

Thaís Barbosa Alberti

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DO AGONISTA CB2 β -
CARIOFILENO:
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA A DOENÇAS DEGENERATIVAS**

Dissertação submetida ao Programa de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Biotecnologia e
Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Maraschin

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Alberti, Thaís

Desenvolvimento de nanopartículas para liberação controlada do agonista CB2 Beta-Cariofileno: estratégia terapêutica a doenças neurodegenerativas / Thaís Alberti ; orientador, Marcelo Maraschin, 2019.

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Nanotecnologia. 3. Nanopartículas. 4. Canabinoides. 5. Liberação controlada. I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

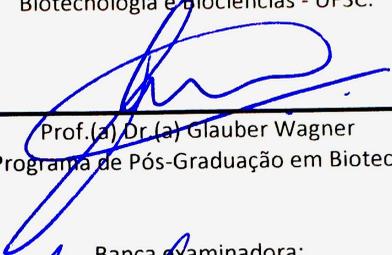
Thaís Barbosa Alberti

“Desenvolvimento de nanopartículas para liberação controlada do agonista CB2 β -Cariofileno: estratégia terapêutica a doenças neurodegenerativas”

Por

Thaís Barbosa Alberti

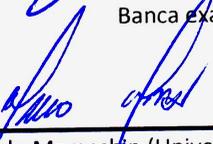
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Glauber Wagner

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

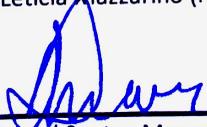
Banca Examinadora:



Dr.(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Letícia Mazzarino (Nanoscopying Soluções em Nanotecnologia)



Dr.(a) Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 29 de março de 2019.

Este trabalho é dedicado à minha mãe
e à minha vó.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin, por me orientar e me permitir idealizar e realizar este projeto de tamanha importância para mim. Aos colegas e professores dos laboratórios do LMBV pelo apoio e ajuda quando necessário. Agradeço ao Prof. Rafael Dutra pelo meu primeiro contato com o tema e todos os ensinamentos. À Aline por despertar meu interesse em outra área e pela amizade todos esses anos. Agradeço à Prof. Leticia Mazzarino e Dra. Beatriz Veleirinho pelos aprendizados em nanotecnologia.

À CAPES pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de Biologia Computacional durante todo o período de mestrado. À Global Affairs Canada pela concessão da bolsa de Graduate Research Trainee na Universidade McGill para período de estágio de 6 meses. Ao Prof. Pedro Rosa-Neto por ter me aceitado no seu laboratório para o período de estágio. Obrigada Prof. Diogo Miron por me ajudar a resolver meu problema de solubilidade no HPLC. *Gracias Arturo por todo el apoyo que me diste. Luc, thank you for helping me so much in trying to figure out extraction protocols. Thank you Nesrine for being a fellow going through the same thing as me and supporting me when needed. To Gassan, I-Huong, Dean, Robert, Karen, Monica, Peter, Marina and Alexey for making me feel welcome in the lab and trying to help with my experiments. To Iza, Lucas and Liesbeth for making my time in Montréal worth it and help keep me sane during that part of my Masters.*

Agradeço à Mariana, Gabriel, Ana Gabriela e Cândice por fazer a Biotec executável em todas nossas quartas-feiras rosas. Bruno, Heloísa e Lucas, meu primeiro ano de mestrado e minha vida não teriam sido os mesmos sem vocês. Amo-os! À Flavia, Mariana, Gabriel, Leonardo, Gabriela, Bárbara, Fabíola, Leonardo e Tomás por compartilhar dos mesmas situações e adicionar alegria a vida de acadêmicos. À minha eterna co-autora Daniela, por todas as vezes que você tirou mil dúvidas minhas e me ajudou em cada passo do caminho. À Maíra, por todo o apoio e me ajudar a persistir no meio acadêmico. Alessandra, mesmo longe continua muito importante na minha vida. Rodrigo, não sei o que seria de mim sem você todos esses anos. Rô, sem você não teria conseguido passar por tudo que aconteceu durante o mestrado, e na vida, obrigada! À minha família, aos meus amigos, muitos morando em outras cidades, mas que mesmo assim se fizeram presentes e especiais na minha vida nesse momento, muito obrigada!

Agradeço à minha vó, que inspirou meu interesse nessa área de aplicação. Agradeço à minha mãe por todo o apoio em todas as minhas decisões. Você é incrível, cada conquista minha é por sua causa. Muito obrigada!

*The only difference between screwing around and
science is writing it down.*
(Alex Jason, 2012)

RESUMO

O presente trabalho representa a primeira etapa do desenvolvimento de um protótipo terapêutico para aplicação em neurodegeneração. O sesquiterpeno β -cariofileno (BCP) foi selecionado por ser um canabinoide estruturalmente singular e se ligar seletivamente ao receptor CB2, que além de ser expresso no SNC, está intrinsecamente ligado ao sistema imunológico e é ausente de psicoatividade. Foi realizada a nanoencapsulação do BCP para permitir liberação controlada do fármaco no SNC e otimização para administração intranasal. A formulação foi otimizada quanto a sua composição, definindo um polímero, surfactante, emulsificante e suas respectivas concentrações para ajustar os parâmetros físico-químicos desejados. A formulação foi analisada quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, morfologia, pH, osmolaridade, estabilidade, cinética de liberação *in vitro* e ligação com proteínas plasmáticas *ex vivo*. A composição final da formulação de nanopartículas de BCP é composta na sua fase orgânica (FO) por Tween 20 (0,25%), BCP (0,1%) e PEG 400 (5%) e na sua fase aquosa (FA) composta por água ultrapura e poloxamer P188 (0,25%). A formulação é adequada à administração intranasal, apresentando pH 6,5 e osmolaridade de 150 mmol/kg. O diâmetro médio das partículas foi de 147,2 nm, PDI 0,052 e potencial zeta de -24,5. O ensaio de estabilidade acelerada evidenciou a estabilidade das nanopartículas até 1 mês, seguida do efeito de *creaming* reversível, porém com reduzida acumulação de partículas e distribuição homogênea destas. A cinética de liberação das nanopartículas de BCP se mostrou de liberação rápida em meio fisiológico (60 min) e a cápsula polimérica apresentou elevada afinidade com elementos sanguíneos, decrescendo ao longo do tempo e permitindo a detecção do ativo livre no plasma sanguíneo. Neste trabalho, uma formulação contendo nanopartículas de β -cariofileno apta para administração fisiológica e testes pré-clínicos foi desenvolvida com sucesso.

Palavras-chave: β -cariofileno. PEG. Nanopartículas. Intranasal. Canabinoides. Receptor-CB2. Nanotecnologia.

ABSTRACT

The present work is the first stage in the development of a therapeutic prototype applied to neurodegeneration. The sesquiterpene β -caryophyllene (BCP) was selected due to being a structurally singular cannabinoid and a selective agonist of the CB2 receptor, which in addition to being expressed in the CNS, is intrinsically expressed within the immune system and lacks psychoactivity. Nanoencapsulation of BCP was performed to allow controlled release of the drug into the CNS and optimized intranasal administration. The formulation was optimized regarding its composition, defining a polymer, surfactant, emulsifier, and their respective concentrations, in order to adjust the desired physicochemical parameters. The formulation was assessed regarding nanoparticle size, zeta potential, morphology, pH, osmolality, stability, drug release kinetics *in vitro*, and binding to plasma proteins *ex vivo*. The final composition of the BCP nanoparticles presented in its organic phase (FO) Tween 20 (0.25%), BCP (0.1%), and PEG 400 (5%) and in its aqueous phase (AF) ultrapure water and poloxamer P188 (0.25%). The formulation is suitable for intranasal administration, presenting pH 6.5 and osmolality of 150 mmol/kg. The mean particle diameter was 147.2 nm, PDI 0.052, and zeta potential of -24.5. The accelerated stability test shows that the particle is stable for up to 1 month, then the reversible creaming effect occurs. The rate of particle accumulation showed to be low and the particle size distribution remained unchanged. The release kinetics of BCP nanoparticles were shown to be promptly released in physiological medium (up to 60 min). The polymeric capsule revealed high affinity for the blood elements, decreasing over time, allowing linear detection of the free drug in the blood plasma. In this work, a formulation containing β -caryophyllene nanoparticles suitable for physiological administration and preclinical tests was successfully developed.

Keywords: β -caryophyllene. Nanoparticles. PEGylated. Intranasal. Cannabinoids. CB2-Receptor. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo de otimização da formulação de nanopartículas de BCP. Cada linha mostra o parâmetro avaliado, e o componente destacado foi utilizado para os testes subsequentes.....	40
Figura 2 - Estrutura química dos componentes finais das nanopartículas de BCP. A-Poloxamer P188, B- BCP, C- Tween20, D- PEG400.	53
Figura 3 - Distribuição do tamanho de partícula analisado por DLS.	56
Figura 4 - Representação gráfica do potencial zeta obtido por DLS.	56
Figura 5 - Caracterização morfológica das nanopartículas de BCP (N38) por fotomicrografia (TEM).	57
Figura 6 - Cromatograma ilustrando padrão analítico de BCP (azul), nanopartículas de BCP total (vermelho) e nanopartícula de BCP livre (preto).	58
Figura 7 - Representação do ensaio de estabilidade acelerada utilizando tecnologia STEP.	60
Figura 8 - Perfil de transmissão de nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.	60
Figura 9 - Integral da transmissão de nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.	61
Figura 10 - <i>Front tracking</i> das nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.	62
Figura 11 - Ilustração resumindo fenômenos físico-químicos que podem ocorrer com a desestabilização de uma suspensão/emulsão: sedimentação, <i>creaming</i> , flotação, coalescência, degradação difusional ou inversão de fase.	63
Figura 12 - Aspecto visual das nanopartículas de BCP após ensaio de estabilidade acelerada representando 3 meses, ilustrando fenômeno de <i>creaming</i>	64
Figura 13 - Índice de instabilidade das nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.	65
Figura 14 - Distribuição cumulativa de velocidade em função da velocidade de <i>creaming</i> das nanopartículas de BCP.	66
Figura 15 - Distribuição cumulativa do tamanho de nanopartículas de BCP	67

Figura 16 - Cinética de liberação das nanopartículas de BCP <i>in vitro</i> . Absorbância (verde/triângulo) e concentração cumulativa (azul/ quadrado).....	68
Figura 17 - Perfil de ligação das nanopartículas de BCP com elementos sanguíneos de ratos <i>ex vivo</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de liberação de BCP descritos na literatura.....	29
Tabela 2 - Composição em volume (μL) de formulações utilizadas em testes de solubilidade (solub.) do BCP, conforme as proporções de etanol (EtOH), glicerol, água (H_2O) e poloxamer (polox). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.	41
Tabela 3 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos em caracterização de nanoemulsões de BCP, indicando: composição, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas.	43
Tabela 4 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos em caracterização de formulações variando o polímero (0,5%) na composição nanopartículas de BCP. Tabela indicando: polímero, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.) índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.	44
Tabela 5 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos em caracterização de formulações variando a concentração do polímero escolhido (PEG 400) na composição nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem de PEG, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.	45
Tabela 6 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando razão entre solventes (etanol e água) na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: razão entre FO:FA (proporção), média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.	46
Tabela 7 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos retirando solventes orgânicos na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: composição, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice	

de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta).47

Tabela 8 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando o emulsificante (0,25%) na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: emulsificante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.48

Tabela 9 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando o a concentração do emulsificante Tween 20 na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem de emulsificante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.49

Tabela 10 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando surfactantes (0,4%) na fase aquosa na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: surfactante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio padrão), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio padrão zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.50

Tabela 11 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando a concentração do surfactante Poloxamer (Kolliphor P188) na fase aquosa na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem do surfactante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.50

Tabela 12 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando a concentração do ativo BCP na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem de Tween20, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão

(PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.52

Tabela 13 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando a grupos radicais mucoadesivos na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: aditivo, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta).....54

Tabela 14 - Otimização de protocolos de extração das nanopartículas de elementos plasmáticos ex vivo. Valores expressos em µl. (-) significa que o solvente não foi utilizado, (*) significa que ocorreu detecção de BCP no HPLC, e (x) que não houve detecção.....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG – 2-Araquidonoilglicerol
5-HT – Serotonina
5-HT₃ – Receptor serotoninérgico 3
A β – Peptídeos β -amilóides
Ach – Acetilcolina
AchE – Acetilcolinesterase
ACN – Acetonitrila
AD – Doença de Alzheimer
AEA – Anandamida
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
BCP – β -Cariofileno
bFGF – Fator de Crescimento Básico de Fibroblasto
BHE – Barreira Hemato-Encefálica
BME – 2-Mercaptoetanol
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
C6 – Células Derivadas de Glioblastoma de rato Tipo 6
CAT – Catalase
CB1 – Receptor Canabinoide 1
CB2 – Receptor Canabinoide 2
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CD4⁺ – Linfócito T Helper Grupamento de Diferenciação 4 ativado
CD8⁺ – Linfócito T Helper Grupamento de Diferenciação 8 ativado
CHCl₃ – Clorofórmio
COX-2 – Ciclo-oxigenase-2
CSF – Fluido Cerebro-Espinal
Cu – Cobre
Da - Dalton
DA- Dopamina
DAD – Detector de arranjo de diodos
DCE – Dicloroetano
DH – Desidrogenase
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
DMSO – Dimetilsulfóxido
ERK1/2 – Quinase Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2
FA – Fase Aquosa
FAS-FASL – Antígeno de apoptose
FAAH – Amido Hidrolase de Ácidos Graxos
FDA – Food and Drug Administration
FO – Fase Orgânica
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GPR55 – Receptor acoplado à proteína G 55
GPx – Glutationa peroxidase

