgânica foi gotejada sobre 15 ml de fase aquosa, composta por PS80 0,3%, sob agitação magnética e temperatura ambiente.

Terminado o gotejamento da fase orgânica sobre a fase aquosa, foi mantida a agitação magnética por 10 min, seguido da remoção do solvente orgânico por rotaevaporação a 37 °C durante 45 minutos, sob pressão reduzida. A suspensão coloidal foi submetida a centrifugação (25240 g, 10 °C, 10 minutos), para a separação das nanopartículas obtidas do líquido sobrenadante contendo a porção de bromidrato de galantamina não encapsulado, representado na Figura 5. O sobrenadante foi guardado para posterior análise da EE.

As nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina foram mantidas na forma de suspensão aquosa.

Figura 5. Esquema de obtenção de nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina (FONTE: o autor).



4.3.2 Obtenção de nanopartículas de zeína/caseína contendo bromidrato de galantamina

Devido a solubilidade da zeína em soluções hidroalcoólicas na faixa de 60 a 85%, utilizou-se desta propriedade para a obtenção das nanopartículas de zeína/caseína contendo bromidrato de galantamina. Devido a interdifusão que ocorre quando a solução alcoólica contendo a zeína e o composto ativo entra em contato com a fase aquosa, onde a caseína foi solubilizada, conduzindo a formação das nanoestruturas (WU; LUO; WANG, 2012). A técnica utilizada para a obtenção das nanopartículas é chamada de dispersão líquido-líquido (ZHONG; JIN, 2009) com modificações, como demonstrado na Figura 6.

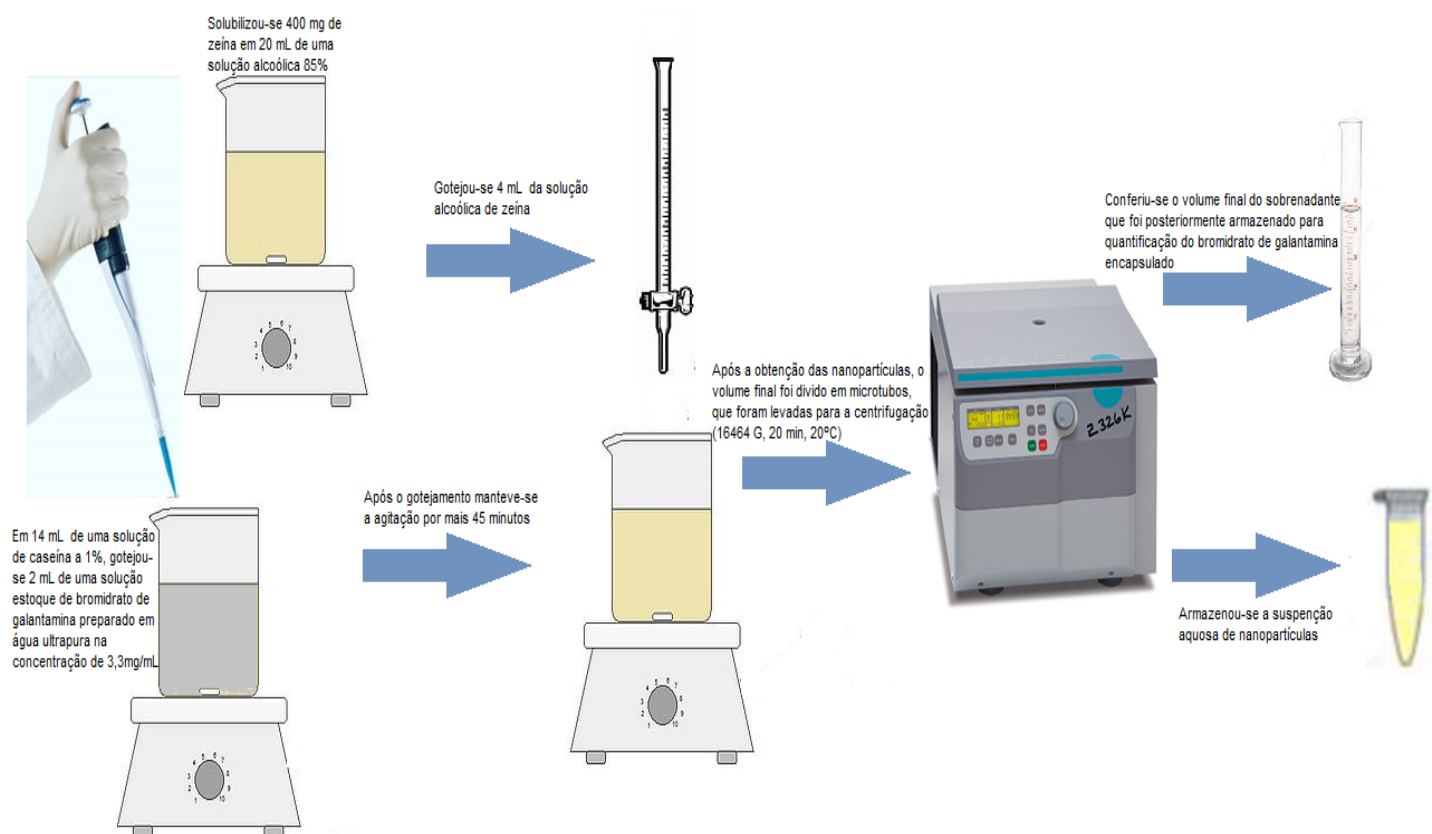
Para o preparo da formulação, uma solução estoque de zeína 20mg/ml foi preparada em álcool 85%. Paralelamente preparou-se uma solução aquosa de caseína (10 mg/mL), sob a agitação magnética até total dissolução.

Em 14 mL da solução de caseína, adicionou-se 2 mL de uma solução estoque de bromidrato de galantamina solubilizado em água Milli-Q, na proporção de 3,3 mg/mL sob agitação magnética, onde permaneceu por mais 30 minutos. Passado o tempo de incorporação do composto ativo na fase aquosa, iniciou-se o gotejamento de 4 mL da solução de zeína sobre a fase aquosa, ainda

sobre agitação magnética. Concluído o gotejamento da fase orgânica sobre a aquosa, manteve-se a agitação por mais 45 minutos.

Após a obtenção das nanopartículas, o volume final foi dividido em microtubos, que foram levadas para a centrifugação (16464 G, 20 min, 20°C). Terminada a centrifugação da suspensão aquosa, obteve-se o líquido sobrenadante, que foi conferido o seu volume final para posteriores quantificações do bromidrato de galantamina, e as nanopartículas foram ressuspensas em 1,5 mL de água ultrapura e armazenado. Para a obtenção das nanopartículas vazias utilizou-se o mesmo processo, sem a adição do bromidrato de galantamina.

Figura 6. Esquema de obtenção de nanopartículas de zeína/caseína contendo bromidrato de galantamina (FONTE: o autor).



4.3.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

4.3.3.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas

O tamanho médio e o índice de polidispersão (IPD) foram obtidos através da técnica de espectroscopia por correlação de fótons, conhecida como *Dynamic Light Scattering* (DLS). Para o preparo das amostras uma alíquota do ressuspendido de nanopartículas foi diluída em água ultrapura na proporção de 1:200 (v/v) e colocadas em uma cubeta para a investigação. O equipamento utilizado para a medida de espalhamento de luz, da marca Brookhaven® 90 plus, que utilizou comprimento de onda de 659 nm, ângulo de espalhamento de 90° a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (DP) N=3.

4.3.3.2 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) das nanopartículas foram performados no aparelho ZetaSizer ZS Malvern®, que determinou o PZ a partir da mobilidade eletroforética por anemometria laser doppler.

As amostras foram preparadas a partir de uma alíquota do ressuspendido de nanopartículas em solução de KCl 1 mM, para a manutenção da força iônica do meio, na proporção de 1:200 (v/v). Após o preparo, as amostras foram acondicionadas em células eletroforéticas, onde a técnica foi executada a temperatura ambiente sob o potencial de ± 150 mV. Os valores foram obtidos em triplicata e calculou-se a média e DP N=3.

4.3.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier

Para as análises espectroscópicas na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) utilizou-se o equipamento Frontier Perkin Elmer®. As amostras, previamente liofilizadas, das nanopartículas e de seus compostos isolados; foram analisadas sem tratamento em resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo

de 4000 a 500 cm^{-1} , com um total de 16 *scans*, onde foram analisadas as amostras de nanopartículas carregadas, nanopartículas vazias e os componentes das nanopartículas (galantamina livre, PCL e mistura física).

4.3.3.4 Difração de Raio-X

Os difratogramas foram obtidos com a utilização do aparelho MiniFlex 600 Rigaku®, onde foram analisadas as amostras de PCL, bromidrato de galantamina, mistura física e liofilizados de nanopartículas (carregadas e vazias). As amostras foram acondicionadas em suportes de alumínio e analisadas com tensão de 30 kV, corrente aplicada de 10 mA e analisadas na faixa 2θ de 5° a 70° , com uma taxa de aquisição de 1°min^{-1} , onde foram analisadas as amostras de nanopartículas carregadas, nanopartículas vazias e os componentes das nanopartículas (galantamina livre, PCL e mistura física).