GRP119 – Receptor acoplado à proteína G119
GSH – Glutathiona reduzida
H₂O – Água
HCl – Ácido clorídrico
HClO₄ – Ácido perclórico
HD – Doença de Huntington
HPLC– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose
I.P. – Intraperitoneal
I.V. – Intravenoso
L-DOPA – Levodopa
LCME– Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LLE – Extração Líquido-Líquido
MAO-B – Monoamina Oxidase B
ME – Esclerose Múltipla
MeOH – Metanol
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
MPTP – 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
N – Nano
NA- Noradrenalina
NP- Nanopartícula
NaOH – Bicarbonato de Sódio
NC – Nano Cariófileno
NFκB – Fator Nuclear Kappa B
NK – Células Natural Killer
NPs – Nanopartículas
NRF 2 – Fator Nuclear Tipo 2
NVU – Unidade Neurovascular
OE – Óleo Essencial
P38 – Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno 38
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PCL – Policaprolactona
PD – Doença de Parkinson
PDI – Índice de polidispersão
PEG – Polietilenoglicol
PVA – Álcool polivinílico
PVP– Polivinilpirrolidona
RCF – Força Cetrífuga Relativa
RES – Sistema Retículo Endotelial
ROS – Espécie Reativa de Oxigênio
SAR- Relação Estrutura-Atividade
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD -Superóxido dismutase

SS – Separação de amostra
STEP – Perfis de Extinção com Espaço e Tempo
TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TEM –Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGI - Trato Gastrointestinal
TH – Linfócito T Helper
THF – Tetrahidrofurano
TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
Trka - Receptor de tropomiosina quinase A
TRPV1– Receptor Vanilóide 1
TS – Teste de solubilidade
UV – Radiação Ultravioleta
VDW – Van Der Waals
 $\alpha 7$ – Receptor Colinérgico 7
 δ – Receptor Opióide Delta
 Δ^9 -THC – Delta-9-tetra-hidrocanabinol
 μ – Receptor Opióide Mi

SUMÁRIO

SUMÁRIO	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Potencial terapêutico do sistema endocanabinoide.....	19
1.2 Relevância para doenças neurodegenerativas.....	21
1.3 Neuroinflamação como alvo terapêutico	24
1.4 Agonista CB2 β -cariofileno	26
1.5 Associação a sistemas nanocarreadores de fármacos no SNC	28
1.6 Justificativa e hipótese	32
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material	35
3.2 Formulação e caracterização	35
3.2.1 Formulação de nanopartículas de BCP.....	35
3.2.2 Determinação do pH e osmolaridade	35
3.2.3 Caracterização morfológica	35
3.2.4 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta....	36
3.2.5 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de	
ativo	36
3.2.6 Estudo de estabilidade	36
3.3 Estudos <i>in vitro</i>	37
3.3.1 Cinética de liberação de ativo <i>in vitro</i>	37
3.4 Estudos <i>In vivo</i>	37
3.4.1 Farmacocinética e permeação da BHE	37
3.5 Estudos <i>ex vivo</i>	38
3.5.1 Cinética de ligação com proteínas plasmáticas	38
3.6 Análise estatística	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Formulação de Nanopartículas de Cariofileno.....	39

4.1.1 Adequação para administração intranasal.....	53
4.2 Caracterização do nanomaterial	55
4.2.1 Tamanho de partícula	55
4.2.2 Morfologia.....	57
4.2.3 Eficiência de encapsulação e teor ativo	58
4.2.4 Estabilidade	58
4.3 Estudos <i>in vitro</i>	68
4.3.1. Cinética de liberação.....	68
4.4 Estudos <i>ex vivo</i>	70
4.4.1 Ligação com proteínas plasmáticas	70
5 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 POTENCIAL TERAPÊUTICO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Nenhum outro sistema de sinalização celular descoberto na última década levantou tanta expectativa ao desenvolvimento de novas terapias, abrangendo diversas patologias e apresentando tantos alvos terapêuticos em diferentes tecidos, quanto o sistema endocanabinoide (Di Marzo 2008). Apesar da *Cannabis sp.* ter uso medicinal documentado nas farmacopéias orientais há milhares de anos, apenas no século XVIII seu uso foi estabelecido no oriente, utilizando-a como analgésico, anti-inflamatório, anti-convulsivo e antiemético (Touw 1981). No entanto, no século seguinte, restrições foram impostas devido a sua psicoatividade e efeitos comportamentais. Recentemente, as crescentes descobertas e estudos em relação ao potencial terapêutico dos canabinoides tem sido exponencialmente explorados para uso medicinal (Hill, Williams et al. 2012). A resina excretada pelos tricomas da planta contém uma variedade de constituintes, os quais podem desempenhar papel de defesa nas atividades biológicas da planta, assim como muitos outros metabólitos secundários. Entre estes estão os terpenos, flavonoides e canabinoides (Hazekamp 2007). Apesar do composto mais conhecido e estudado ser o delta-9-tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), há pelo menos 66 canabinoides diferentes já descritos. Quimicamente, os canabinoides pertencem aos terpenofenóis, comuns na natureza em diferentes grupos taxonômicos. Outro grupo químico importante devido à relação estrutura-atividade (SAR) são os terpenos, tendo sido isolados mais de 100 compostos, incluindo 58 monoterpenos, 38 sesquiterpenos, 1 diterpeno, 2 triterpenos e 4 outros terpenóides (Turner, Elshohly et al. 1980).

Nos últimos anos, vários outros metabólitos secundários vegetais não canabinoides foram relatados por se ligarem e interagirem funcionalmente com os receptores canabinoides (Gertsch, Pertwee et al. 2010). Os receptores canabinoides e seus ligantes endógenos, constituem o que é chamado de sistema endocanabinoide. O receptor CB1 está mais claramente presente no sistema nervoso central (SNC), mas também é encontrado em certos órgãos e tecidos periféricos. O segundo receptor canabinoide (CB2) foi encontrado em maior expressão periférica e também no SNC, com papel nos processos imunológicos. Dentre seus ligantes endógenos, a anandamida (ácido araquidônico, etanolamina) possui alta afinidade pelo receptor CB1, enquanto o 2-araquidonil glicerol (2-AG) tem afinidade por ambos os receptores canabinoides. A interação destes ligantes endógenos aos seus receptores canabinoides regula uma série de processos fisiológicos. Ambos os receptores CB1 e CB2 inibem a adenilato ciclase e regulam canais

iônicos, incluindo canais de potássio, acoplados à proteína G, ou dependente de voltagem do canal de cálcio. Receptores canabinoides regulam a atividade de uma variedade de quinases intracelulares e a ação de vários neurotransmissores, e.g., acetilcolina (ACh), dopamina (DA), ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, serotonina (5HT), noradrenalina (NA) e opioides endógenos (Zuardi 2008)(Holgado, Martín-Banderas et al. 2017). Nem todas as atividades dos canabinoides podem ser explicados pelos efeitos mediados pelos receptores, e acredita-se que pelo menos alguns efeitos são inespecíficos e causados via *cross-talk* entre outros sistemas como o serotoninérgico (5-HT₃), colinérgico (α 7), opioide (μ , δ) e vaniloide (TRPV1), além de efeitos independentes de receptores. Essas modulações dos canais de cálcio e potássio regulam a liberação de neurotransmissores como a inibição de glutamato, noradrenalina e acetilcolina. Sugere-se também que pode haver difusão direta de endocanabinoides através da membrana bifosfolipídica, ou mesmo o agonismo de receptores não identificados. De fato, novos receptores como GPR55 e GPR119 têm sido apontados como integrantes do sistema canabinoide (Sanchez and Garcia-Merino 2012). Todas essas interações implicam na regulação de uma ampla gama de funções fisiológicas e sistemas, o que os torna promissores candidatos ao tratamento de numerosas patologias, destacando a neurodegeneração, distúrbios metabólicos e do apetite, câncer, dor crônica e outros.

Apesar da etnofarmacologia datar como milenar o uso de canabinoides de forma medicinal (Hill, Williams et al. 2012), medicamentos licenciados que têm como alvo os receptores canabinoides surgiram a partir de 1981 somente, com o lançamento do agonista CB1/CB2 nabilona (Cesamet®), um análogo sintético do Δ^9 -THC utilizado para aliviar sintomas da quimioterapia. O efeito mais conhecido do agonismo do recetor CB1 é o antiemético, como é o caso do Δ^9 -THC e da nabilona. De fato, o tratamento de náusea associado à quimioterapia foi um dos primeiros usos terapêuticos aprovados de canabinoides avaliados em pacientes resistentes a outros fármacos, como o ondansetron (antagonista de 5-HT₃) ou a metoclopramida (antidopaminérgico). É importante destacar também seu efeito analgésico, especialmente em dores neuropáticas e crônicas. Este efeito analgésico é mediado pelos receptores CB1 e CB2. Atualmente, o dronabinol (Marinol®), composto por Δ^9 -THC sintético, e Sativex®, extrato alcoólico de *Cannabis* sp. contendo os fitocanabinoides Δ^9 -THC e CBD, são empregados no alívio de dor neuropática de pacientes com esclerose múltipla (EM) e pela analgesia e efeitos antieméticos em casos avançados de câncer ou AIDS, por exemplo (Pertwee 2009). Há também evidências de que o uso de canabinoides pode melhorar a capacidade do hospedeiro de controlar a carga viral de HIV e prolongar sobrevivência (Molina, Amedee et al. 2011). O efeito imunomodulatório está mais

intimamente relacionado ao receptor CB2. Os receptores CB2, além de estarem presentes no SNC, neurônios e células troncos neurais, são expressos principalmente nas células imunológicas (células B, NK, neutrófilos, monócitos, Linfócitos T CD8+ e CD4+) (Sanchez and Garcia-Merino 2012). O envolvimento do CB2 se destaca em diversas patologias que não possuem tratamentos adequados, com papel promissor do desenvolvimento de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios (Atwood, Straiker et al. 2012). O agonismo do CB2 está associado não apenas à redução da ativação microglial, mas em diversas vias anti-inflamatórias como: inibição da produção de óxido nítrico (NO) e da expressão de outras citocinas inflamatórias (NFκB, TNFα COX-2), diminuição da liberação de glutamato, redução do fluxo sanguíneo cerebral, aumento de fatores neurotróficos (BDNF e bFGF), inibição da amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH), aumentando os níveis endógenos de endocanabinoides (2-AG e AEA), além de outras propriedades antioxidantes (Sanchez and Garcia-Merino 2012). Devido principalmente à localização da expressão dos seus receptores, o sistema endocanabinoide exerce um amplo espectro de ações nas células dos ramos adaptativos e inatos do sistema imunológico, tanto na periferia quanto no SNC. Dentro do SNC, outras ações bem definidas protegem os neurônios contra lesões e possuem ações anti-inflamatórias de neuroprotetoras, especialmente relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

1.2 RELEVÂNCIA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE PARA DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A neurodegeneração, por definição, perturba propriedades específicas do SNC e, por consequência, suas funções, bem como a estrutura ou sobrevivência de neurônios. Ao contrário das células primárias da periferia, células neuronais do SNC não se regeneram. Devido à complexidade do SNC, distúrbios neurológicos são especialmente desafiadores à ciência (Ransohoff 2016). Doenças neurológicas afetam cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo. As doenças neurodegenerativas englobam mais de 600 patologias do SNC (Trippier, Labby et al. 2013), sendo que as mais comuns a Doença de Alzheimer (AD), Doença de Parkinson (PD), Doença de Huntington (HD), Esclerose Múltipla (ME) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS). A doença de Alzheimer é predominante, afetando cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo, constituindo a sexta maior causa de mortes nos EUA (World Health 2007). Com o avanço da medicina e o constante envelhecimento da população, estima-se que o número de pacientes de AD dobre até 2050 (World Health 2006). Enquanto todas as doenças neurodegenerativas são marcadas pela perda neuronal e atrofia cerebral, algumas doenças variam nas suas manifestações clínicas. AD e outras

demências são marcadas principalmente pelo declínio cognitivo, enquanto ALS e ME inicialmente se destacam pelo comprometimento motor. Outras, como HD, têm déficit cognitivo e motor como características predominantes desde o início.

A Doença de Alzheimer (AD) está associada à deterioração cognitiva progressiva e perda neuronal intensiva. Sua principal característica é a presença de placas senis, compostas de depósitos extracelulares de peptídeos β -amilóides ($A\beta$). A teoria mais aceita da etiologia da AD é de que fragmentos de $A\beta$ causam a morte neuronal, iniciando acentuadamente em regiões cerebrais relacionadas com a memória e cognição (hipocampo, córtex e amígdala). Outra característica patológica é a hiperfosforilação da proteína tau associada aos microtúbulos, resultando na formação de agregados neurofibrilares que alteram a comunicação intracelular (Ferrer 2014). A deposição de $A\beta$ excede a capacidade fagocítica da microglia e esta causa uma liberação prolongada de citocinas pró-inflamatórias. Este processo contribui à geração de espécies reativas de oxigênio que medeiam o estresse oxidativo relacionado à AD (Holgado, Martín-Banderas et al. 2017). Os canabinoides estimulam a remoção do $A\beta$ intraneuronal e bloqueiam a resposta inflamatória, de forma que a toxicidade de peptídeos $A\beta$ pode ser bloqueada pela ativação de receptores canabinoides (Currais, Quehenberger et al. 2016). O canabidiol (CBD) ($\geq 0,1 \mu\text{M}$) diminui níveis de ROS e peroxidação lipídica associada à proteína β -amilóide *in vitro*, além de atenuar a ativação microglial *in vitro* e *in vivo* em modelos de AD (Mildew, Mites et al. 2004, Esposito, De Filippis et al. 2006, Martín-Moreno, Reigada et al. 2011).

A doença de Huntington (HD) é caracterizada por anormalidades motoras, disfunção cognitiva e sintomas psiquiátricos. A mutação no gene da huntingtina, leva à tradução de uma poliglutamina anormal tóxica. Os primeiros sintomas da HD podem incluir hiperinesia e dificuldade de equilíbrio. Posteriormente, a HD pode desabilitar a capacidade de andar, falar e engolir. Atualmente, não existe medicamento específico para aliviar os sintomas cognitivos e motores, ou retardar a progressão da doença (Frank 2014). Canabinoides protegem os neurônios do estriado contra a toxicidade causada pela toxina utilizada para induzir modelo experimental da HD (3NP), que produz dano oxidativo mitocondrial. Além disso, aliviam os sintomas hipercinéticos, devido aos seus efeitos inibitórios sobre o neurônios motores. Os canabinoides vem sendo estudados como modificadores da HD devido às suas propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras (Valdeolivas, Satta et al. 2012). Um ensaio clínico com CBD (300–600 mg) em pacientes com HD evidenciou melhoras dos sintomas da doença e a perda da expressão do receptor CB1 na região nigroestriatal se mostrou um fator importante na patogênese de HD (Hill, Williams et al. 2012).