4.3.3.5 Método analítico para quantificação do bromidrato de galantamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para quantificação do bromidrato de galantamina utilizou-se de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), previamente descrita por SURESH et al. (2014) com algumas modificações. Foi utilizado o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência Waters® Alliance, com detector de arranjo de diodos (PDA). O tempo de corrida foi de 7 minutos e as condições utilizadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação de bromidrato de galantamina.

Coluna	Fluxo	Volume de injeção	Fase Móvel	Comprimento de onda
250mm x 4,6mm	0,8 mL/min	20 μ L	Acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (70:30 v/v)	289 nm

Conforme preconizações da ANVISA (2013), a linearidade do método foi definida por meio da análise em triplicata de diferentes concentrações de

bromidrato de galantamina (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL), preparadas a partir de uma solução mãe com concentração de 1 mg/mL em metanol. Com base no cálculo da regressão linear, empregando mínimos quadrados, determinou-se a linearidade do método onde os valores correspondentes a área sob a curva foram utilizados para os cálculo da equação da reta e do coeficiente de correlação (r^2), sendo o ideal o mais próximo de 1.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados utilizando as equações 1 e 2 respectivamente. Os dados foram obtidos a partir da curva analítica construída para determinação da linearidade. Onde: (σ) corresponde ao DP médio do intercepto com o eixo y e (b) a inclinação da curva analítica ou slope.

$$LD = \frac{(3,3 \cdot \sigma)}{b} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = \frac{(10 \cdot \sigma)}{b} \quad (\text{Equação 2})$$

O LD constitui a menor concentração de analito detectada, não sendo necessária a quantificação, em condições experimentais estabelecidas; o LQ corresponde à menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com precisão e exatidão aceitáveis, em condições experimentais estabelecidas (BRITO; AMARANTE JUNIOR; POLESE, 2003).

4.3.3.6 Determinação de eficiência de encapsulação

A quantificação do bromidrato de galantamina foi determinada pelo método indireto, onde a concentração do composto presente no sobrenadante resultante do processo de centrifugação é equivalente a droga não incorporada às nanopartículas.

As amostras foram preparadas a partir de uma alíquota do líquido sobrenadante, resultante da centrifugação contendo o composto livre, que foi diluída em metanol na proporção de 1:5 e filtrada em membrana de porosidade de 0,22 µm, para posterior análise no sistema cromatográfico. As análises foram realizadas em triplicatas. A concentração foi determinada a partir do cálculo feito por meio da equação da reta fornecida pela curva analítica (PELTONEN; AITTA;

HYVÖNEN, 2004). Após as análises, a EE% foi determinada pela seguinte equação:

$$EE\% = \left[\frac{(BG_{inicial} - BG_{livre})}{BG_{inicial}} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$BG_{inicial}$, quantidade de bromidrato de galantamina adicionado inicialmente à formulação;

BG_{livre} , quantidade de bromidrato de galantamina não incorporado à partícula (presente no sobrenadante).

4.3.3.7 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo bromidrato de galantamina

A avaliação da estabilidade foi feita durante um período de 3 meses, onde monitorou-se 3 lotes da formulação de nanopartículas contendo o bromidrato de galantamina, expostos as condições ambientes e armazenados sob refrigeração (8 °C).

As amostras foram analisadas a partir do tempo zero em intervalos de 7 dias, durante os primeiros 48 dias, e no intervalo de 14 dias até o final do período avaliado. Avaliou-se o diâmetro médio, potencial zeta e IPD.

Os resultados obtidos para os lotes submetidos as condições ambientes e os acondicionados sob refrigeração, foram analisados e comparados por ANOVA com pós teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente iguais as diferenças quando $p > 0,05$.

4.3.3.8 Liberação do bromidrato de galantamina das nanopartículas carregadas em fluido gástrico (FGS) e intestinal simulado (FIS)

Neste ensaio foi avaliado o perfil de liberação do composto ativo das nanopartículas de PCL, em meio gástrico e intestinal simulado, sobre condições estabelecidas na USP 37, com adição das enzimas (“USP 37-NF 32 EN ESPAÑOL - VOLUMEN 2”, 2014).

Foi utilizado *shaker* de agitação orbital para simular o trânsito gastrointestinal, utilizando a velocidade de agitação de 150 RPM a 37 °C e ultracentrifugação da amostra em intervalos pré determinados (CASA; CRISTINA; MORAES, 2015), onde os sobrenadantes foram armazenados para posterior quantificação e substituídos por novo fluido simulado.

As amostras foram encubadas nas condições anteriormente citadas e foram coletadas as aliquotas nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos, referentes ao FGS; e nos intervalos de 180, 240, 300 e 360 minutos ao FIS. Para realizar a coleta as amostras foram centrifugadas a 25240 g a 10 °C durante 10 minutos, onde coletou-se 900 µL do sobrenadante e substituiu-se pela mesma quantidade de fluido simulado. Os sobrenadantes foram filtrados e analisados por CLAE para saber a quantidade de bromidrato de galantamina das nanopartículas durante a avaliação da liberação. O estudo foi feito em triplicata e os resultados foram expressos considerando o desvio padrão.

4.3.3.9 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura de duplo feixe (MEV-FIB)

Realizou-se a avaliação da morfologia das nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina no Microscópio Eletrônico de Varredura de Duplo Feixe (MEV-FIB) SCIOS FEI®. As amostras das suspensões de nanopartículas, foram inseridas em suportes metálicos e levadas para a secagem em temperatura ambiente. Após a secagem as amostras foram metalizadas em vácuo, com ouro coloidal, no aparelho metalizador SDC 050 Baltec®. As amostras foram observadas com aumento de 12000 e 150000 vezes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PCL CONTENDO BROMIDRATO DE GALANTAMINA

Para a obtenção das nanopartículas de PCL foi utilizada a metodologia da nanoprecipitação, devido a capacidade de encapsulamento de drogas hidrofílicas (CHANG; WANG; PERRIE, 2010), que mostrou-se eficiente em relação ao tamanho médio, distribuição de tamanhos e eficiência de encapsulação esperada.

A suspensão coloidal obtida por essa metodologia apresentou aparência branco leitoso.

5.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA/CASEÍNA CONTENDO BROMIDRATO DE GALANTAMINA

Para a obtenção das nanopartículas de zeína/caseína foi utilizada a metodologia de dispersão líquido-líquido, que mostrou-se eficiente em relação ao tamanho médio e distribuição de tamanhos, porém, insatisfatório em relação a eficiência de encapsulação do composto quando comparado com as nanopartículas de PCL carregadas.

A suspensão coloidal obtida por essa metodologia apresentou aparência leitoso amarelado quando observado sem utilização de equipamentos.

5.3 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

5.3.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão

A técnica de nanoprecipitação levou a formação de nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina, com diâmetro médio abaixo de 300 nm (Tabela 3), bem como as nanopartículas de zeína/caseína que foram obtidas

pela técnica de dispersão líquido-líquido. Considerando-se que o tempo de circulação sanguínea é melhorado e as barreiras fisiológicas podem ser facilmente permeadas por partículas menores que 300 nm, o sistema nanoestruturado obtido demonstra potencial sistema de entrega de compostos ativos, considerando que os poros vasculares apresentam tamanho de 300 a 700 nm (OBER; GUPTA, 2006).

Tabela 3. Tamanho médio e IPD das nanopartículas de PCL e zeína/caseína carregadas.

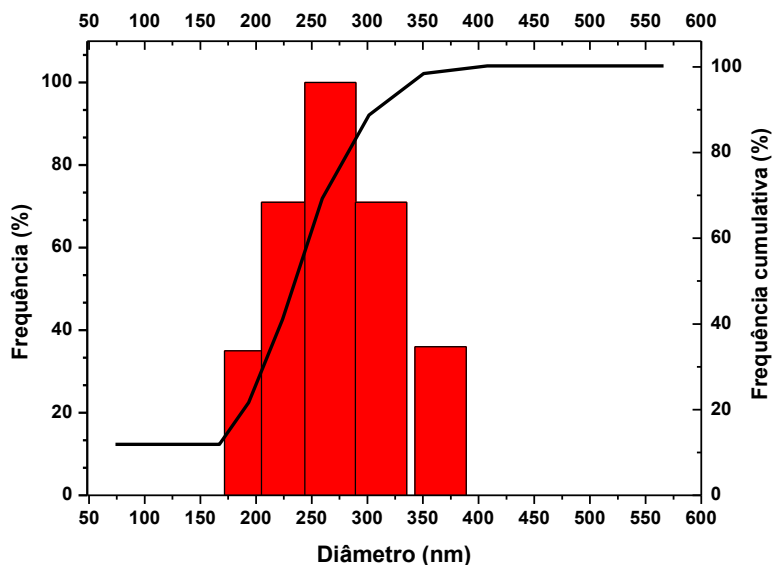
	Diâmetro médio (nm)	IPD
Nanopartículas de PCL carregadas	263,2 ± 7,74 ^a	0,11 ± 0,04 ^a
Nanopartículas de PCL vazias	263,0 ± 12,91 ^a	0,08 ± 0,01 ^a
Nanopartículas de zeína/caseína carregadas	254,3 ± 10,72 ^b	0,222 ± 0,001 ^b
Nanopartículas de zeína/caseína vazias	151,6 ± 6,42 ^c	0,205 ± 0,07 ^b

Mesmas letras (^{a, b, c}) significam que houve ou não igualdade estatística (Student's test e α 0,05).

Os valores de IPD vão de 0 a 1, onde os valores mais próximos a zero indicam uma distribuição de tamanho mais homogênea e os valores acima de 0,5 demonstram distribuição de tamanho desuniforme (AVADI; SADEGHI; MOHAMMADPOUR, 2010). Em relação ao IPD, os resultados obtidos, expressos na Tabela 3, revelaram que as nanopartículas carregadas e vazias, de PCL, apresentaram IPD menores que 0,3 e igualdade estatística e as nanopartículas de zeína/caseína não apresentaram igualdade estatística entre as carregadas e vazias em relação aos diâmetros médios, o que levam a entender que as partículas apresentaram homogeneidade nos tamanhos para o polímero PCL.

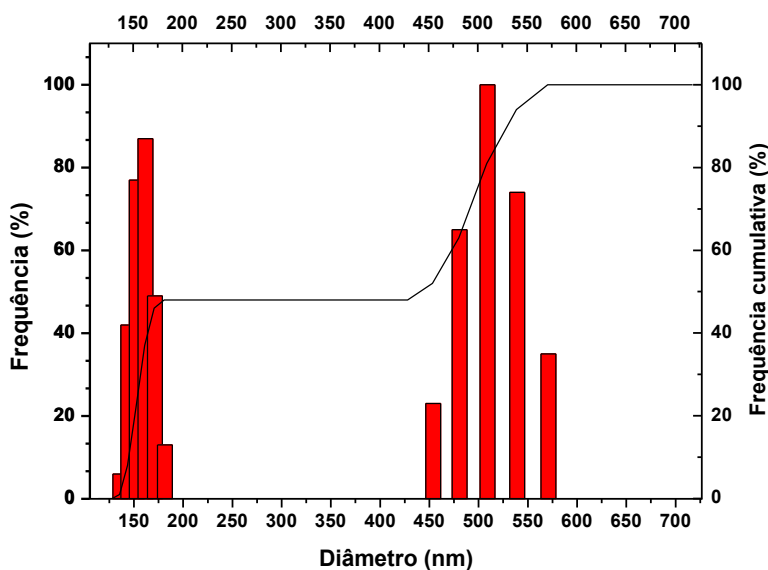
Na Figura 7 observa-se a presença de uma família, que revela um perfil monomodal de distribuição das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina, onde a família apresentou intervalo de tamanho entre 170 e 380 nm.

Figura 7 Distribuição de tamanhos das nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina.



Observando a Figura 8 vemos a presença de duas famílias apresentando um perfil bimodal de distribuição das nanopartículas de zeína/caseína contendo bromidrato de galantamina, onde as famílias aparecem no intervalo 136 a 181 nm, referentes a 48 % das nanopartículas, e 454 a 571 nm, referentes a 52 % das nanopartículas, sendo o tamanho médio e IPD satisfatório para o polímero utilizado na formação das nano partículas.

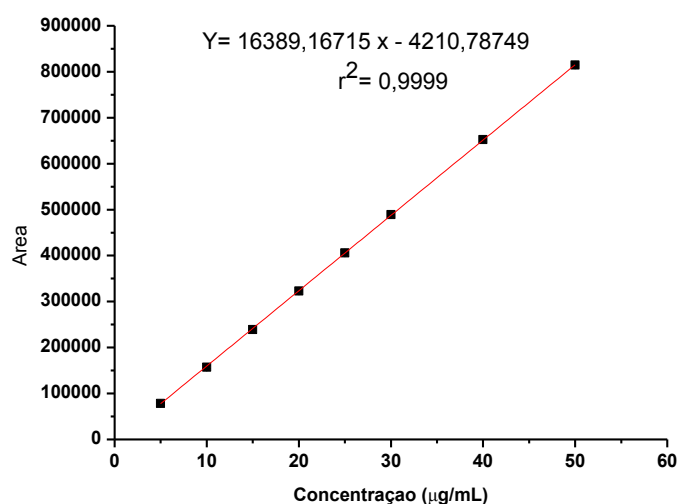
Figura 8. Distribuição de tamanhos das nanopartículas de zeína/caseína carregadas com bromidrato de galantamina.



5.3.2 Método analítico para a quantificação de bromidrato de galantamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a realização dos testes de linearidade do método utilizado para a quantificação do bromidrato de galantamina, foi necessária a construção de uma curva de calibração de 8 pontos entre as concentrações de 5 a 50 µg/mL para o dado composto que apresentou um perfil linear no intervalo testado. O valor de r^2 foi de 0,99994 e a equação da reta foi obtida por meio da regressão linear das curvas analíticas, analisadas em triplicata (Figura 9).

Figura 9. Curva analítica do bromidrato de galantamina solubilizada em metanol.



A determinação do limite de detecção e quantificação foi obtida a partir das equações, previamente citadas no item 4.3.3.5, onde foi estabelecido o LD de 0,163 µg/mL e LQ de 0,495 µg/mL.

5.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas

As nanopartículas de PCL carregadas de bromidrato de galantamina apresentaram eficiência de encapsulação de 87,49 % do composto ativo, como pode ser observado na Tabela 4, diferentemente das nanopartículas de zeína/caseína, que apresentaram eficiência de encapsulação de 10,2 %, considerado uma encapsulação ineficiente, visto que a quantidade de fármaco

aprisionado na estrutura não apresenta potencial terapêutico, sendo descontinuado o uso desse biopolímero para a aplicação em testes posteriores.

As diferentes quantidades de composto ativo que foram encapsulados, entre os dois tipos de polímeros, pode ser explicado pela afinidade que cada material polimérico tem pelo bromidrato de galantamina. Sendo a PCL capaz de aprisionar em maior quantidade devido a presença de porosidades na matriz das nanopartículas, podendo explicar o rendimento na encapsulação (CHANG; WANG; PERRIE, 2010). Já a zeína apresentou dificuldades de encapsulação do composto devido as suas propriedades hidrofóbicas, sendo assim um polímero ideal para o carregamento de drogas hidrofóbicas (LUO; WANG, 2014).

Tabela 4. Eficiência de encapsulação das nanopartículas de PCL e zeína/caseína.

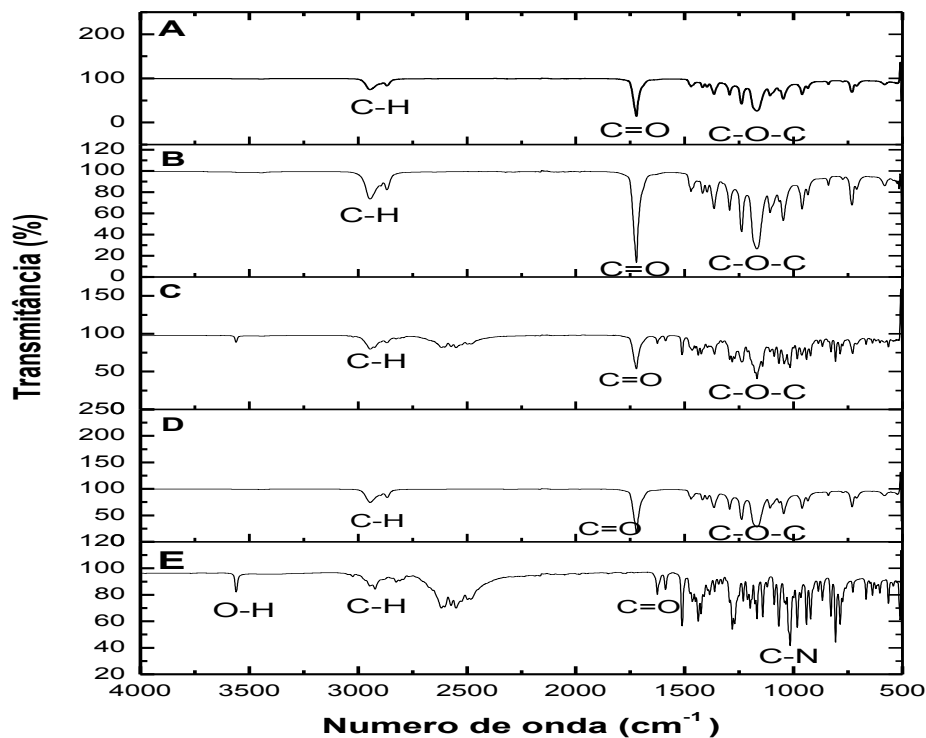
	EE%
Nanopartículas de PCL	87,49 ± 2,43 % ^a
Nanopartículas de zeína/caseína	10,2 ± 1,93 % ^b

Mesmas letras (^{a, b}) significam que houve igualdade estatística (Student's test e α 0,05).

5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros foram agrupados na Figura 10, onde o espectro da bromidrato de galantamina apresenta uma banda na faixa 3500 cm^{-1} correspondente a vibrações de deformação axial de O-H livre. As bandas presentes entre 3000 e 2750 cm^{-1} representam a deformação de hidrocarboneto alifático, em 1625 cm^{-1} observa-se uma deformação axial do grupo funcional éster, seguido de uma banda intensa próxima a 1000 cm^{-1} representando a deformação axial C-N (TRAYKOVA; TRAYKOV; HANDJIMITOVA, 2003).