A doença de Parkinson (PD) é designada pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra*, o que resulta em tremores, bradicinesia e rigidez. Os principais sintomas da DP podem ser atenuados com a terapia de reposição dopaminérgica. No entanto, esta terapia não é eficaz em todos os pacientes. Além disso, após uma década de uso de L-DOPA, o estado discinético é irreversível. Portanto, a busca por terapias que retardem a progressão do dano nigrostriatal é o principal desafio ao tratamento da PD (Köfalvi 2007). Alguns canabinoides atuam como protetores de neurônios da *substantia nigra* contra a morte causada por diversos estímulos citotóxicos, em vários modelos experimentais da PD. Esses compostos atuam através de mecanismos antioxidantes que parecem ser independentes dos receptores CB1 ou CB2. Além disso, os receptores CB1, que são muito abundantes nas estruturas dos gânglios da base, têm efeitos hipocinéticos que contrapõem a hiperinesia típica da PD (More and Choi 2015). Ademais, em modelo murino de PD, animais tratados com nabilone ($\geq 0,1$ mg/kg) apresentaram menor discinesia induzida por L-DOPA e maiores níveis de mRNA de tirosina hidroxilase e dopamina, ipsilateral à lesão. (Hill, Williams et al. 2012). Além disso, foi demonstrado *in vitro* que a ativação do receptor canabinoide também pode proteger a degeneração neuronal decorrente da acumulação citoplasmática de α -sinucleína e parkina (Jeon, Yang et al. 2011).

A esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma doença neuromuscular progressiva que destrói os neurônios motores, posteriormente levando ao óbito devido à insuficiência respiratória. Outros mecanismos potencialmente envolvidos na degeneração dos neurônios motores incluem disfunção mitocondrial, neuroinflamação, deficiência de fatores de crescimento neurotróficos e excitotoxicidade glutamatérgica. O único tratamento aprovado pelo FDA é o riluzol, apesar da sua limitada eficácia terapêutica (Köfalvi 2007). Foi observado que a administração do agonista CB2 AM1241 diminuiu sinais da progressão em um modelo murino de ALS (Hill, Williams et al. 2012).

A esclerose múltipla (ME) é uma doença auto-imune desmielinizante. É a causa mais comum de incapacidade neurológica não traumática em jovens adultos, afetando mais de dois milhões de pessoas em todo o mundo. A desmielinização resulta de uma resposta auto-imune mediada por linfócitos T, especialmente Th17 e Th1. A ME é caracterizada por inflamação, desmielinização e dano axonal. Não há cura para doenças desmielinizantes e os sintomas tendem a variar entre pacientes, incluindo incapacidades físicas e mentais. No entanto, a maioria das terapias atuais são imunossupressoras e possuem limitações relacionadas a efeitos colaterais e não alteram de maneira eficaz a progressão da doença. Em modelos murinos de ME, o agonismo de

CB1/CB2 limitou sintomas, relapsos, perda axonal e neuroinflamação (Hill, Williams et al. 2012).

A etiologia de todas essas doenças não pode ser apontada com precisão, embora saiba-se do envolvimento de uma gama de cascatas de sinalização, marcadores neuronais e genéticos associados com seu desenvolvimento. Características patológicas comuns a doenças neurodegenerativas são a perda neuronal, atrofia, estresse oxidativo, inflamação e mal dobramento de proteínas. No entanto, as neuropatologias distinguem-se quanto à extensão de perda das populações neuronais, os tipos de proteínas envolvidos e suas localizações (Yacoubian 2017). A neuroinflamação tem sido associada a múltiplos mecanismos neurodegenerativos, tanto como causa ou consequência do estresse oxidativo crônico, um fator fundamental na neurodegeneração, que causa alteração estrutural e genética de lipídios e proteínas (Chen, Zhang et al. 2016). Em doenças neurodegenerativas, a inflamação pode ser desencadeada pela acumulação de agregados proteicos, por mediadores químicos dos neurônios lesados ou pelo desequilíbrio entre o processo pró- e anti-inflamatório (Wyss-Coray and Mucke 2002). A proeminente associação das proteínas inflamatórias com lesões da AD levou à formação da hipótese inflamatória, na qual o dano neuronal observado não é causado pela patologia fundamental, mas sim pela resposta inflamatória a ela (McGeer and McGeer 1995).

1.3 NEUROINFLAMAÇÃO COMO ALVO TERAPÊUTICO

A inflamação é uma reação de defesa multicelular que desempenha importante papel fisiológico na remoção de substâncias ofensivas e recuperação de lesões. Ela pode ser desencadeada por diversos fatores, como microrganismos, substâncias químicas, ou agentes físicos externos. No SNC, a microglia remove os detritos após o dano neuronal (Neumann, Kotter et al. 2008). Não apenas a microglia, mas também as células T podem auxiliar na recuperação durante doenças neurodegenerativas (Schwartz, London et al. 2009). Estudos detalhados da interação neuroimune, tanto a nível celular como molecular, revelam interações complexas, demonstrando que as células imunes secretam moléculas tanto neurotóxicas quanto neuroprotetoras (Amor, Puentes et al. 2010). Dada à multiplicidade de funções dos fatores inflamatórios, é difícil apontar seus papéis específicos em certas patofisiologias.

O SNC é parcialmente isolado imunologicamente devido à barreira hemato-encefálica (BHE), que é projetada para limitar a entrada de células periféricas, solutos e íons no SNC (Carson, Doose et al. 2006). A migração celular ocorre nas vênulas pós-capilares, onde a migração celular é controlada por moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e seus receptores (Owens, Bechmann et al. 2008). A

microglia está espalhada uniformemente em todo o SNC e forma uma rede de potencial células efectoras. Em contraste com os macrófagos periféricos, que são altamente eficazes em incitar respostas pró-inflamatórias, a microglia normalmente assume um papel oposto, limitando a inflamação. Este papel é estendido também aos astrócitos, que podem suprimir respostas de Th1 e Th2. Danos a neurônios ou mutações em proteínas do SNC levam à ativação de macrófagos e microglia, que por sua vez, estimula várias citocinas e quimiocinas que induzem expressão de moléculas de adesão na BHE, permitindo certa permeação celular da periferia e induzindo a expressão de moléculas co-estimulatórias na microglia. Esta resposta, se descontrolada, pode levar à citotoxicidade mediada por células T, excitotoxicidade glutamatérgica, ou citotoxicidade induzida por antígeno de apoptose (Fas-FasL). Por outro lado, a neuroproteção e a regeneração também são oferecidas pelas células do sistema imunológico. Linfócitos T secretam fatores neuroprotetores e suprimem respostas pró-inflamatórias, enquanto a microglia realiza fagocitose e astrócitos estimulam o crescimento e o reparo via fatores de crescimento neurotróficos (Amor, Puentes et al. 2010).

Doenças neurodegenerativas progridem rapidamente e possuem poucas opções terapêuticas. Isso levou à pesquisa de melhores compostos com atividade biológica sobre diversos mecanismos patogênicos. Uma estratégia terapêutica efetiva sobre doenças neurodegenerativas deveria atuar sobre a neuroinflamação mediada pela resposta imune inata e adaptativa (Mosley and Gendelman 2010). Os tratamentos sintomáticos melhoram os sintomas sem alterar a progressão da doença, enquanto os moduladores alteram significativamente a neurodegeneração. Isso depende dos seus mecanismos e alvos terapêuticos, que levam a diferentes respostas fisiológicas. Por exemplo, tratamentos para PD diminuem o déficit motor, bradicinesia e tremores, mas não melhoram a patologia em si. O tratamento típico considera a normalização dos níveis de dopamina através da administração de L-DOPA, agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B) e inibidores da catecol-O-metil-transferase. Estudos recentes de desenvolvimento colocaram ênfase específica em moléculas capazes de alterar a progressão da doença. O tratamento sintomático de AD através da inibição da colinesterase também apresenta eficácia moderada em restaurar algumas funções cognitivas (Khanam, Ali et al.) O primeiro fármaco que inibe a formação de placa β -amilóide, MK-8931, recentemente passou pelos testes clínicos de fase I (Kennedy, Stamford et al. 2016). No entanto, ainda assim não se estabeleceu a relação de causa-consequência entre a os agregados proteicos e o dano cognitivo. Dessa forma, a melhor estratégia é atuar em múltiplos alvos terapêuticos que modifiquem a progressão da doença. Ligantes multifuncionais estão sendo explorados para ter inibição de acetilcolinesterase (AChE),

atividade antioxidante, capacidade quelante e desagregação de fibrilas A β 1-42 (Bawa, Pradeep et al. 2016).

Estudos recentes têm mostrado novas aplicações terapêuticas para o sistema canabinoide, especialmente em relação à doenças neurodegenerativas. Receptores canabinoides atuam nos processos fundamentais da ativação da microglia, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, o recrutamento de macrófagos periféricos para o SNC, bem como o bloqueio da propagação de mediadores pró-inflamatórios. Este mecanismo torna o sistema endocabinoide um promissor alvo farmacológico na busca de novos agentes anti-inflamatórios para modulação do dano ligado à doenças neurodegenerativas (Stella 2010). Apesar dos canabinoides possuírem um perfil de segurança farmacológica favorável, o seu uso clínico é severamente limitado devido à sua psicoatividade mediada pelo receptor CB1. A alternativa mais clara é utilizar agonistas seletivos do receptor CB2. A expressão desses receptores é aumentada sob condições patológicas como mecanismo de defesa neurológico (Ramos and Guzman). Além disso, a distribuição desses receptores facilita seu uso alvo terapêutico.

1.4 AGONISTA CB2: B-CARIOFILENO

O sesquiterpeno β -cariofileno (BCP) é o primeiro composto derivado da *Cannabis* spp. fundamentalmente diferente dos canabinoides clássicos. Sua estrutura é menor, menos complexa e menos suscetível a ataques nucleofílicos e eletrofílicos, comparativamente aos canabinoides clássicos. Este metabólito secundário é o principal constituinte do óleo essencial (OE) da *Cannabis* spp. (35,9%) (Dutra, Claudino et al. 2011) e possui efeitos canabimiméticos, contribuindo significativamente às preparações comerciais a base da planta (eg. Sativex). Ademais, o BCP é encontrado em outras espécies vegetais e especiarias comuns na dieta humana, e.g., orégano (*Origanum vulgare* L.), canela (*Cinnamomum* spp.) e pimenta preta (*Piper nigrum* L.). Estima-se que a ingestão diária de 10–200 mg deste sesquiterpeno pode ser um fator positivo à modulação de processos patofisiológicos, via sistema endocanabinoide.

Sua farmacologia é bem definida, sendo descrito que o BCP liga-se seletivamente ao sítio de ligação CP55,940 no receptor CB2, levando à ativação de vários processos celulares e seus efeitos anti-inflamatórios (Gertsch, Leonti et al. 2008). Já foi demonstrado que com a ligação ao CB2, o BCP inibe a adenilato ciclase e ativa a cascata das quinases Erk1/2 and p38 em células humanas (Bento, Marcon et al. 2011). BCP também preveniu toxicidade glutamatérgica em células neuronais C6, inibindo as produção de ROS e modulando o potencial de membrana. Além disso, o BCP induziu a translocação de Nrf2,

melhorando o sistema antioxidante intracelular de glutathiona reduzida (GSH) (Assis, Stralioetto et al. 2014).

Diversos estudos pré-clínicos observaram a relevância do BCP em distúrbios diversos no SNC. O pré-tratamento com BCP exerceu múltiplos efeitos protetores sobre a unidade neurovascular (NVU) *in vitro* no contexto da lesão induzida de isquemia cerebral. Esses efeitos protetores ocorrem potencialmente através de reduções no dano por estresse oxidativo e citocinas inflamatórias que induzem a degradação da BHE, resultando subsequentemente em redução da apoptose neuronal (Tian, Peng et al. 2016). Efeitos neuroprotetores do BCP também foram observados em modelo murino da PD induzida por 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), no qual o tratamento preventivo com BCP (I.P., diluído em azeite de oliva) melhorou a disfunção motora, protegeu contra perdas neuronais dopaminérgicas no estriado e aliviou a ativação da microglia induzida por MPTP. Além disso, o BCP inibiu os níveis de citocinas inflamatórias no sistema nigrostriatal. A neuroproteção observada e inibição da ativação da microglia foram revertidas após o tratamento com o antagonista seletivo do CB2 AM630, confirmando o envolvimento do CB2 (Ojha, Javed et al. 2016, Viveros-Paredes, González-Castañeda et al. 2017). Em AD, o BCP inibiu neuroinflamação induzida por oligômeros do peptídeo A β em células microgliciais BV-2 *in vitro*. Isso levou à inibição significativa de NO, iNOS, prostaglandinas (PGE2), COX-2, citocinas pró-inflamatórias e superexpressão do receptor TLR4 (Hu, Zeng et al. 2017). O BCP (via oral) também melhorou o fenótipo tipo AD em camundongos APP/PS1, através da ativação do receptor CB2 e da via do PPAR γ (Cheng, Dong et al. 2014). Em células PC 12 *in vitro*, em modelos celulares da AD, PD e HD, o BCP apresentou resultados benéficos nos três modelos: reduziu a apoptose via caspase-3 e estimulou a diferenciação celular e aumentou a expressão de proteínas neurotípicas em células PC 12 não expostas a NGFs (Ferreira 2014). Também *in vitro* foi determinado que o BCP ativa os receptores Trka e induz a neuritogênese por um mecanismo independente do NGF, ou dos receptores canabinoides no mesmo modelo (Santos, Martins et al. 2017). O tratamento preventivo com BCP (I.P., em DMSO) levou à redução da atividade convulsiva e da mortalidade em ratos tratados com ácido cáinico. Além disto, preservou a atividade das enzimas GPx, SOD e CAT. O BCP apresentou capacidade de exercer efeito anti-inflamatório cerebral mitigando a expressão de fatores pró-inflamatórios (Liu, Song et al. 2015). Ainda, o BCP (I.P., diluído em azeite de oliva) produz múltiplas alterações comportamentais ansiolíticas e antidepressivas relevantes para a ansiedade e depressão em ratos (Bahi, Al Mansouri et al. 2014). A administração crônica de BCP (via oral, diluído em azeite de oliva e óleo de milho, respectivamente) também atenuou a hiperalgesia murina, além de não causar efeitos de tolerância para um tratamento prolongado

(Klauke, Racz et al. 2014) (Paula-Freire, Andersen et al. 2014). Ainda existem relatos específicos ao efeito do BCP (via oral) quanto à redução de inflamação em modelo agudo de edema de pata (Fernandes, Passos et al. 2007), assim como quando administrado (via oral) em tratamento preventivo e terapêutico de colite (Bento, Marcon et al.)2011) e isquemia cerebral *ex vivo* (Chang, Kim et al. 2013).