Figura 10. Espectros de infravermelho das (A) nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina, (B) nanopartículas de PCL vazias, (C) mistura física de PCL com bromidrato de galantamina, (D) PCL e (E) bromidrato de galantamina.



Interpretando o espectro da PCL, podemos observar bandas entre 3000 e 2750 cm^{-1} correspondentes a grupamentos de hidrocarbonetos presentes na estrutura molecular do polímero, sendo a banda na região de 2950 cm^{-1} equivalente a vibrações assimétricas de C-H e vibrações simétricas de C-H em 2865 cm^{-1} . A banda intensa, próxima a 1700 cm^{-1} , é associada a vibrações de ligação dupla do grupo carbonila e vibrações simétricas e assimétricas de C-O-C nas bandas 1170 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , respectivamente (ELZEIN; NASSER-EDDINE; DELAITE, 2004).

Analisando o espectro da mistura física observou-se a presença das bandas dos grupos funcionais correspondentes a estruturas do polímero e do composto ativo.

Embasado na análise espectroscópica na região do infravermelho podemos observar que os espectro das nanopartículas vazias apresentou-se semelhante ao da PCL e a ausência das bandas correspondentes as deformações axiais de OH livre do bromidrato de galantamina, no espectro referente as nanopartículas carregadas na figura 10. Isto pode indicar que os

picos do bromidrato de galantamina foram sobrepostos pelas bandas da PCL por apresentarem pouca intensidade ou a galantamina não estava presente na amostra das nanopartículas carregadas. Com a ausência de novas bandas características de grupos funcionais que não estão presentes na estrutura molecular dos compostos da formulação, podemos afirmar que o método para a obtenção das nanopartículas não alterou estruturalmente os componentes da formulação, entretanto o processo de liofilização das amostras pode ter prejudicado a eficiência de encapsulação da formulação utilizada.

5.3.5 Potencial zeta

O potencial zeta, medida eletrostática de suspensões de nanopartículas é usada como indicador de estabilidade, seguindo o princípio de que quanto maior a carga na superfície das partículas maior será a repulsão entre elas. A regra geral diz que valores de potencial zeta acima de $|30|$ mV indicam boa estabilidade, até $|20|$ mV a estabilidade torna-se limitada a um período menor de tempo e valores próximos a $|5|$ mV apresentam agregação rápida (HONARY; ZAHIR, 2013).

Os valores de potencial zeta das nanopartículas carregadas apresentaram indicativo que o composto ativo encapsulado pode melhorar a estabilidade das nanopartículas, quando comparados aos valores das partículas vazias (Tabela 4). O valor negativo do potencial eletrostático observado é indicativo da presença de grupos carboxílicos presentes na estrutura da PCL, que foram observadas anteriormente no espectro de infravermelho referente ao polímero (LEROUEIL-LE VERGER; FLUCKIGER; KIM, 1998).

Tabela 5. Potencial zeta das nanopartículas de PCL carregadas e vazias.

Formulação	Potencial Zeta (mV)
Nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina	$-23,25^a \pm 1,56$
Nanopartículas de PCL vazias	$-18,36^b \pm 2,91$

Letras diferentes significam desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e $\alpha < 0,05$).

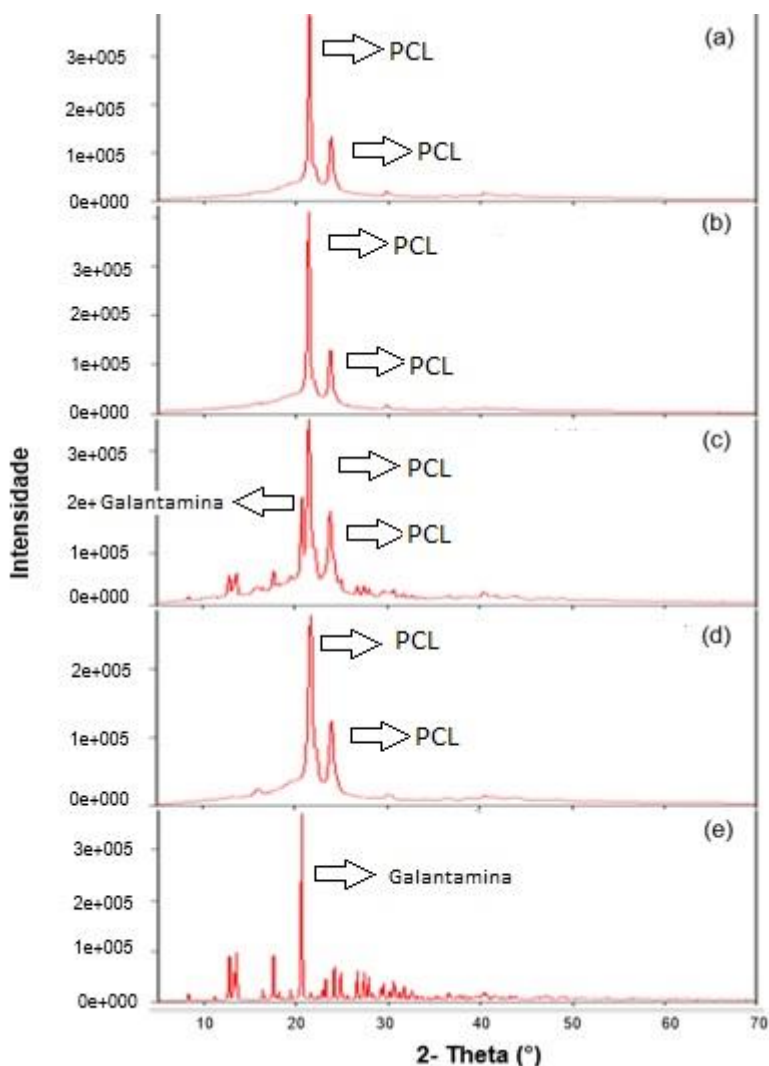
A diferença entre as cargas entre as nanopartículas carregadas pode ser explicado pela presença de grupos de hidroxila presentes no bromidrato de galantamina (PODDAR; SAWANT, 2017), conferindo uma elevação da carga negativa na presença do composto ativo, quando comparadas as nanopartículas vazias.

5.3.6 Difração de Raio-X

O estado cristalino dos compostos é uma parte essencial da pesquisa no campo farmacêutico, pois tem grande influência em características essenciais em compostos sólidos utilizados no desenvolvimento de novos fármacos. Dentre as propriedades que sofrem alteração conforme o estado de cristalinidade ou amorfização, podemos citar a solubilidade, estabilidade, taxa de dissolução e características de compressão (YU, 2001).

Foram obtidos os difratogramas para a PCL, bromidrato de galantamina, mistura física e nanopartículas, carregadas e vazias, apresentados na Figura 11.

Figura 11. Difratomogramas sobrepostos das (a) nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina, (b) nanopartículas de PCL vazias, (c) mistura física de PCL com bromidrato de galantamina, (d) PCL e (e) bromidrato de galantamina.



Foi observado no difratograma do bromidrato de galantamina um perfil cristalino com pico bem definido em 2-theta a 20,67° que correspondente ao pico de cristalinidade deste composto (PODDAR; SAWANT, 2017). O difratograma da PCL apresentado exibiu um perfil semi-cristalino, com picos definidos em 21,29° e 23,6° próprios da estrutura do polímero (YEO; JUNG; KIM, 2012). No difratograma exibido pela mistura física pode ser observado a presença dos picos característicos de ambos os componentes da mistura, diferentemente dos picos nas nanopartículas carregadas, que apresentaram ausência do pico característico do composto ativo, apresentando um perfil similar ao mostrado nas nanopartículas vazias.

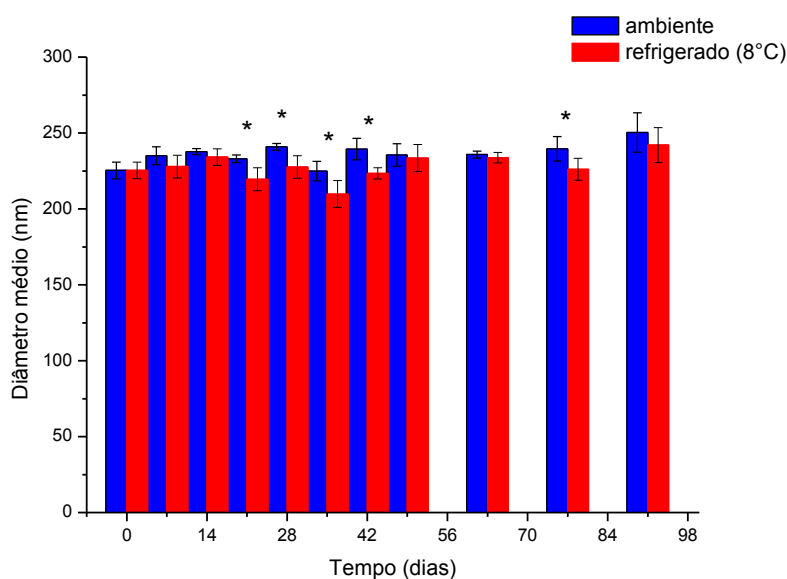
5.3.7 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo bromidrato de galantamina

O perfil de estabilidade das nanopartículas é um importante fator a ser considerado, pois os produtos obtidos são suspensões coloidais aquosas (HWANG; LEE; LEE, 2008), que podem sofrer alterações físico-químicas durante o período de armazenamento, devido ao contato com o meio aquoso, alteração de pH e variações na temperatura (REIS; NEUFELD, 2006).