O efeito imunomodulatório do BCP foi amplamente descrito em modelo murino de ME (EAE), no qual o tratamento com OE de *Pterodon emarginatus*, que possui BCP como componente majoritário em proporção similar ao do OE de *Cannabis* spp., melhorou tanto sintomas motores quanto neurológicos, e diminuiu significativamente mediadores neuroinflamatórios, inibindo tanto a ativação microglial como a expressão da NOS, associadas à inibição da desmielinização coronária e do óxido nítrico durante o desenvolvimento da doença (Alberti, Marcon et al. 2014). Adicionalmente, presença de o BCP no OE de *P. emarginatus* foi associada a efeitos anti-inflamatórios, antiulcerogênicos (Dutra, Fava et al. 2009), antimicrobianos (Dutra, Braga et al. 2009) e antinociceptivos (Dutra, Trevizani et al. 2008). A administração oral de BCP (50mg/kg), demonstrou melhora dos parâmetros clínicos e patológicos da EAE, sendo que os mecanismos subjacentes ao efeito imunomodulador estão ligados à sua capacidade de inibir as células da microglia, linfócitos T CD4 + e CD8 +, bem como à expressão de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, foi constatado que o BCP diminui a desmielinização axonal e modula o equilíbrio imunológico Th1/Treg, via ativação do receptor CB2. Este conjunto de resultados apoia fortemente a eficácia do BCP como uma molécula para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos imunomodulatórios no SNC (Alberti, Barbosa et al. 2017).

1.5 ASSOCIAÇÃO A SISTEMAS NANOCARREADORES DE FÁRMACOS NO SNC

Testes pré-clínicos com BCP foram previamente realizados com soluções de excipientes constituídas por azeite, DMSO e Tween 80. Estas formulações não fornecem proteção substancial contra a oxidação do ativo, além de sofrer com a baixa biodisponibilidade pela necessidade de administração via oral. Há sistemas de liberação com BCP como componente, sendo que a maioria utiliza algum óleo essencial que possui como um dos componentes o BCP, em detrimento da utilização do BCP isolado (Santos, Oliveira et al. 2018). Entretanto, salvo melhor juízo, nanopartículas de BCP isolado só existem complexadas com ciclodextrina (tabela 1). Um destes complexos constatou melhora dos *déficits* cognitivos em ratos com demência vascular via CB2, quando administrado via intraperitoneal (I.P.) (Lou, Teng et al. 2017). Outro complexo produziu efeito anti-hiperalgésico envolvendo a inibição da

expressão da proteína c-Fos quando administrado via oral (Quintans-Júnior, Araújo et al. 2016). A farmacocinética dos complexos de inclusão BCP: β -CD só foi analisada via oral (Siqueira-Lima, 2017; Liu 2019). Nenhuma das publicações analisou o tamanho dos complexos de infusão e se houve permeação da BHE para o SNC.

Tabela 1- Sistemas de liberação de BCP descritos na literatura.

Sistemas de liberação	Composição	Meta de estudo	Referência
Nanopartículas Metálicas	BCP, AgNO ₃	Malária e cancer.	Lee 2016
Complexos de inclusão com ciclodextrinas	BCP: β -CD	Hiperálgia	Quintans-Júnior 2016
	BCP: β -CD	Perfil farmacocinético	Liu 2019
	BCP: HP β CD	Biodisponibilidade, isquemia cerebral	Siqueira-Lima 2017
	BCP: β -CD, γ -CD, HP β CD RAMEB, CRYSMEB	Volatilidade	Kfoury 2015

Fonte: Santos, Oliveira et al. 2018, com modificações.

Há dificuldades na formulação de fármacos canabinoides em diversas formas de dosagem devido à alta instabilidade físico-química, natureza altamente lipofílica, baixa solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade através do trato gastrointestinal (TGI). Por esta razão, a nanotecnologia representa uma estratégia importante à formulação de sistemas de liberação destas substâncias. A elaboração de nanocarreadores para a administração de canabinoides é uma solução promissora em relação a outros sistemas convencionais de veiculação de fármacos (Holgado, Martín-Banderas et al. 2017). Ademais, mesmo os canabinoides sendo bons candidatos terapêuticos, outro desafio imposto por doenças neurodegenerativas é a dificuldade de acesso ao SNC, devido à presença da BHE. Ela é essencial para proteger o cérebro de agentes nocivos, entretanto, dificulta a liberação da maioria dos agentes terapêuticos no SNC, com a exceção de compostos hidrofílicos com menos de 150 Da, ou altamente hidrofóbicos com massa menor que 400 Da que cruzam a membrana por difusão via paracelular (Masserini 2013). Várias estratégias podem

ser empregadas à administração de fármacos com ação cerebral e liberação controlada, evitando danos à BHE. Dentre eles, os métodos baseados em nanobiotecnologia também possuem os melhores prospectos para este ideal (Jain 2012). A nanoencapsulação é uma ferramenta avançada de veículos de liberação de fármacos pois a escala nanométrica confere características físico-químicas de superfície únicas. Nanoformulações a base de nanopartículas (NP), micelas ou outros nanocarreadores, por exemplo, consituem estratégias à superação do obstáculo da BHE, apresentando maior efetividade no tratamento de doenças neurodegenerativas (Nowacek, Kosloski et al. 2009). O transporte de nanopartículas através da BHE parece ocorrer por endocitose e pelas células endoteliais capilares, seguida por transcitose paracelular (Kreuter 2014). Embora existam poucos produtos de NPs no mercado, o número de estudos em fase II-III é crescente (Tosi, Bortot et al. 2013). Já foi demonstrado que NPs poliméricas associadas a canabinoides não apresentaram toxicidade *in vitro* (Martín Banderas, Álvarez Fuentes et al. 2012) e NPs poliméricas foram eficientes em modelo da AD *in vitro* (Mathew, Fukuda et al. 2012).

Nanopartículas para fins farmacêuticos são estruturas coloidais sólidas, com tamanho variando de 1 a 1000 nm, consistindo de materiais macromoleculares nos quais o princípio ativo é solubilizado e encapsulado (Kreuter 2014). Para desenvolvimento de uma nanopartícula carreadora, o fármaco é dissolvido e ligado a uma matriz estabilizadora e, dependendo do método de preparação, nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas podem ser obtidas, por exemplo. Nas nanopartículas, o fármaco é confinada a uma cavidade cercada por um invólucro anfifílico, como polímeros; lipídico; ou até mesmo material inorgânico, por exemplo. Nanopartículas poliméricas (NP) biodegradáveis são potenciais dispositivos de liberação de fármacos, em vista de sua capacidade de atingir tecidos específicos, carrear fármacos de naturezas distintas e inúmeras possibilidades de customização de propriedades físico-químicas de superfície da nanopartícula. NPs são preparadas principalmente por dois métodos: dispersão de polímeros pré-formados, ou polimerização de monômeros. Um dos principais métodos dentro de dispersão de polímeros pré-formados considera a evaporação de solvente. Neste método, o fármaco lipofílico é dissolvido em uma solução de polímero pré-formado e esta mistura é então emulsionada numa solução aquosa, utilizando um agente surfactante. Este processo produz um sistema coloidal denominado emulsão de óleo (O) em água (A), i.e., emulsão O/A. Após a formação de uma emulsão estável, o solvente é evaporado sob condições térmicas e de pressão controladas e agitação contínua. Enquanto este procedimento é pertinente para uma operação em escala de laboratório, para uma produção em larga escala o método de

emulsificação espontânea é mais facilmente escalonável por não requerer evaporação de solvente. Devido à difusão espontânea do solvente solúvel em água, uma turbulência interfacial é criada entre duas fases, levando à formação de partículas submicrométricas proporcionais à energia de cisalhamento aplicada (Soppimath, Aminabhavi et al. 2001). Além do tamanho das NPs, sua hidrofobicidade e características superficiais determinam a sua interação com o sistema fisiológico e farmacologia. Assim, para o *design* de NPs de longa circulação é necessário projetá-las de acordo com a natureza do polímero, ou com a modificação da superfície deste. A eficiência da modificação da superfície pode ser medida estimando-se a carga de superfície da NP, a densidade dos grupos funcionais, ou um aumento na hidrofiliabilidade. A escolha do surfactante adequado depende do polímero das nanopartículas, mas pode adicionalmente ser influenciado pelo fármaco carregado, pois isso também pode influenciar as propriedades das nanopartículas (Kreuter 2014).

As NP podem ser administradas por diversas vias, levando em consideração também a farmacocinética do fármaco. A via intranasal se destaca por alcançar níveis rápidos e mais altos de absorção de fármacos. Isto porque, a mucosa nasal possui área superficial que permite a liberação sistêmica de medicamentos devido ao alto grau de vascularização e permeabilidade da mucosa (Aurora 2002). A via intranasal também oferece vantagens em relação a outras vias de administração, por burlar o metabolismo de primeira passagem e prevenir degradação enzimática dos fármacos. Além disso, especialmente para a liberação de fármacos visando transporte ao SNC, vários estudos suportam o transporte através da cavidade nasal, tanto via mucosa que tem absorção aumentada para a circulação sanguínea e subsequentemente atravessa a BHE, quanto através dos nervos olfatório e trigêmeo, com acesso direto ao SNC (Gao 2016). Além disso, por ser um método não-invasivo, é uma alternativa às formulações injetáveis melhorando a aceitação do paciente (Sharma, Sharma et al. 2015), um aspecto particularmente importante em se tratando de pacientes com neurodegeneração. A adesão ao tratamento é aumentada também pela facilidade de administração e do baixo custo do sistema de administração (Prausnitz and Langer 2008). Para desenvolver uma formulação nasal com desempenho desejável e atributos comerciais, as propriedades físico-químicas do fármaco e dos componentes do sistema carreador devem ser considerados e adequados para o alvo pretendido (Aurora 2002). Ademais, de acordo com sistemas de liberação de BCP descritos na literatura, não existem nanopartículas de BCP com administração outra que a via oral, caracterização do seu tamanho e pretenção de aplicação no CNS (Santos, Oliveira et al. 2018).

1.6 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Tendo em vista a importância da busca de novos agentes terapêuticos para doenças neurodegenerativas, pretende-se desenvolver uma nanoformulação que module a neuroinflamação associada à essas patologias. Apesar da etiologia da neurodegeneração ser multifatorial e em muitos aspectos indefinida, a neuroinflamação é, em consenso, um fator em comum em relação tanto à causa quanto à consequência em múltiplos mecanismos neurodegenerativos. Buscando um método terapêutico que modifique a progressão da doença, a melhor estratégia é a atuação em múltiplos alvos farmacológicos. Nesse aspecto, o sistema endocanabinoide é extremamente proeminente por abranger uma multiplicidade de funções fisiológicas e sistemas, conferindo efeitos anti-inflamatórios e os neuroprotetores sinérgicos. Entretanto, há uma certa limitação na exploração desse sistema devido à psicoatividade mediada pelo receptor CB1. Neste contexto, um recurso alternativo promissor considera o uso de agonistas seletivos do receptor CB2. Este receptor, além de ser expresso no SNC, está intrinsecamente ligado ao sistema imunológico.

O agonismo do CB2 está associado à diversos mecanismos anti-inflamatórios, inclusive em vias neurodegenerativas. O sesquiterpeno β -cariofileno (BCP) foi escolhido por ser um canabinoide estruturalmente diferente dos canabinoides clássicos e se ligar seletivamente ao receptor CB2. Ele se destaca por ser o maior constituinte do óleo essencial (OE) da *Cannabis* spp., sendo encontrado em outras espécies vegetais e especiarias alimentícias. Adicionalmente, sua farmacologia é bem definida, com mecanismos moleculares anti-inflamatórios bem elucidados. Não obstante, a BHE dificulta a liberação da maioria dos agentes terapêuticos no SNC. Portanto, assume-se como relevante buscar na nanobiotecnologia ferramentas à otimização da liberação de fármacos. O uso de nanocarreadores oferece vantagens físico-químicas de superfície únicas que podem otimizar a liberação em múltiplas vias de administração. A via intranasal foi selecionada ao desenvolvimento da formulação por oferecer vantagens de absorção ao SNC, burlar o metabolismo de primeira passagem e por ser um método não-invasivo.

Nesse contexto, o presente trabalho considera que o β -cariofileno irá modular a neuroinflamação através do agonismo do receptor CB2, alterando citocinas inflamatórias fundamentais no processo da neurodegeneração. Além disso, assume-se que o uso de ferramentas nanotecnológicas irá potencializar o transporte do BCP através da BHE, bem como conferir atributos de liberação controlada no SNC. Portanto, o presente trabalho representa a primeira etapa do desenvolvimento e otimização de um protótipo terapêutico aplicado à neurodegeneração, i.e., um potencial bioproduto apto a ser testado em ensaios pré-clínicos de doenças neurodegenerativas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma formulação contendo nanopartículas de β -cariofileno como forma terapêutica de doenças neurodegenerativas, visando administração intranasal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver nanopartículas contendo β -cariofileno;
 - 1.1. Desenvolver nanopartículas de β -cariofileno com invólucro polimérico em meio aquoso;
 - 1.2. Desenvolver nanopartículas de β -cariofileno com diâmetro médio inferior a 200 nm;
2. Adequar a formulação contendo nanopartículas de β -cariofileno para administração intranasal;
 - 2.1. Formular nanopartículas com carga de superfície negativa (potencial zeta negativo);
 - 2.2. Formular nanopartículas com pH entre 5,5 e 6,5;
 - 2.3. Formular nanopartículas com caráter hipotônico;
3. Caracterizar a nanoformulação quanto suas características-físico químicas em relação à aplicação pretendida;
 - 3.1. Avaliar o tamanho médio e distribuição de tamanho das nanopartículas;
 - 3.2. Aferir a morfologia das nanopartículas de β -cariofileno;
 - 3.3. Quantificar a eficiência de encapsulação do β -cariofileno e teor ativo das nanopartículas;
 - 3.4. Estudar a estabilidade das nanopartículas em prateleira;
4. Caracterizar o comportamento das nanopartículas de β -cariofileno em meio biológico e determinar sua aptidão para testes pré-clínicos;
 - 4.1. Avaliar o perfil de liberação das nanopartículas de β -cariofileno em meio fisiológico;
 - 4.2. Estudar permeação das nanopartículas de β -cariofileno através da Barreira Hemato-Encefálica em relação ao seu perfil farmacocinético;
 - 4.3. Investigar interação das nanopartículas de β -cariofileno com material biológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O β -cariofileno, os polímeros e solventes utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St Louis, EUA). Com exceção de poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF, EUA), lecitina de soja (Lipoid S75-3N, Lipoid GmnH,EUA), água ultrapura em sistema Milli-Q (Millipore, EUA), *grids* de cobre revestidos com carbono (CF300 mesh-Cu, TED PELLA INC.,EUA), metanol grau HPLC (Synth, São Paulo, Brasil), tampão fosfato salino (PBS) (Gibco, Karlsruhe, Alemanha), polisorbato 80 (Neon, São Paulo, Brasil), dodecil sulfato de sódio (Nuclear, CAQ, Diadema, Brasil) e alginato de sódio (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil).

3.2 FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

3.2.1 Formulação de nanopartículas de BCP

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea (Miller, 1988). Inicialmente foi utilizado 10 ml de organosolvente na fase orgânica, contendo 0,1% de β -cariofileno; em seguida a fase orgânica era adicionada à fase aquosa contendo 0,4% de poloxamer sob agitação magnética (1.000 rpm). Os conteúdos de organosolventes nas formulações foram reduzidos em rotaevaporador (60°C, 100 rpm), seguido de ultrafiltração (0,22 μ m - Unifil, Carvalhaes, São Paulo, Brasil), sob vácuo, para obtenção de volume final de 10 mL. Durante o desenvolvimento do trabalho, os parâmetros foram otimizados alterando componentes e suas concentrações na formulação das nanopartículas de β -cariofileno. Cada alteração no processo é descrita nesta sessão dos resultados.

3.2.2 Determinação do pH e osmolaridade

O pH foi mensurado em potenciômetro (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e a osmolaridade foi determinada em osmômetro de pressão de vapor Wescor Vapro (EliTechGroup, Puteaux, França).

3.2.3 Caracterização morfológica

A morfologia da formulação foi determinada via microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (JEOL JEM-1011-100kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). Uma gotícula da formulação da nanopartícula foi depositada sobre *grid* de cobre revestido com carbono (CF-Cu, TED PELLA INC., EUA, 300

mesh). Após 24 h, uma gotícula de acetato de uranila 2 % (m/v) foi utilizada para corar a amostra, seguido de incubação (24h) em câmara escura e análise por TEM.

3.2.4 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta

O diâmetro médio e o potencial zeta das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em ângulo de 90 graus e anemometria laser Doppler, respectivamente, em aparato Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Os resultados do potencial zeta foram expressos como média dos valores de mobilidade eletroforética usando a equação de Smoluchowski.

3.2.5 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ativo

A eficiência de encapsulação e a determinação do teor de princípio ativo nas amostras utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Ultimate 3000 RS Thermo-Fisher Scientific, EUA), acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD). Os parâmetros para otimização da separação cromatográfica foram obtidos utilizando uma coluna C18 de fase reversa (FR -Thermo Scientific, 250 × 4,6 mm, 5 µm, 25 °C) acoplada a DAD, operando a 210 nm, 205 nm, 220 nm e 240 nm. As análises foram realizadas em um sistema isocrático constituído por acetoneitrila, metanol e água na proporção 8: 1: 1 (v/v/v) com um fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 15 min. Para cálculo do conteúdo do BCP, uma curva de calibração externa foi obtida (4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL, com equação da reta $y=0,361x-0,2046$, $r=0,9966$). Os teores de BCP nas nanoemulsões foram determinados a partir do cálculo da integral das áreas dos picos de interesse. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão, a partir de 3 injeções consecutivas/amostra.

A eficiência de encapsulação, descrita em porcentagem (%), foi estimada como a diferença entre a concentração (µg/mL) total de princípio ativo nas suspensões de nanopartículas e a concentração de princípio ativo presente no sobrenadante ultrafiltrado obtido pelo procedimento de ultrafiltração/centrifugação, usando dispositivos filtrantes Amicon (Ultracell100, 100 kDa, Millipore Corp., EUA).

3.2.6 Estudo de estabilidade

A estabilidade da formulação de nanopartículas foi determinada através de espalhamento múltiplo de luz (LUMiSizer) (LUM GmbH, Berlin, Germany) com varreduras ao longo do tempo para determinar estabilidade física, coloidal, interações entre partículas e tempo de vida

de prateleira. Os parâmetros utilizados para menor tempo de medição com base na velocidade máxima utilizável para simulação de 3 meses: tempo = 2,4 h, RCF = 2,4 xg, velocidade = 3025 rpm ($r = 88\text{mm}$), número de perfis = 255, intervalo = 34 s, fator de luz = 1 e temperatura = 20°C.

3.3 ESTUDOS *IN VITRO*

3.3.1 Cinética de liberação de ativo *in vitro*

As características de liberação das nanopartículas de BCP foram estudadas em meio de liberação fisiológico (PBS, pH 7, 37°C) pelo método de separação de amostra (SS) em 50 ml. As nanopartículas foram introduzidas no meio de liberação (100 µg/mL), à 37°C e sob agitação em equipamento Dubnoff. A liberação do ativo foi avaliada por amostragem do meio de liberação através de extração de alíquotas (10 mL) em intervalos regulares de tempo: 0 min; 45 min; 1,5 h; 3 h e 6 h.

A liberação do fármaco foi monitorada separando fisicamente as nanopartículas dos meios de liberação através de extração líquido-líquido (LLE), utilizando uma solução de clorofórmio: água na proporção 1: 2 (v/v) e tempo de partição de 1h. A fase organosolvente foi separada, evaporada *overnight* e o ativo ressuspendido em etanol (1 mL) e analisado por HPLC.

3.4 ESTUDOS *IN VIVO*

3.4.1 Farmacocinética e permeação da BHE

Ratos winstar machos (8-10 meses de idade) foram obtidos da *Douglas Mental Health University Institute Animal Facility* (Montréal, QC, Canadá) e alojados em gaiolas comuns, à $21 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo de luz 12/12 h e comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Gabinete de Conformidade Animal da *McGill University* e realizados de acordo com os regulamentos sobre bem-estar animal (protocolo # 2017-7911).

Os estudos de farmacocinética e permeação foram realizados medindo-se a concentração de BCP no sangue e fluido cerebrospinal (CSF), respectivamente, após administração de nanopartículas de BCP (I.V.). Para esta análise, a administração por via intranasal em ratos é inviável devido ao volume e concentração necessários para detecção do BCP. Portanto, sob anestesia com isoflurano (5%, v/v), os ratos foram tratados com nanopartículas de BCP (1 mg/kg) por via intravenosa. Em intervalos regulares (3, 5, 10, 30 min, 1, 2 e 3 h) após a administração dos tratamentos, 100 µL de CSF foram coletados de cada rato, por

punção direta da cisterna magna para análise de permeação. Adicionalmente, 500µL de sangue foram coletados através de punção da veia subclávia para análise farmacocinética. As amostras foram armazenadas à -80°C até serem analisadas por HPLC.

Previamente à análise cromatográfica, as amostras foram submetidas a protocolo de extração do ativo com adição de THF (1,25 mL), seguido de agitação (vortex), ultrassom (3 min) e partição com clorofórmio (1,25 mL) por 1 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (4°C, 4.000 rpm, 3 min), a fase organosolvente recuperada, evaporada em fluxo de N₂ e o ativo foi ressolubilizado em etanol (1 mL) e analisado via HPLC.

3.5 ESTUDOS *EX VIVO*

3.5.1 Cinética de ligação com proteínas plasmáticas

A cinética de ligação das nanopartículas de BCP com proteínas sanguíneas foi estudada através incubação destas (100 µg/mL) em sangue de rato, à 37°C e agitação em equipamento Dubnoff. Aliquotas (500 µL) de sangue foram retiradas em intervalos de tempo (0, 2,5, 5, 10, 20, 30 e 45 min) e submetidas protocolo de extração do ativo (item 3.4.1) e análise cromatográfica (HPLC).

3.6 Análise estatística

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise com auxílio dos programas Microsoft Office Excel (Comdex, Las Vegas, EUA) e GraphPad Prism 8 (San Diego, EUA). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FORMULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CARIOFILENO

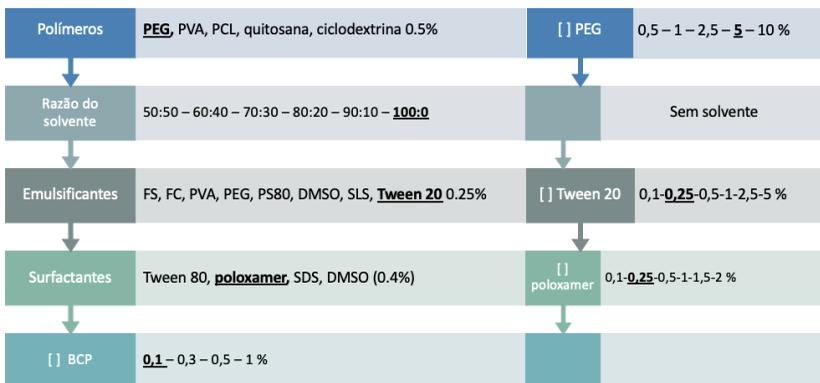
Para formular nanopartículas por emulsificação espontânea, são necessários alguns componentes fundamentais: uma fase orgânica (FO), na qual o composto lipofílico é dissolvido com uma molécula anfifílica; e uma fase aquosa (FA) com um tensoativo. A molécula anfifílica da FO é o que permite a formação da nanocápsula e por sua vez, permitirá sua dissolução na fase aquosa. A molécula anfifílica pode ser um fosfolípido, um ácido graxo ou um polímero. A natureza da molécula anfifílica é um dos fatores determinantes da classificação da nanopartícula (*eg.* nanoemulsão, nanocápsula, nanoesfera), sendo também altamente determinante à estabilidade da formulação, devido principalmente às características físico-químicas da sua superfície. Por exemplo, partículas carregadas (positivamente ou negativamente) possuem maior força de repulsão, diminuindo o fenômeno de coalescência causado pelo movimento browniano de fluidos (choque de contato) e atração de Van der Waals (Lewis 2000).

Outro parâmetro importante para estabilidade é o índice de polidispersão (PDI), cujos valores distribuem-se na amplitude entre 0 a 1, e mede a variação do tamanho das partículas. Esse valor é determinado pela proporção do desvio padrão e o tamanho médio das partículas. Índices mais próximos a 1 indicam alta variação de tamanho, enquanto aqueles mais próximos de 0 indicam maior uniformidade de tamanho (Danaei, Dehghankhold et al. 2018). A uniformidade é importante para a estabilidade das partículas devido ao fenômeno de degradação difusional (*Ostwald ripening*). Este fenômeno tende a agregar partículas apenas pela sua diferença de tamanho, formando partículas cada vez maiores e desestabilizando a formulação (Higuchi and Misra 1962). O PDI ideal varia de acordo com a finalidade da formulação, mas especialistas consideram valores de $PDI < 0,3$ desejáveis (Danaei, Dehghankhold et al. 2018). O tamanho das partículas também é idealizado a partir da finalidade da formulação. Por exemplo, o peso molecular estimado necessário para permear a BHE é menor que 600 Da, e os espaços entre suas junções oclusivas aproximadamente 200 nm (Jain 2012). Portanto, buscou-se formular partículas com tamanho menor que 200 nm. Além dos componentes da formulação pelo método de emulsificação espontânea, a energia de cisalhamento aplicada ao sistema influencia no tamanho das nanopartículas. Ela tem que ser maior que a área superficial * tensão superficial + calor interfacial para formar gotículas submicrométricas proporcionalmente menores (Ortiz 2007, Israelachvili 2011). Neste trabalho, utilizamos um potente agitador magnético, *i.e.*, 1.000 rpm. Mas para futuro escalonamento, outros métodos que impõem alta energia de cisalhamento podem ser utilizados,

como o estator-rotor (ultra-turrax) ou o homogeneizador de alta pressão industrial.

Portanto, a escolha das cápsulas anfífilas, surfactantes/emulsificantes e de suas proporções são um passo crucial no desenvolvimento de nanopartículas. Para otimização da formulação foram observados os parâmetros supracitados: baixo PDI, baixo tamanho médio de partícula e carga da partícula (potencial zeta). Foram testados diversos polímeros biocompatíveis (álcool polivinílico (PVA), policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG), e quitosana) e estudados os efeitos da composição da solução polimérica (sistema de solventes, concentração polimérica, adição de outros polímeros e/ou surfactantes, por exemplo) nas características das nanopartículas (tamanho de partícula, morfologia, estabilidade, propriedades de superfície). Este estudo permitiu otimizar e selecionar o melhor veículo de administração para o estudo (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma do processo de otimização da formulação de nanopartículas de BCP. Cada linha mostra o parâmetro avaliado, e o componente destacado foi utilizado para os testes subsequentes.



Fonte: A autora.