Durante o período de avaliação, foi levado em conta o diâmetro médio, IPD e o potencial zeta, para a monitoração da estabilidade das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina nas condições citadas no item **4.3.2.7**.

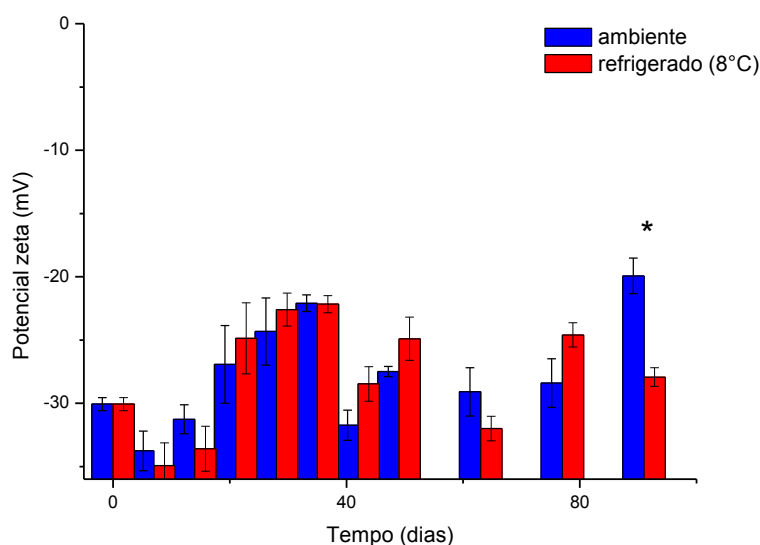
Na Figura 12, nota-se que tanto as nanopartículas em suspensão armazenadas em geladeira quanto em temperatura ambiente mantiveram-se sem diferenças estatísticas para os diâmetros médios, em relação ao tempo 0, até o dia 21. Do dia 21 ao dia 42 houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as diferentes condições de armazenamento, bem como no dia 77. Havendo diferença significativa entre as condições de armazenamento na qual as nanopartículas foram submetidas, mantendo o diâmetro médio entre 209,8 e 250,3 nm.

Figura 12. Diâmetro médio das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina \pm desvio padrão em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, n=3. Os tempos destacados com * apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).



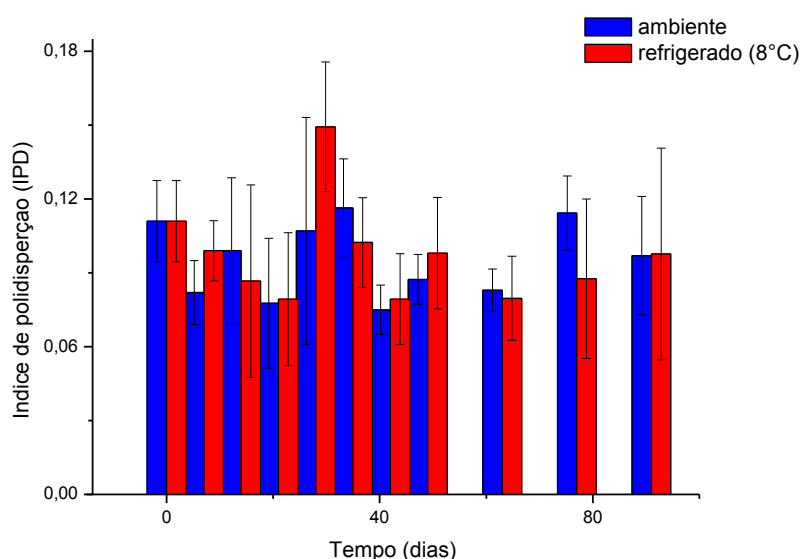
Na Figura 13, observa-se que as nanopartículas em suspensão apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$), para o potencial zeta, entre as diferentes condições de armazenamento, no período de 91 dias em relação ao tempo 0. Houve diferença significativa entre as condições de armazenamento, mantendo o potencial zeta na faixa de -34,9 e -19,9 mV.

Figura 13. Potencial zeta das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina \pm desvio padrão em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, n=3. Os tempos destacados com * apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).



Na Figura 14, podemos observar que não houve diferença estatística significativa do IPD sob a condição de armazenamento refrigerado e em temperatura ambiente, durante todo o período do teste de estabilidade, quando comparada ao tempo 0. As amostras não apresentaram IPD superior a 0,15, sendo esse um indicativo de estabilidade das nanopartículas durante o período de 91 dias, sem indícios de agregação e refletindo uma boa distribuição de tamanho.

Figura 14. Índice de polidispersão das nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina \pm desvio padrão em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, n=3. Os tempos destacados com * apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).



Feitas as avaliações da estabilidade, considerando as Figuras 12, 13 e 14, observou-se que as nanopartículas mantiveram-se estáveis para as características avaliadas, tanto armazenadas sob refrigeração como em temperatura ambiente.

5.3.8 Liberação do bromidrato de galantamina das nanopartículas carregadas em fluido gástrico (FGS) e intestinal simulado (FIS)

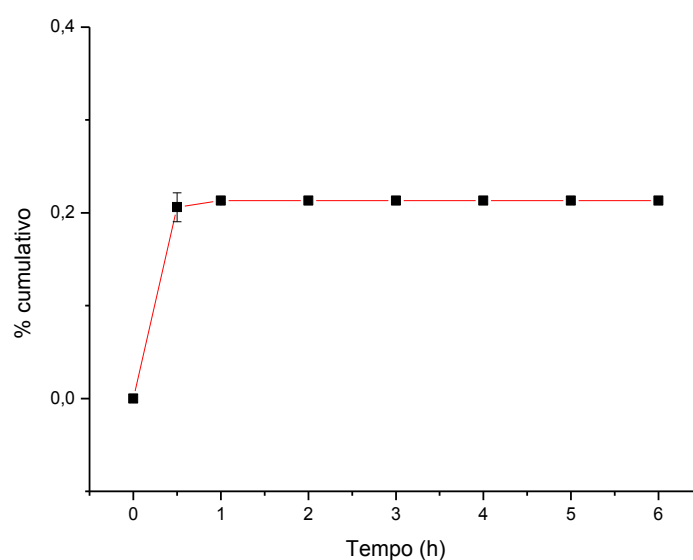
A avaliação da liberação do composto, no desenvolvimento de nanopartículas, em fluidos gastrointestinais simulados compreende os mecanismos de liberação, que são dependentes de fatores, como: dessorção da

superfície polimérica ligada ao composto, difusão através da matriz, erosão da matriz ou fatores combinados. Sendo a biodegradação e a difusão as principais causadoras da liberação (SOPPIMATH, 2001).

Por ser o bromidrato de galantamina um composto de alta solubilidade em água, e os meios fluidos de simulação são formados basicamente por água, não foi necessária a avaliação da solubilidade. Visto que a condição *sink* se mantém, pois tanto FGS e o FIS solubilizam grandes quantidades do composto antes de apresentarem saturação.

A PCL possui uma taxa de biodegradação lenta em meio aquoso, isso devido a sua hidrofobicidade e cristalinidade (CHAWLA; AMIJI, 2002), apresentando estabilidade no FGS (pH 1,2) e no FIS (pH 6,8) e ausência de efeito *burst* (liberação inicial), representando a integridade do composto encapsulado ao longo do sistema gastrointestinal, como pode ser observado na Figura 15. Onde, durante o período de 1 hora (FGS pH 1,2), houve a liberação de 0,21% do composto encapsulado que se manteve até o final da avaliação sem liberar mais nenhuma quantidade significativa de bromidrato de galantamina.

Figura 15. Perfil de Liberação do bromidrato de galantamina a partir das nanopartículas de PCL no FGS (pH=1,2) e no FIS (pH=6,8). O ensaio foi conduzido durante 2h no FGS e por mais 4 h no FIS, a 37 °C e 150 rpm. Os resultados são expressados em média \pm DP (n=3).