Em síntese, durante o processo de otimização, inicialmente, descartou-se a ideia de utilizar um ácido graxo para fazer uma nanoemulsão e foi feita a opção de utilizar nanocápsulas poliméricas. Posteriormente, descartou-se o PVA, PCL, quitosana e ciclodextrina como cápsulas poliméricas e polissacarídica para a nanopartícula. O PEG foi selecionado como componente estrutural da cápsula polimérica. Variou-se concentrações de PEG entre 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%, e finalmente a concentração de 5% foi selecionada. Diferentes proporções de FO:FA foram testadas até que optou-se por retirar o solvente da fase orgânica e

eliminar o passo de rotaevaporação, dissolvendo o BCP diretamente no PEG na FO. Para potencializar a solubilização do BCP na fase orgânica, diferentes emulsificantes foram testados (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, PVA, Tween 20, Tween 80, DMSO e SDS), entre os quais o Tween 20 foi escolhido como emulsificante na formulação de nanopartículas de BCP. Variou-se a concentração do emulsificante Tween 20 na FO entre 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5%, do qual a concentração de 0,25% foi elegida. Diversos surfactantes foram analisados na FA (Poloxamer, Polisorbato 80, DMSO, SDS, Tween 80), dos quais optou-se pelo Poloxamer P188. Ao definir as concentrações do surfactante (0,1; 0,25; 0,4; 0,5; 1; 1,5 e 2%), elegeu-se a concentração de 0,25%. Após definir a composição da formulação da nanopartícula de BCP, testou-se a capacidade máxima de ativo comportado pelo sistema (0,1; 0,3; 0,5 e 1%), foi verificado que a concentração de 0,1% apresentou as melhores características físico-químicas.

Isto é, em detalhe, primeiramente, devido à proposta da formulação e natureza lipofílica do composto, buscou-se um solvente compatível com o BCP e solúvel em água, para permitir a nanoencapsulação do ativo em meio aquoso. Dessa forma, primeiramente foi realizado teste de solubilidade e emulsificação do BCP em etanol, glicerol e água em diferentes proporções, visando determinar a base e proporções da formulação (Tabela 2). São estabelecidos como solventes para o BCP: etanol, PEG, clorofórmio e dicloroetano. Inicialmente optou-se pelo uso de etanol por ser menos tóxico, mais seguro para posterior evaporação e corriqueiramente utilizado em formulações deste tipo (Allen and Ansel 2013).

Tabela 2 - Composição em volume (μL) de formulações utilizadas em testes de solubilidade do BCP, conforme as proporções de etanol (EtOH), glicerol, água (H₂O) e poloxamer (polox). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

Formulação	BCP	EtOH	Glicerol	H ₂ O	Polox.	Homogeneização
TS1	9	-	1	-	-	Sim
TS2	9	1	-	-	-	Não
TS3	9	91	-	-	-	Sim
TS4	9	91	1	-	-	Não
TS5	18	91	-	-	-	Sim
TS6	18	91	1	100	-	Não

Formulação	BCP	EtOH	Glicerol	H2O	Polox.	Homogeneização
TS7	18	190	1	500	0,4%	Sim

Fonte: A autora.

Considerou-se que o ativo foi solúvel nos componentes em questão quando a mistura entre eles ficava homogênea, como solubilização ou emulsão. Observou-se que um volume pequeno de etanol não permitiu a solubilização do composto (TS2), enquanto um aumento de 10x daquele solvente (TS3) possibilitou a solubilização completa do ativo. A adição de 1% de glicerol na mesma formulação inviabilizou a solubilidade do sesquiterpeno (TS4). Testou-se então uma concentração maior (2x) de BCP no mesmo volume de etanol (TS5), logrando-se êxito. Entretanto, esta mistura não foi solúvel em água (TS6). Assim, optou-se por adicionar um tensoativo padrão à fase aquosa (poloxamer P188 0,4%), seguido da adição de BCP já dissolvido em etanol, obtendo-se uma pré-emulsão (TS7).

A partir da composição da pré-emulsão, fixou-se o parâmetro do tensoativo na fase aquosa (0,4% de poloxamer, m/v) e variou-se a concentração do emulsificante na fase orgânica, mantendo igual proporção do ativo e do emulsificante (0,2%, v/v), de modo a viabilizar a otimização através da variação de um parâmetro por vez (tipo de polímero, emulsificante FO, surfactante FA e suas respectivas concentrações).

Foram avaliadas nanoemulsões contendo lecitina de soja (fosfatidilcolina - NC1) e glicerol (NC2) como componentes da nanocápsula (Tabela 3). Estes componentes foram escolhidos por serem comumente utilizados em nanoemulsões, um pela similaridade com membranas bifosfolipídicas e o outro pela sua característica de ácido graxo e álcool, ambos associados a maior absorção sistêmica (de Villiers, Aramwit et al. 2008, Allen and Ansel 2013). A distribuição do tamanho de partículas mostrou-se bimodal e multimodal, com duas e três populações de partículas, respectivamente para NC1 e NC2. Isso indica a formação de micelas desprovidas do composto ativo, no caso de partículas muito pequenas, e a coalescência de partículas quando estas apresentam elevado tamanho. Os valores de PDI das nanoemulsões de BCP foram considerados elevados, sugerindo o uso de polímeros para encapsular o ativo, visando uniformizar e diminuir o tamanho das nanopartículas.

Tabela 3 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos em caracterização de nanoemulsões de BCP, indicando: parâmetro avaliado, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas.

	Parâmetro	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	PDI	Zeta (mv)
TS7	Emulsão básica	1494 ±136,3	100	1	-65±7
NC1	Fosfatidilcolina 0,2% + BCP 0,2%	143 ±140,9	93	0,410	-55±6
NC2	Glicerol 0,2% + BCP 0,2%	55,07 ±170,6	53 / 31/11	0,776	-55±7

Fonte: A autora.

Os polímeros foram selecionados de acordo com as características desejadas para a formulação final. Busca-se um material que seja biodegradável (quebra por hidrólise, enzimas, etc), bioeliminável (solúvel em água, excretável), não imunogênico (diminuindo a perda por fagocitose de macrófagos, i.e., efeito *stealth*) e que otimize a permeação e a absorção (Nair and Laurencin 2007, de Villiers, Aramwit et al. 2008, Kumari, Yadav et al. 2010, Nishiyama and Takemoto 2014). Conforme as características pretendidas, os seguintes candidatos foram selecionados para teste como cápsulas à nanopartícula. O PEG foi adotado por ser estabelecido como um polímero que tende a aumentar o tempo de circulação das partículas PEGiladas, e além disso, possui propriedades emulsificantes devido à sua natureza anfífila (Perry, Reuter et al. 2012). Ademais, o PVA também foi designado para testes também por seus atributos de atuar como emulsificante da formulação e como cápsula polimérica das nanopartículas. O terceiro polímero adotado foi a quitosana, pois esta confere às nanopartículas propriedade mucoadesiva, por carregar a superfície das mesmas com carga positiva. O último polímero elegido é a PCL, polímero amplamente utilizado em formas farmacêuticas também por conferir característica mucoadesiva, e conjuntamente, fornece caráter ácido para a formulação (Mazzarino, Otsuka et al. 2014). O caráter ácido é particularmente desejado devido ao potencial hidrogeniônico da mucosa nasal, que se encontra no intervalo de 5,5 a 6,5. Além de polímeros, também é possível encapsular ativos com uma espécie de carboidratos complexos com capacidade de formar complexos de inclusão em solução (Brewster and Loftsson 2007). Estas, denominadas

ciclodextrinas, já extensivamente empregadas em formas farmacêuticas, foram avaliadas sobre sua aptidão em encapsular o BCP.

Os resultados da variação de polímeros na concentração de 0,5% (m/v) na formulação estão demonstrados na Tabela 4. A formulação com PVA (N1) requereu aquecimento em banho maria (50°C) para sua solubilização na FA, sendo esta insolúvel na FO. O PEG 400 (N2) dissolveu rapidamente na FO, sendo o único polímero que possibilitou obter uma distribuição unimodal na população de nanopartículas. Já a PCL (N3) exigiu adição de clorofórmio à FO para sua completa dissolução (1:1, v/v). A quitosana é um polissacarídeo acetilado solúvel em água, sob pH ácido. Portanto, 3 condições de acidificação foram investigadas a sua solubilização: N4 acidificada com ácido cítrico (pH 4), N6 acidificada com HCl 0,001% (v/v, pH 2) e, por fim, N7 adicionada de 0,5% (v/v) de PEG, o polímero que obteve sucesso na formulação N2 como co-polímero. Todavia, após 36 h sob agitação magnética, não se constatou solubilização completa da quitosana na FA, impedindo também a análise de caracterização do sistema nanoderivado. Já a formulação de β-ciclodextrina (N5), foi testada principalmente pela pré-existência na literatura de complexos de inclusão com ciclodextrina e BCP. Entretanto, seu tamanho médio foi muito grande, com distribuição multimodal e PDI altos, não caracterizando parâmetros desejáveis para a formulação pretendida.

Tabela 4 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos em caracterização de formulações variando o polímero (0,5%) na composição nanopartículas de BCP. Tabela indicando: polímero, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.) índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	Polímero	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	Pop.	PDI	Zeta (mV)
N1	PVA	262,2±69,33	94	2	0,194	-28±6
N2	PEG	278,8±91,12	100	1	0,171	-45±7
N3	PCL	285±129,4	98	3	0,418	-65±7
N5	B-CD	299,3±128,9	87	3	0,492	-68±6

Fonte: A autora.

O PEG em concentrações até 5% (v/v) em formulações farmacêuticas foi associado com maximização do tempo de circulação de nanopartículas, devido às suas propriedades furtivas (*stealth*) em relação ao sistemas atelido endotelial (Perry, Reuter et al. 2012). Por conseguinte, foram avaliadas diferentes concentrações de PEG (0,5; 1; 2,5; 5 e 10%, v/v) na FO (Tabela 5). Para a escolha da concentração daquele poliol, inicialmente descartaram-se as formulações que apresentaram mais de uma população de partículas (distribuição diferente de 100%), a saber: N2 (0,5%), N9 (2,5%) e N11 (10%). Posteriormente, ao comparar as formulações N8 (1%) e N10 (5%), pode-se observar que apesar da média do tamanho de partícula da N8 ser maior, seu desvio padrao foi menor e o PDI também, evidenciando maior uniformidade de partículas.

Tabela 5 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos em caracterização de formulações variando a concentração do polímero escolhido (PEG 400) na composição nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem de PEG, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	PEG (%)	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	PDI	Zeta (mV)
N2	0,5	278,8±	100	0,171	-45
N8	1	96,17±	54	0,524	-53
N9	2,5	116,9±68,34	100	0,220	-49±8
N10	5	166,6±51,7	100	0,015	-45±9
N11	10	124,6±76,41	98	0,214	-46±8

Fonte: A autora.

Em função dos resultados observados, foram estabelecidas a FO com etanol e PEG (5%, v/v) e a FA contendo 0,4% (m/v) de poloxamer, na proporção de 1: 1 para os estudos subsequentes. Variou-se então a proporção de FO: FA (Tabela 6). Ao avaliar os parâmetros obtidos com a variação do solvente, observou-se que todas as nanopartículas apresentaram tamanho de partícula muito baixo e PDI alto, o que indica alta variação no tamanho das partículas, inclusive formação de micelas sem ativo. Cogitou-se a possibilidade de que o ativo poderia estar

sofrendo modificações durante o processo de rotaevaporação do solvente. Em virtude às características observadas nas formulações de N10 a N15, nenhuma delas foi selecionada para testes subsequentes e uma nova estratégia de formulação foi empregada.

Tabela 6 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando razão entre solventes (etanol e água) na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: razão entre FO:FA (proporção), média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta).

	Razão FO:FA	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	PDI	Zeta (mv)
N10	50 : 50	166,6±51,7	100	0,015	-45±9
N12	60 : 40	78,89±22,54	54	0,436	-48±7
N13	70 : 30	61,65±143	43	0,402	-41±7
N14	80 : 20	75,12±11,43	49	0,273	-8±7
N15	90 : 10	74,86±64,76	57	0,603	-8±7

Fonte: A autora.

Para além da alta viscosidade do PEG 400, este poliol solubiliza o BCP, sendo a solução resultante solúvel em água. Portanto, ao invés de utilizar etanol como solvente orgânico na FO, o BCP foi dissolvido diretamente no PEG, seguido da adição da FO à FA padrão (N16). Tentativamente, a adição de um emulsificante e etanol em baixa concentração na FO (N17) foi investigada. Embora nenhuma das duas formulações tenham apresentado resultados otimizados na caracterização físico-química, o fato de retirar o processo de rotaevaporação melhorou a formulação, e esta estratégia de formulação foi utilizada para os testes subsequentes (Tabela 7). Sugere-se que a não-adição de solventes orgânicos e não aquecimento da formulação podem ter contribuído para suas melhores características físico-químicas. De modo que o processo de adição de organosolventes e subsequente rotaevaporação dos mesmos foi retirado do processo de nanoencapsulação, levando à diligência de recursos distintos para a composição da FO e solubilização do BCP.

Tabela 7 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos retirando solventes orgânicos na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: parâmetro alterado, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta).

	Parâmetro	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	Pop	PDI	Zeta (mV)
N16	PEG:FA	379,4±132,5	98	2	0,194	-36±3
N17	Lecitina 0,25% EtOH 0,25%	244,5±100,1	75	3	0,412	-48±6

Fonte: A autora.

Com a remoção dos organosolventes da FO, foram testados diferentes emulsificantes (0,25%) junto com o PEG na FO para otimizar a formulação de BCP (Tabela 8). Estes co-emulsificantes avaliados foram: fosfatidilcolina (N17), fosfatidilserina (N18), PVA (N19), Tween 20 (N20), Tween80 (N21), polissorbato 80 (N22), DMSO (N23) e SDS (N24). A formulação sem um co-emulsificante, contendo somente PEG na FO foi colocada como comparativo na tabela (N16). As duas formulações com fosfolipídeos (N17 e N18) foram testadas por possuir similaridade com membranas celulares, o que lhes confere propriedade de absorção facilitada em meios biológicos (Jaiswal, Dudhe et al. 2015). Entretanto, a adição de fosfolipídeos na formulação de BCP não gerou nanopartículas dentro dos parâmetros requeridos. Ambas formulações (N17 e N18) aumentaram consideravelmente o tamanho de partícula em relação ao que era obtido com uso de organosolventes. Além disso, a formulação contendo fosfatidilcolina (N17) apresentou PDI alto, indicando presença de múltiplas populações de partículas. Similarmente, a formulação com PVA como co-polímero emulsificante (N19) aumentou muito o tamanho de partícula, quase o dobro do tamanho requerido para os propósitos deste trabalho. Já a formulação com Tween 20 (N19) apresentou os melhores parâmetros, com tamanho de partícula menor que 200 nm, desvio e PDI baixos, ilustrando distribuição unimodal do tamanho de partículas. Já as formulações contendo Tween 80 (N21) e polissorbato 80 (N22) apresentaram distribuição de partícula em múltiplas populações. Seu PDI alto e desvio baixo sugerem a formação de micelas sem ativo e também a coalescência de partículas. As formulações com DMSO (N23) e SDS (N24) apresentaram distribuição unimodal e PDI reduzido, porém tamanho de partícula superior a 400 nm. Assumindo-se como uma das finalidades da

formulação a permeação da BHE, o tamanho da nanopartícula deverá ser inferior a 200 nm.

Tabela 8 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando o emulsificante (0,25%) na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: emulsificante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	Emulsificante	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	Pop	PDI	Zeta (mv)
N16	PEG	379,4±	98	2	0,194	-36
N17	Fosfatidilcolina	244,5±	75	3	0,412	-48
N18	Fosfatidilserina	258±	100	1	0,076	-38±6
N19	PVA	422,7±168,7	96	2	0,276	-17±4
N20	Tween 20	182,2±70,24	100	1	0,096	-25±6
N21	Tween 80	40,51±93,03	74	3	1	-10±5
N22	Polissorbato 80	52,48±92,46	75	2	0,380	-32±4
N23	DMSO	435,9±123,3	100	1	0,122	-36±5
N24	SDS	421±95,43	100	1	0,061	-32±4

Fonte: A autora.

Com o objetivo de otimizar a formulação, variou-se a concentração do emulsificante Tween 20 na FO (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5%) (Tabela 9). É possível constatar que com o aumento da concentração de Tween também aumenta gradualmente o tamanho de partícula. Além disso, as concentrações mais altas, 2,5% (N27) e 5% (N28) tiveram distribuição multimodal, tamanho de partícula e PDI mais altos. Isso indica que em concentrações maiores que 2,5% de emulsificante pode não haver nanoencapsulação eficiente, e sim emulsificação e formação de micelas variadas. As únicas concentrações com tamanho de partícula menores que 200 nm foram 0,1% (N29) e 0,25% (N20). Apesar de N29 ter apresentado tamanho menor que N20, ela apresentou distribuição bimodal e PDI mais alto, isto impacta negativamente na estabilidade das partículas. Similarmente, as

concentrações de 0,5% (N25) e 1% (N26) tiveram PDI menor que N20, mas tamanho de partículas maior do que 200 nm. Portanto, por ser a única formulação que apresentou tamanho menor que 200 nm, distribuição unimodal e PDI baixo, a concentração de 0,25% (N20) foi selecionada para os testes subsequentes.

Tabela 9 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando o a concentração do emulsificante Tween 20 na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem de emulsificante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	Emulsificante (%)	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	Pop	PDI	Zeta (mV)
N29	0,1	164,4±69,77	98	2	0,171	-25±5
N20	0,25	182,2±70,24	100	1	0,096	-25±6
N25	0,5	204,4±67,03	100	1	0,068	-20±6
N26	1	243,1±88,16	100	1	0,096	-22±6
N27	2,5	321±610,5	17	3	0,409	-17±7
N28	5	1053±472	13	2	0,396	-17±3

Fonte: A autora.

Com a escolha do polímero, emulsificante e suas respectivas concentrações, i.e. PEG (5%) e Tween 20 (0,25%), os parâmetros sujeitos à otimização na FO estavam definidos. Portanto, variou-se o único parâmetro da FA: o surfactante. Lembrando que para todos os testes anteriores, foi utilizado um surfactante na FA, sempre o mesmo e na mesma concentração (poloxamer 0,4%). Desta maneira, cinco surfactantes diferentes foram avaliados na mesma concentração (0,4%): poloxamer (N20), polissorbato 80 (N30), DMSO (N31), SDS (N32) e Tween 20 (N33). Os resultados dos parâmetros obtidos variando os surfactantes na FA estão demonstrados na tabela 10. Inicialmente, as formulações que apresentaram distribuição de partículas multimodal já foram descartadas, no caso polissorbato 80 (N30), SDS (N32) e Tween 20 (N33). De modo que apenas as formulações contendo poloxamer (N20) e DMSO (N31) exibiram parâmetros almejados na caracterização

e com diferença numérica irrelevante entre os dois. Por isso, a escolha do surfactante foi realizada com base nas propriedades químicas que cada surfactante forneceria à formulação. O DMSO (N31) é associado com certo nível de toxicidade celular. Como a finalidade da formulação é para uso a longo prazo, mesmo em níveis seguros, optou-se por utilizar o surfactante mais inerte (poloxamer) (N20). Consequentemente, N20 foi selecionada para os testes subsequentes.

Tabela 10 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando surfactantes (0,4%) na fase aquosa na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: surfactante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio padrão), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio padrão zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	Surfactante	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	Pop	PDI	Zeta (mv)
N20	Poloxamer	182,2±70,24	100	1	0,096	-25±6
N30	Polissorbato 80	150,9±41,57	80	3	1	-20±4
N31	DMSO	156,7±52,73	100	1	0,097	-22±6
N32	SDS	249,7±83,94	98,7	2	0,155	-63±8
N33	Tween 80	39,01±69,75	63	2	1	-21±5

Fonte: A autora.

Ao definir o poloxamer como surfactante, variou-se sua concentração na FA (0,1; 0,25; 0,4; 0,5; 1; 1,5 e 2%) para definir a formulação que apresentava os melhores parâmetros (Tabela 11). Todas as concentrações apresentaram ótimas características, i.e., tamanho de partícula menor que 200 nm, desvio padrão reduzido e valores de PDI baixos. Considerando os resultados obtidos, N38 foi escolhida aos ensaios subsequentes em função de seu valor de PDI, o qual indica maior uniformidade no tamanho das partículas.

Tabela 11 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando a concentração do surfactante Poloxamer (Kolliphor P188) na fase aquosa na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem do surfactante, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de

polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	Surfactante (%)	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	PDI	Zeta (mV)
N39	0,1	137±	100	0,121	-23±7
N38	0,25	147,2±	100	0,052	-24±7
N20	0,4	182,2±70,24	100	0,096	-25±6
N34	0,5	154,3±55,13	100	0,097	-15±7
N35	1	174,9±60,7	100	0,086	-14±4
N36	1,5	186,7±60,39	100	0,079	-15±6
N37	2	206±66,6	100	0,088	-13±4

Fonte: A autora.

Após definir a composição da formulação da nanopartícula de BCP, testou-se a capacidade máxima de ativo comportado pelo sistema (Tabela 12). Até então, todas as formulações contiveram 0,1% de BCP na FO. Para este teste, duas estratégias foram adotadas: inicialmente, aumentou-se somente a porcentagem de BCP no sistema 0,1% (N38), 0,3% (N40), 0,5% (N41), 1% (N42), mantendo todos os outros parâmetros do sistema idênticos. Entretanto, constatou-se que o tamanho das partículas aumentou consideravelmente e gradualmente proporcional conforme o aumento de concentração. Com isso, testou-se uma segunda estratégia, aumentando a concentração de emulsificante na FO na mesma proporção que se aumentava o BCP. Por exemplo, se a concentração de BCP aumentou 3x, (0,1 para 0,3%), a concentração de Tween 20 aumenta na mesma proporção (0,25 para 0,75%). As mesmas concentrações de BCP foram testadas, mas com concentrações maiores de Tween, de modo que 0,1% de BCP tem 0,25% de Tween (N38); 0,3% de BCP tem 0,75% de Tween (N43); 0,5% de BCP tem 1,25% de Tween (N44); e 1% de BCP tem 2,5% de Tween (N45). Esta nova estratégia (N43 a N45) melhorou consideravelmente os parâmetros obtidos na caracterização. O tamanho de partícula não aumentou como na primeira estratégia. Entretanto, estas formulações (N43 a N45) apresentaram PDI mais alto e distribuição bimodal, inviabilizando sua escolha. Logo, a formulação N38, com 0,1% de BCP e 0,25% de Tween 20 apresentou as melhores características físico-químicas e foi estabelecida para os testes subsequentes.

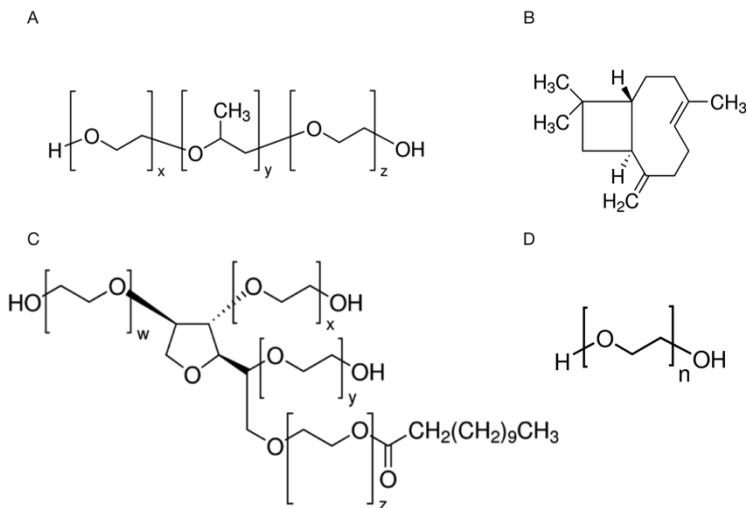
Tabela 12 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando a concentração do ativo BCP na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela indicando: porcentagem de BCP, porcentagem de Tween20, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta). Formulação destacada utilizada para os testes subsequentes.

	BCP (%)	Tween (%)	BCP (mg)	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	PDI	Zeta (mV)
N38	0,1	0,25	11	147,2±43,83	100	0,052	-24±7
N40	0,3	0,25	25	237±133,2	93	0,209	-20±3
N41	0,5	0,25	45	334,7±47,74	100	0,700	-18±7
N42	1	0,25	90	365,1±47,49	100	1	-15±3,5
N38	0,1	0,25	11	147,2±43,83	100	0,052	-24±7
N43	0,3	0,75	25	214,3±98,95	100	0,137	-16±3
N44	0,5	1,25	45	182,6±93,46	99	0,159	-17±4
N45	1	2,5	90	167,9±93,62	93	0,266	-11±5

Fonte: A autora.

A composição final da formulação de nanopartículas de BCP foi a N38. Sua fase orgânica (FO) composta por Tween 20 (0,25%), BCP (0,1%) e PEG 400 (5%); e fase aquosa (FA) composta por água ultrapura e poloxamer P188 (0,25%) com volume final de 10mL. O tempo de agitação entre a adição de cada composto foi de 10min, sob agitação de 1000 rpm. A estrutura química dos componentes está ilustrada na figura 2.

Figura 2 - Estrutura química dos componentes finais das nanopartículas de BCP. A- Poloxamer P188, B- BCP, C- Tween20, D- PEG400.



Fonte: PubChem, com modificações pela autora.

4.1.1 Adequação da formulação para administração intranasal

Para otimizar a formulação para administração intranasal, alguns parâmetros foram otimizados. A mucosa nasal possui um potencial hidrogeniônico inferior ao pH fisiológico, de modo que a formulação à administração nasal deve apresentar valores de pH no intervalo de 5,5 a 6,5. Ressalta-se que ácidos fracos como constituintes da formulação otimizam a absorção desta. Ademais, uma solução de administração mucosa deve ser idealmente hipotônica para hidratar a mucosa e permitir a absorção do ativo. O princípio ativo também não deve ultrapassar 1% da formulação e seu peso molecular deverá ser, no máximo, de 300 kDa. O volume de administração situa-se, em média, em 100 μ L (25-200 μ L) por narina. A área da mucosa nasal é estimada em 180 cm^2 (Kushwaha, Keshari et al. 2011, Allen and Ansel 2013), uma informação importante ao cálculo das doses de administração.

A presença de uma camada de muco que cobre a superfície intranasal também pode ser visada para desenvolver formas de dosagem mucoadesivas que permanecem no local de administração por tempos prolongados, aumentando a biodisponibilidade local e sistêmica da droga administrada (Sosnik, das Neves et al. 2014). Esta característica

pode ser conferida à nanopartícula com modificação da superfície da nanocápsula com adição de radicais mucoadesivos. Por isso, 4 grupos radicais mucoadesivos foram adicionados: quitosana (N46), alginato de sódio (N47), polivinilpirrolidona (PVP) (N48) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (N49), com resultados demonstrados na tabela 12. A quitosana já havia sido testada anteriormente, mas como cápsula polimérica, não como grupamento radical de superfície. Desta vez, ela foi adicionada na concentração de 0,1% na FA, sendo que sua dissolução foi feita *overnight* antes da preparação da formulação e filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm, o que finalmente permitiu sua dissolução na formulação. O alginato de sódio (N47) também foi dissolvido na FA (1%), mas sua viscosidade é muito alta e também apresentou dificuldades na sua dissolução. A PVP (N48) foi testada por ser inerte em humanos, e possuir propriedades conservantes e umidificantes (Ahmad, Ahmad et al. 1995). Finalmente, a HPMC (N49) foi selecionada por ser um excipiente comercial e um componente de entrega controlada em medicamentos orais, devido à sua capacidade de formar filmes, viscosidade e estabilidade (de Silva and Olver 2005).

Os resultados exibidos na tabela 13 demonstram os parâmetros obtidos na caracterização das nanopartículas com radicais mucoadesivos; Com exceção da formulação com alginato (N48), na qual o tamanho de partícula ficou micrométrico e o PDI muito próximo de 1, portanto não houve formação de nanopartículas. Provavelmente isso ocorreu devido à alta viscosidade causada pelo alginato, o que deve ter diminuído a força de cisalhamento e impedido a formação de nanopartículas. Os parâmetros

na caracterização das nanopartículas contendo quitosana (N46), PVP (N48) e HPMC (N49) numericamente estão dentro do almejado, entretanto, visualmente as formulações ficaram transparentes e não-perolada, o que indica que não houve nanoencapsulação do ativo. Dessa forma, o tamanho pequeno de partículas observado deve ser pela formação de micelas com quitosana, e não nanopartículas de BCP.

Com a fórmula final da nanopartícula (N38), todas as propriedades já haviam sido otimizadas para aumentar a absorção. Visto que a cápsula PEGilada já possui propriedades de aumentar a permeação, a carga de superfície estava negativa e tamanho de partícula menor que 200 nm, considerou-se que estas características físico-químicas já seriam suficientes para otimizar a absorção do ativo, visto que ativos lipofílicos ionizados são transportados através da via paracelular. Por fim, decidiu-se não adicionar um grupamento radical mucoadesivo e manter a formulação final original, N38.