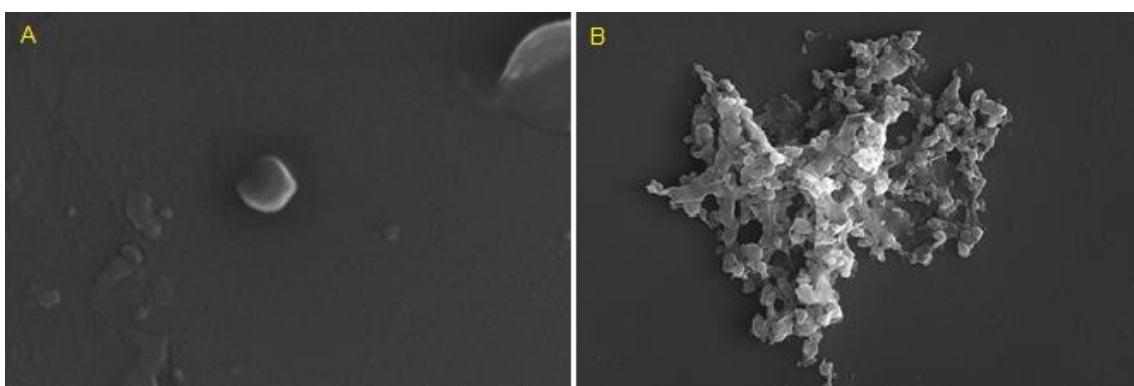


5.3.9 Análise de MEV-FIB

Por meio de imagens de alta resolução geradas pelo MEV-FIB, foram obtidas informações a respeito da morfologia superficial das nanopartículas de PCL carregadas com o bromidrato de galantamina.

A partir das fotomicrografias observou-se que as nanopartículas apresentaram morfologia esférica.

Figura 16. Fotomicrografias das nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina obtidas por meio de MEV-FIB: A) Aumento de 150000 vezes B) Aumento de 12000 vezes.



Comparando com trabalhos anteriores podemos observar que os valores de diâmetro médio obtidos com as nanopartículas de PCL, tanto carregadas quanto vazias, foram semelhantes aos encontrados por CHAWLA; AMIJI, (2002), que também utilizou-se da técnica de nanoprecipitação para a formação de nanopartículas com tamanho entre 250 e 300 nm. Entretanto as nanopartículas de zeína/caseína apresentaram tamanhos dentro do esperado quando brancas (ZHONG; JIN, 2009), diferentemente das nanopartículas de zeína/caseína carregadas com o composto ativo, que teve diâmetro médio maior que 200 nm.

A técnica de nanoprecipitação, utilizada para a formação de nanopartículas de PCL, além de ser ideal para incorporação de compostos lipofílicos (MOLPECERES; GUZMAN; ABERTURAS, 1995) mostrou-se eficiente para a encapsulação do bromidrato de galantamina, composto hidrofílico. As nanopartículas de zeína/caseína apresentaram baixa eficiência de encapsulação para o bromidrato de galantamina, visto que a técnica de dispersão líquido-

líquido apresentou mais de 50% de encapsulação para outros compostos hidrofílicos (ASWATHY; SIVAKUMAR, 2012).

A liberação do bromidrato de galantamina das nanopartículas de PCL nos fluidos gastrointestinais simulados, apresentou liberação de 0,2% do fármaco na primeira hora e permanecendo praticamente intacto durante o restante do período, diferentemente de compostos lipofílicos, que apresentaram efeito *burst* e liberação total do composto encapsulado em 8 horas (FERRANTI et al., 1999).

Durante o período do teste de estabilidade foi observado que as nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina tiveram comportamento parecido quando armazenadas sob refrigeração e em temperatura ambiente, mantendo melhor suas características físico-químicas. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser atribuídos a velocidade de degradação da PCL, que pode ser explicado por sua característica hidrofóbica (LEMOINE et al., 1996).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- As nanopartículas de PCL contendo bromidrato de galantamina, foram obtidas com êxito pela metodologia de nanoprecipitação, apresentando eficiência de encapsulação de 87,49 %. Já o método de dispersão líquido-líquido, utilizado para obtenção das nanopartículas zeína/caseína, apresentou eficiência de encapsulação de 10,2%, que foi considerada um baixo rendimento;
- As caracterizações físico-químicas das nanopartículas demonstraram diâmetro médio reduzido e baixo IPD, tanto para nanopartículas de PCL e zeína caseína, tanto vazias quanto carregadas, e potencial zeta negativo, com negatividade mais pronunciado nas nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina;
- Os difratogramas obtidos pela técnica de difração de Raio-X não demonstraram que houve uma mudança no estado cristalino do PCL;
- O espectro de infravermelho dos compostos isolados, da mistura física e das nanopartículas analisadas demonstrou que não houve alteração na estrutura química dos compostos, fato esse que é evidenciado pela ausência de novos grupos funcionais;
- O estudo de estabilidade realizado no período de 91 dias demonstrou que as nanopartículas de PCL mantiveram suas características físico-químicas armazenadas em temperatura ambiente e sob refrigeração;
- As nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina apresentaram boa estabilidade tanto no FGS quanto no FIS, liberando apenas 0,21 % do composto encapsulado na primeira hora do teste, onde as nanopartículas foram submetidas ao pH 1,2 do fluido gástrico simulado.
- As nanopartículas de PCL carregadas com bromidrato de galantamina apresentaram morfologia esférica.

Os resultados obtidos até agora demonstraram potencial no carreamento do bromidrato de galantamina por meio de um sistema nanoestruturado, onde utilizou-se a PCL como polímero, para administração oral, podendo representar uma alternativa na melhora da farmacodinâmica do composto empregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLIN GRABNAR, P.; KRISTL, J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 4, p. 323–335, 2011.

ALDRIDGE, D. Alzheimer ' s Disease : rhythm , timing and music as therapy. **Biomed & pharmacoter**, v. 48, p. 275–281, 1994.

ASWATHY, R. G.; SIVAKUMAR, B. Biocompatible fluorescent zein nanoparticles for simultaneous bioimaging and drug delivery application. **NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY**, v. 3, p. 1–7, 2012.

AUER, S.; REISBERG, B. The GDS / FAST Staging System. **International Psychogeriatrics**, v. 9, n. 1, p. 167–171, 1997.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles : the future of nanomedicine. **Wiley Periodicals**, v. 8, n. April, p. 271–299, 2016.

BARRERA-OCAMPO, A.; LOPERA, F. Amyloid-beta immunotherapy: the hope for Alzheimer disease? Inmunoterapia beta-amiloide: ¿la esperanza para la enfermedad de Alzheimer? **Colomb Med (Cali)**, v. 47, n. 47, p. 203–12, 2016.

BERKOV, S.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. GC-MS of amaryllidaceous galanthamine-type alkaloids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 8, p. 1065–1073, 2012.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.

BIRKS, J.; J, G. E. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia (Review). **The Cochrane Library**, n. 1, p. 1–59, 2009.

BLENNOW, K.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K. Biomarkers for Alzheimer

disease - current status and prospects for the future. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 1, p. 71, 2018.

BLONIECKI, V.; AARSLAND, D.; BLENNOW, K. Effects of Risperidone and Galantamine Treatment on Alzheimer's Disease Biomarker Levels in Cerebrospinal Fluid. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 57, n. 2, p. 387–393, 2017.

BOND, J.; PRINCE, M.; WINBLAD, B. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, p. 1–11, 2013.

BONDA, D. J.; WANG, X.; PERRY, G. Neuropharmacology Oxidative stress in Alzheimer disease : A possibility for prevention. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 4–5, p. 290–294, 2010.

BONNER, L. T.; PESKIND, E. R. Pharmacologic treatments of dementia. **Medical Clinics of North America**, v. 86, n. 3, p. 657–674, 2002.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, n. 1, p. 1–9, 1995.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BROOKING, J.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. **Section Title: Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 267–279, 2001.

BROOKMEYER, R.; CORRADA, M. M.; CURRIERO, F. C. Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 11, p. 1764–1767, 2002.

BROSSELIN, P.; DUPORT, N.; BLOCH, J. Mortalité liée à la maladie d'Alzheimer et aux maladies apparentées, France 2006. **Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique**, v. 58, n. 4, p. 269–276, 2010.

CARLSON, J. D.; CLEARY, D. R.; CETAS, J. S. Deep Brain Stimulation Does Not Silence Neurons in Subthalamic Nucleus in Parkinson's Patients. **Journal of Neurophysiology**, v. 103, n. 2, p. 962–967, 2010.

CASA, D. M.; CRISTINA, T.; MORAES, M. Poly (L-lactide) Nanoparticles Reduce Amphotericin B Cytotoxicity and Maintain Its In Vitro Antifungal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, p. 848–854, 2015.

CHANG, H. I.; WANG, Y.; PERRIE, Y. Microporous polycaprolactone matrices for drug delivery and tissue engineering: The release behaviour of bioactives having extremes of aqueous solubility. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207–212, 2010.

CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor- targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 127–138, 2002.

CHO, E. J.; HOLBACK, H.; LIU, K. C. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093–2110, 2013.

CORRADINI, E.; CURTI, P. S.; MENIQUETI, A. B. Recent Advances in Food-Packing , Pharmaceutical and Biomedical Applications of Zein and Zein-Based Materials. p. 22438–22470, 2014.

COTELLI, M.; CALABRIA, M.; MANENTI, R. Improved language performance in Alzheimer disease following brain stimulation. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 794–797, 2011.

COTELLI, M.; MANENTI, R.; CAPPÀ, S. F. Effect of transcranial magnetic stimulation on action naming in patients with Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 63, n. 11, p. 1602–1604, 2006.

CRUCHO, C. I. C.; TERESA, M. Polymeric nanoparticles : A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science & Engineering C**, v. 80, p. 771–784, 2017.

DADKHAH TEHRANI, A.; PARSAMANESH, M. Preparation, characterization and drug delivery study of a novel nanobiopolymeric multidrug delivery system. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 516–524, 2017.

DALY, M. P. Diagnosis and Management of Alzheimer Disease. **JABFP**, v. 12, n. 5, p. 375–385, 1998.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 2012.

DE MEYER, GEERT; SHAPIRO, F. Diagnosis-Independent Alzheimer Disease Biomarker Signature in Cognitively Normal Elderly People. **Arch neurol**, v. 67, n. 8, p. 949–956, 2015.

DEFRATES, K. G.; MOORE, R.; BORGESI, J. Protein-Based Fiber Materials in Medicine : A Review. **nanomaterials**, v. 8, n. 457, p. 1–26, 2018.

DEMIRTAS-TATLIDEDE, A.; VAHABZADEH-HAGH, A. M.; PASCUAL-LEONE, A. Can noninvasive brain stimulation enhance cognition in neuropsychiatric disorders? **Neuropharmacology**, v. 64, p. 566–578, 2013.

DES RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of Nanotechnology in Pharmaceutical Product Development. **Psychiatria Danubina**, v. 28, n. 10, p. 92–94, 2006.

DI STEFANO, A.; IANNITELLI, A.; LASERRA, S. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 5, p. 581–603, 2011.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

DOODY, R. S.; STEVENS, J. C.; BECK, C. Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). **Neurology**, v. 56, p. 1154–1166, 2001.

DYSKEN, M. W.; SANO, M.; ASTHANA, S. Effect of Vitamin E and Memantine on Functional Decline in Alzheimer Disease The TEAM-AD VA Cooperative Randomized Trial. **JAMA**, v. 311, n. 1, p. 33–44, 2014.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 675–

691, 2017.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2545–2561, 2012.

ELZEIN, T.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 381–387, 2004.

EMA, M.; HARA, H.; MATSUMOTO, M. Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 89–99, 2008.

ESEN, A. Separation of Alcohol-Soluble Proteins (Zeins) from Maize into Three Fractions by Differential Solubility. p. 623–627, 1986.

FERRANTI, V. et al. Primidone-loaded poly- o -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. v. 193, p. 107–111, 1999.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **{SMT} Soldering Handbook**, v. 366, n. 9503, p. 2112–2117, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUE, J. P. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1–R4, 1989.

FINKEL, S.; COHEN, G.; MILLER, S. Behavioral and psychological signs and symptoms of dementia: a consensus statement on current knowledge and implications for research and treatment. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 12, p. 1060–1061, 1997.

FISCHER, W.; WICTORIN, K.; BJÖRKLUND, A. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. **Nature**, v. 329, p. 855–857, 1987.

FONSECA-SANTOS, B. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer ' s disease. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4981–5003, 2015.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**. 3rd. ed. Corle, Ireland: SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC, 2003.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M. The cholinergic hypothesis of Alzheimer ' s disease : a review of progress. **Neurol neurosurg psychiatry**, v. 66, p. 137–147, 1999.

FRANCO, R.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Successful therapies for Alzheimer's disease: Why so many in animal models and none in humans? **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 JUN, n. June, p. 1–14, 2014.

FREUND-LEVI, Y.; ERIKSDOTTER-JO, M. OMEGA-3 Fatty Acid Treatment in 174 Patients With Mild to Moderate Alzheimer Disease: OmegAD Study. **Arch neurol**, v. 63, p. 1402–1408, 2006.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.

GIORDANO, T.; SAMBAMURTI, K.; ROGERS, J. T. New Therapeutic Strategies and Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases. **Annals new york academy of sciences**, v. 1035, p. 290–315, 2004.

GRAFF, M. J. L.; VERNOOIJ-DASSEN, M. J.; THIJSEN, M. Community based occupational therapy for patients with dementia and their care givers: randomised controlled trial. **BMJ**, n. November, p. 1–6, 2006.

HALLBERG, Ö. Is increased mortality from Alzheimer's disease in Sweden a reflection of better diagnostics? **Current Alzheimer Research**, v. 6, n. 6, p. 471–475, 2009.

HANFORD, N.; FIGUEIRO, M. Light Therapy and Alzheimer's Disease and Related Dementia: Past, Present, and Future. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 33, n. 4, p. 913–922, 2013.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319–327, 2002.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer ' s Disease :

Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science's compass**, v. 297, p. 353–356, 2002.

HEBERT, L. E.; SCHERR, P. A.; BIENIAS, J. L. Alzheimer Disease in the US Population. **Arch neurol**, v. 60, p. 1119–1122, 2003.

HEBERT, L. E.; WEUVE, J.; SCHERR, P. A. using the 2010 census Alzheimer disease in the United States (2010 – 2050) estimated using the 2010 census. **Neurology**, v. 80, p. 1778–1783, 2013.

HING, J. P.; PIOTROVSKY, V.; KIMKO, H. Pharmacokinetic simulation for switching from galantamine immediate-release to extended-release formulation. **Current Medical Research and Opinion**, v. 21, n. 4, p. 483–487, 2005.

HOLLAR, C. M.; LAW, A. J. R.; DALGLEISH, D. G. Separation of Major Casein Fractions Using Cation-Exchange Fast Protein Liquid Chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 8, p. 2403–2409, 1991.

HOLLINGWORTH, P.; HAROLD, D.; SIMS, R. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 429–436, 2011.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

HWANG, Y.; LEE, J.; LEE, J. Production and dispersion stability of nanoparticles in nanofluids. v. 186, p. 145–153, 2008.

IQBAL, K.; ALONSO, A. C.; CHEN, S. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1739, p. 198–210, 2005.

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.

KAUR, G.; MEHTA, S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 134–160, 2017.

KODAMA, S.; HAMASHIMA, Y.; NISHIDE, K. Total synthesis of (-)-galanthamine by remote asymmetric induction. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, n. 20, p. 2659–2661, 2004.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857–868, 1999.

KONG, J.; YU, Y.; PEI, X. P. Polycaprolactone nanocomposite reinforced by bioresource starch-based nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1304–1311, 2017.

KUKULL, W. A.; HIGDON, R.; BOWEN, J. D. Dementia and Alzheimer disease incidence: A prospective cohort study. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 11, p. 1737–1746, 2002.

KURZ, H. F. A. Clinical features of Alzheimer ' s disease. **Eur Arch Psychiatry Clinic Neurosci**, v. 249, p. 288–290, 1999.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: A review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.

LAUTENSCHLAGER, N. T.; CUPPLES, L. A.; RAO, V. S. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study : What is in store for the oldest old ? **Neurology**, v. 46, p. 641–650, 1996.

LAXTON, A. W.; LOZANO, A. M. Deep brain stimulation for the treatment of alzheimer disease and dementias. **World Neurosurgery**, v. 80, n. 3–4, p. S28.e1-S28.e8, 2013.

LAXTON, A. W.; STONE, S.; LOZANO, A. M. The neurosurgical treatment of alzheimer's disease: A review. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 92, n. 5, p. 269–281, 2014.

LEBOUILLE, J. G. J. L.; STEPANYAN, R.; SLOT, J. J. M. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, p. 225–235, 2013.

LEMOINE, D. et al. Stability study of nanoparticles of and poly (D , L-lactide-co-glycolide). v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1996.

LEROUEIL-LE VERGER, M.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.-I. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, p. 137–143, 1998.

LILIENFELD, S. Galantamine - a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. **Cns Drug Reviews**, v. 8, n. 2, p. 159–176, 2002.

LIMA, A. C.; ALVAREZ-LORENZO, C.; MANO, J. F. Design Advances in Particulate Systems for Biomedical Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 14, p. 1687–1723, 2016.

LORENZO, A.; YANKNER, B. A. β -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red . **Neurobiology**, v. 91, p. 12243–12247, 1994.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery : A Review. v. 40696, n. 3, p. 1–12, 2014.

LUO, Y.; WANG, T. T. Y.; TENG, Z. in zein / carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 224–230, 2013.

MARTÍNEZ RIVAS, C. J.; TARHINI, M.; BADRI, W. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66–81, 2017.

MARTOS, A.; KOCH, W.; JISKOOT, W. Trends on Analytical Characterization of Polysorbates and Their Degradation Products in Biopharmaceutical Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 7, p. 1722–1735, 2017.

MARX, J. Mutation identified as a possible cause of Alzheimer's disease. **Science**, v. 251, n. 4996, p. 876–877, 1991.

MASTERMAN, D.; FAIRBANKS, L.; CUMMINGS, J. L. Neuropsychiatric Symptoms and Quality of Life in Alzheimer Disease. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 13, n. 6, p. 469–474, 2005.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M. views & reviews Clinical

diagnosis of Alzheimer ' s disease : **Neurology**, v. 34, p. 939–944, 1984.

MESTERTON, J.; WIMO, A.; BY, Å. Cross Sectional Observational Study on the Societal Costs of Alzheimer ' s Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 7, n. 4, p. 358–367, 2010.

MOHAMED, R. M.; YUSOH, K. A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). **Advanced Materials Research**, v. 1134, p. 249–255, 2015.

MOLPECERES, J.; GUZMAN, M.; ABERTURAS, M. R. Application of Central Composite Designs to the Preparation of Polycaprolactone Nanoparticles by Solvent Displacement. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 0–7, 1995.

MOUT, R.; MOYANO, D. F.; RANA, S. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2539–2544, 2012.

MUCKE, H. A. The case of galantamine: repurposing and late blooming of a cholinergic drug. **Future Science OA**, v. 1, n. 4, p. fso.15.73, 2015.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343–356, 2004.

NAKANO, Y.; MATSUZONO, K.; YAMASHITA, T. Long-Term Efficacy of Galantamine in Alzheimer's Disease: The Okayama Galantamine Study (OGS). **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 47, n. 3, p. 609–617, 2015.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Progress in Neurobiology The neurobiology of brain and cognitive reserve : Mental and physical activity as modulators of brain disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 89, p. 369–382, 2009.

NORTON, S.; MATTHEWS, F. E.; BARNES, D. E. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 8, p. 788–794, 2014.

OBBER, C. A.; GUPTA, R. B. Nanoparticle Technology for Drug Delivery. **Ide@s**

CONSYTEG, v. 6, n. 72, p. 714–726, 2006.

OHTA, Y.; DARWISH, M.; HISHIKAWA, N. Therapeutic effects of drug switching between acetylcholinesterase inhibitors in patients with Alzheimer's disease. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 17, n. 11, p. 1843–1848, 2017.

OMLOR, J. A.; NGUYEN, J.; BALS, R. Nanotechnology in respiratory medicine. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2015.

PAES, P. DE F. A.; ESPIRITO SANTO, F. H. DO. Limites e possibilidade no cotidiano do familiar que cuida do idoso com Alzheimer no ambiente domiciliar. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 9, n. 2, p. 192–198, 2005.

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Current Opinion in Colloid & Interface Science Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 2014.

PATEL, T.; ZHOU, J.; PIEPMEIER, J. M. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Central Nervous System. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 701–705, 2012.

PELTONEN, L.; AITTA, J.; HYVÖNEN, S. Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly (L) lactide Nanoparticles. v. 5, n. 1, p. 1–6, 2004.

PENALVA, R.; ESPARZA, I.; IRACHE, J. M. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food hydrocolloids**, 2015.

PETERSEN, R. C. The current status of mild cognitive impairment — what do we tell our patients ? **Nature Clinical Practice**, v. 3, n. 2, p. 60–61, 2007.

PIKE, C. J.; BURDICK, D.; GLABE, G. Neurodegeneration Induced by β & Amyloid of Peptide Assembly State Peptides in vi & o: The Role. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. April, p. 1676–1687, 1993.

PINTO, M. F.; BARBOSA, D. A.; LUCENA, C. E. DE. Quality of life among caregivers of elders with Alzheimer's disease. **Acta Paul Enferm**, v. 22, n. 5, p. 652–657, 2009.

PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of Formulation Factors on the

Preparation of Zein Nanoparticles. v. 13, n. 3, 2012.

PODDAR, A.; SAWANT, K. K. Optimization of Galantamine Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles by Quality by Design and Its Preliminary Characterizations. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 8, n. 5, 2017.

PRVULOVIC, D.; HAMPEL, H.; PANTEL, J. Galantamine for Alzheimer ' s disease. **Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicologic**, v. 6, n. 3, p. 345–354, 2010.

RABINS, P. V; BARRY, P. P.; BUCKHOLTZ, N. S. Diagnosis and Treatment of Alzheimer Disease and Related Disorders. **JAMA**, v. 278, p. 13631371, 1997.

RAJARAM, R. D.; HERRMANN, N.; LANCTO, K. L. Therapy for Alzheimer ' s disease : how effective are current treatments? **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 2, n. 3, p. 163–180, 2009.

REDDY, P. H. Amyloid beta , mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer ' s disease. **Experimental Neurology**, v. 218, n. 2, p. 286–292, 2009.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J. Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. v. 2, p. 8–21, 2006.

RITCHIE, K.; LOVESTONE, S. The dementias. **The Lancet**, v. 360, p. 1759–1766, 2002.

RØNSTED, N.; ZUBOV, D.; BRUUN-LUND, S. Snowdrops falling slowly into place: An improved phylogeny for Galanthus (Amaryllidaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 1, p. 205–217, 2013.

SABIR, M. I.; XU, X.; LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 21, p. 5713–5724, 2009.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 24, p. 1112–1120, 2003.

SALATA, O V; HOET, P. H. M. B.-H. I. Journal of Nanobiotechnology. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 6, n. 3, p. 1–6, 2004.

SARASAM, A.; MADIHALLY, S. V. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5500–5508, 2005.

SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, H. Review Treatment of Alzheimer 's disease : current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**, v. 2, p. 539–547, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; DE LUCCA FREITAS, L. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; E SILVA, G. A. Chronic non-communicable diseases in Brazil: Burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, 2011.

SCHÖLER, N.; OLBRICH, C.; TABATT, K. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. **International journal of pharmaceutics**, v. 221, n. 1–2, p. 57–67, 2001.

SEEBALLUCK, F.; LAWLESS, E.; ASHFORD, M. B. Stimulation of triglyceride-rich lipoprotein secretion by polysorbate 80: In vitro and in vivo correlation using caco-2 cells and a cannulated rat intestinal lymphatic model. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 12, p. 2320–2326, 2004.

SHAPIRA, A.; ASSARAF, Y. G.; EPSTEIN, D. Beta-casein Nanoparticles as an Oral Delivery System for Chemotherapeutic Drugs : Impact of Drug Structure and Properties on Co-assembly. p. 2175–2186, 2010.

SHIEH, W.-C.; CARLSON, J. A. Asymmetric Transformation. **J. Org. Chem.**, v. 59, n. 6, p. 5463–5465, 1994.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein : the industrial protein from corn. v. 13, p. 171–192, 2001.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215–223, 2009.

SMALL, G. W.; GREENFIELD, S. Current and Future Treatments for Alzheimer's Disease. **Hormone and Metabolic Research**, 2018.

SOPPIMATH, K. S. , Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, J. **Control. Release**, v. 70, p. 1–2, 2001.

SRAMEK, J. J.; FRACKIEWICZ, E. J.; CUTLER, N. R. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 10, p. 2393–2402, 2000.

STONE, V.; JOHNSTON, H.; CLIFT, M. J. D. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: Cellular and molecular interactions. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 6, n. 4, p. 331–340, 2007.

SURESH, P. S.; VISHNUVARDH, R.; RAMESH, M. Highly sensitive LC-MS-MS method for the determination of tacrine in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies in rats. **Journal of Chromatographic Science**, v. 28, n. 3, p. 1633–1640, 2014.

SZEKELY, C. A.; BREITNER, J. C. S.; ZANDI, P. P. Prevention of Alzheimer ' s disease. **International Review of Psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 693–706, 2007.

TALER, V.; PHILLIPS, N. A.; TALER, V. 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, 2014.

TANZI, R. E.; BERTRAM, L. Twenty Years of the Alzheimer ' s Disease Amyloid Hypothesis : A Genetic Perspective. **Cell**, v. 120, p. 545–555, 2005.

TERI, L.; GIBBONS, L. E.; MCCURRY, S. M. Exercise Plus Behavioral Management. **JAMA**, v. 290, n. 15, p. 2015–2022, 2015.

THAL, L. J. Prevention of Alzheimer Disease. **Alzheimer Disease Association Disorders**, v. 20, n. 2, p. 97–99, 2006.

THIES, W.; BLEILER, L. 2008 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, p. 208–244, 2011.

TRAYKOVA, M.; TRAYKOV, T.; HANDJIMITOVA, V. Galantamine and galantamine hydrobromide as scavengers of hydroxyl radicals. **Animal Genetics**, v. 8, n. 56, p. 87–90, 2003.

TSIVILIS, D.; VANN, S. D.; DENBY, C. A disproportionate role for the fornix and mammillary bodies in recall versus recognition memory. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 834–842, 2008.

TURNBULL, I. M.; MCGEER, P. L.; BEATTIE, L. Stimulation of the Basal Nucleus of Meynert In Senile Dementia of Alzheimer's Type. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 136, n. 1, p. 23–42, 2007.

Unique visual stimulation may be new treatment for Alzheimer's | MIT News.

Disponível em: <<http://news.mit.edu/2016/visual-stimulation-treatment-alzheimer-1207>>. Acesso em: 26 out. 2018.

USP 37-NF 32 EN ESPAÑOL - VOLUMEN 2. In: [s.l: s.n.]. p. (nota técnica).

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.

VAZ, C. M.; FOSSEN, M.; TUIL, R. F. VAN. Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. 2002.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid e liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283–290, 2012.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.

YEO, M.; JUNG, W. K.; KIM, G. Fabrication, characterisation and biological activity of phlorotannin-conjugated PCL/ β -TCP composite scaffolds for bone tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 3568–3577, 2012.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids preparation, characterization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 27–42, 2001.

ZHONG, Q.; JIN, M. Food Hydrocolloids Zein nanoparticles produced by liquid – liquid dispersion. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380–2387, 2009.

ZILKA, N.; NOVAK, M. The tangled story of Alois Alzheimer. **Bratisl Lek Listy**, v. 107, n. 9–10, p. 343–345, 2006.