Tabela 13 - Demonstrativo dos parâmetros obtidos variando a grupos radicais mucoadesivos na fase orgânica na formulação de nanopartículas de BCP. Tabela

indicando: aditivo, média de tamanho de partícula (tamanho médio), desvio padrão do tamanho médio de partícula (desvio), distribuição do tamanho de partículas (dist.), número de populações de partículas (pop.), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (zeta), e desvio padrão do potencial zeta (desvio zeta).

	Aditivo	Tamanho médio (nm)	Dist. (%)	Pop	PDI	Zeta (mV)	Aspecto Visual
N46	Quitosana	118,8±	100	1	0,117	-20±6	Transparente
N47	Alginato	1520±471,6	98,6	2	0,960	-62±6	Transparente
N48	PVP	177,9±64,75	100	1	0,088	-11±6	Opaco
N49	HPMC	246,9±99,94	100	1	0,124	-19±7	Opaco

Fonte: A autora.

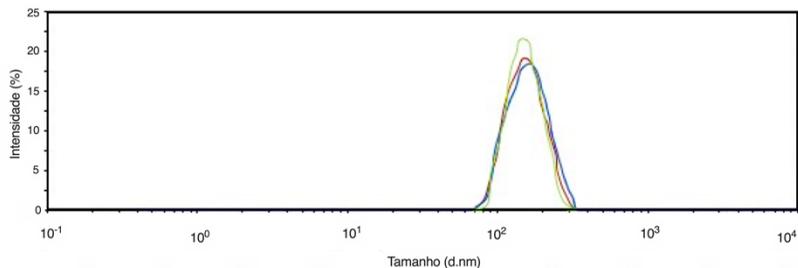
A formulação N38 foi então avaliada quanto ao seu pH e osmolaridade para verificar se atenderia aos requisitos necessários à administração nasal. O pH de uma formulação de interesse é importante para evitar a irritação da mucosa nasal, o crescimento de bactérias patogênicas, manter a funcionalidade da formulação inalterada e sustentar o movimento ciliar fisiológico normal (Aurora 2002). O pH da formulação N38 foi de $6,20 \pm 0,05$ e a osmolaridade de $150 \text{ mmol/kg} \pm 35,36$. Valores menores que 280 mmol/kg são considerados hipotônicos em relação à osmolaridade plasmática clássica (Allen and Ansel 2013). Esses resultados corroboram a adequação das nanopartículas de BCP para administração nasal com potencial para absorção otimizada, devido ao pH levemente ácido e hipotonicidade da formulação.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO NANOMATERIAL

4.2.1 Tamanho de partícula

A caracterização físico-química da nanopartícula final (N38) foi realizada por análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Destacando que esta formulação é composta em sua fase orgânica (FO) por Tween 20 (0,25%), BCP (0,1%) e PEG 400 (5%); e fase aquosa (FA) composta por água ultrapura e poloxamer P188 (0,25%), como supramencionado e ilustrado na figura 1. O tamanho médio de partícula obtido por DLS da formulação N38 foi $147,2 \text{ nm} \pm 43,83$, considerado adequado à permeação da BHE por ser inferior a 200 nm. Além disso, o valor de PDI (0,052) sugere distribuição monodispersa de partícula, como mostrado na figura 3.

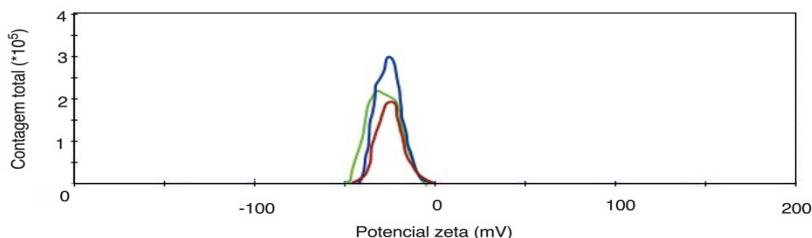
Figura 3 - Distribuição do tamanho de partícula analisado por DLS.



Fonte: A autora.

O potencial zeta desempenha um papel importante na estabilidade das nanoemulsões, pois reflete a carga superficial das partículas. O valor do potencial zeta para as nanopartículas de BCP foi de $-24,5 \pm 6,86$ (Figura 4). A redução da carga de superfície ser atribuída aos componentes emulsificantes e surfactantes da formulação, tanto ao poloxamer quanto ao tween 20, que é zwitteriônico, e o com o pH levemente ácido, pode ter sido anionizado. Este valor, altamente negativo, contribui à estabilidade da formulação, aumentando a repulsão eletrostática entre as partículas. Para as partículas carregadas, esta força surge de uma camada superficial difusa e altamente móvel de contra-íons. Existe uma repulsão exponencial na compressão de origem entrópica, uma vez que os contra-íons desejam reter sua mobilidade translacional (Israelachvili 2011).

Figura 4 - Representação gráfica do potencial zeta obtido por DLS.



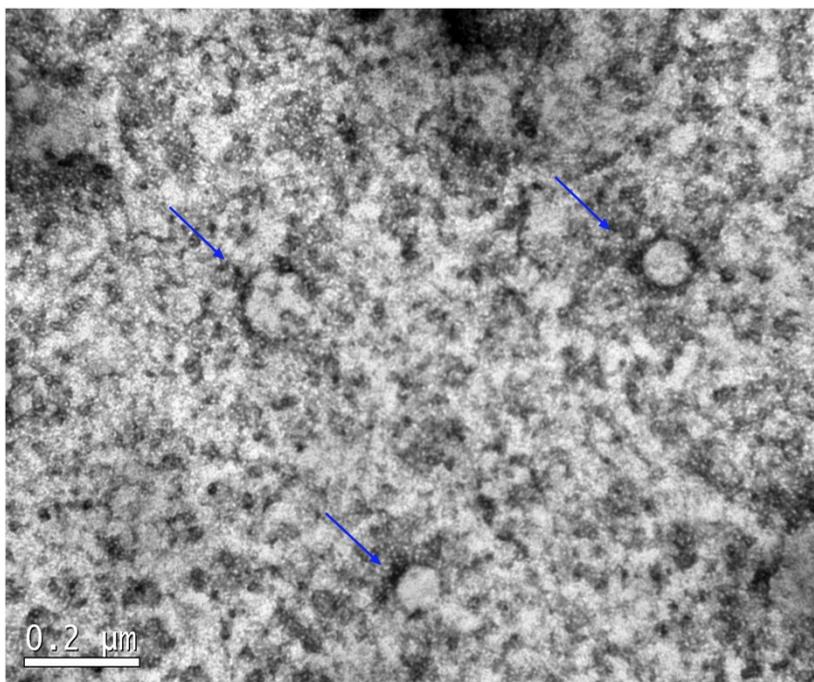
Fonte: A autora.

Em seu conjunto, os resultados de caracterização físico-química da formulação das nanopartículas de BCP revelam propriedades positivas sobre a estabilidade e absorção adequada destas à finalidade pretendida.

4.2.2 Morfologia

É de suma importância que os resultados da caracterização físico-química sejam corroborados por avaliação morfológica das nanopartículas. Esta análise visual garante que as nanopartículas estão, de fato, de acordo com os resultados obtidos por DLS, bem como revela detalhes morfológicos destas. A micrografia resultante da análise por TEM (Figura 5) ilustra 3 nanopartículas em detalhe (aumento 5.000 x), com raio menor que 150 nm, o que condiz com a análise prévia por DLS. Ademais, as partículas são distintamente circulares e parecem impelir maior deposição de cristais de uranila (visualizados por todo o fundo da imagem) ao redor de sua superfície (mais escuro), que estão indicadas por flechas azuis.

Figura 5 - Caracterização morfológica das nanopartículas de BCP (N38) por microscopia eletrônica de transmissão.



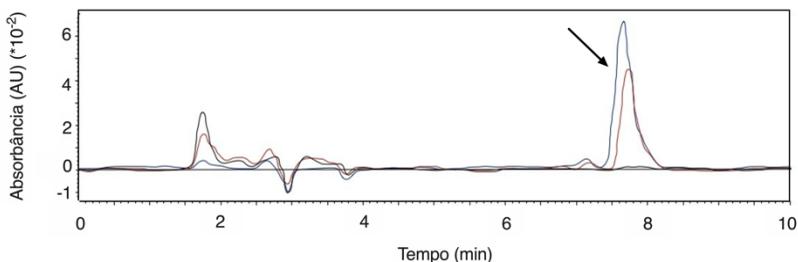
Fonte: A autora.

4.2.3 Eficiência de encapsulação e teor do composto ativo

A análise de eficiência de encapsulação foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A eficiência de encapsulação (%) é estimada como a diferença entre a concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$) total de princípio ativo nas suspensões de nanopartículas e a concentração de princípio ativo presente no sobrenadante obtido pelo procedimento de ultrafiltração/centrifugação, usando dispositivos filtrantes.

A eficiência de encapsulação foi $98\% \pm 2$ para as nanopartículas de BCP, um valor elevado e que apresenta relação com a baixa afinidade do ativo pela fase aquosa (externa). Além disso, a eficiência de recuperação de teor ativo foi igual a $68\% \pm 4,5$, indicando que 68% da concentração inicial de BCP na formulação foram recuperados após o processo de nanoencapsulação. Essa perda de ativo ocorre no processo de nanoencapsulação e se mostrou homogênea, sendo atribuída à afinidade do ativo com os componentes e alta viscosidade dos mesmos, resultando em resquícios nos materiais de preparação de nanopartículas. Não obstante, o valor elevado de eficiência de encapsulação ilustra a adequação dos parâmetros da formulação. A figura 6 apresenta os cromatogramas do padrão analítico de BCP (azul), da nanopartícula de BCP total (vermelho) e da nanopartículas de BCP livre (preto), sendo o pico de BCP aproximadamente no tempo de retenção (RT) 7,8 min, indicado por uma seta.

Figura 6 - Cromatograma ilustrando padrão analítico de BCP (azul), nanopartículas de BCP total (vermelho) e nanopartícula de BCP livre (preto).



Fonte: A autora.

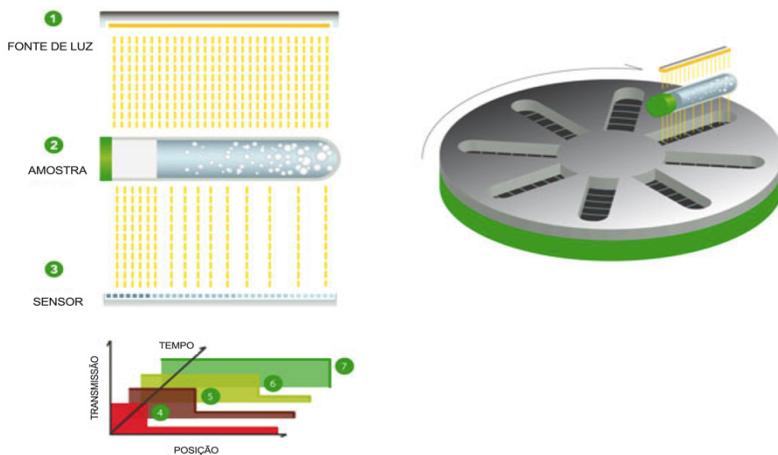
4.2.4 Estabilidade

A estabilidade da formulação foi determinada adotando-se o método de estabilidade acelerada, que prevê o prazo de validade de

dispersões na concentração original em minutos/horas, ao vez de meses/anos. Neste ensaio, foi simulada a estabilidade acelerada da formulação equivalente a 3 meses. Os resultados obtidos correlacionam-se bem com o comportamento da amostra em gravidade normal. A tecnologia STEP® utilizada nesta análise permite obter Perfis de Extinção com Espaço e Tempo (STEP) resolvidos em toda a faixa de amostras *in situ*. A fonte de luz paralela à célula de amostra é transmitida e detectada, sendo a radiação transmitida convertida em extinção e a concentração de partículas calculada com o auxílio do Software SEPView (LUM GmbH, Berlin, Germany). Os fenômenos de desprendimento são quantificados em relação à velocidade de clarificação e índice de instabilidade, velocidade de sedimentação e flotação das partículas, turbidez residual, volume de fase separado (líquido ou sólido), consolidação de sedimentos ou desidratação.

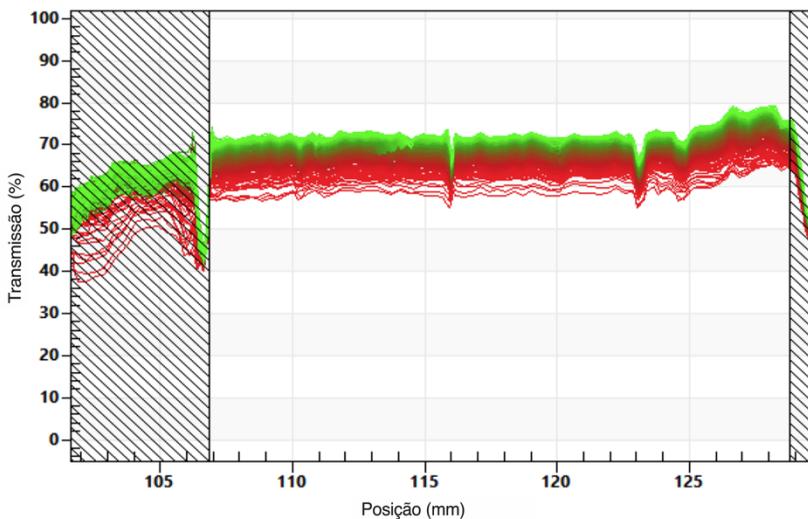
A figura 7 representa o funcionamento do ensaio de estabilidade acelerada. A migração de partículas devido à força centrífuga resulta em uma variação da concentração local de partículas e, correspondentemente, ocorrem variações locais e temporais de transmissão. A evolução cinética das partículas é documentada por uma sequência dos respectivos perfis de transmissão (transmissão versus posição dentro da amostra), coletados após intervalos de tempo selecionados. Nos perfis de transmissão resolvidos na dimensão espaço-tempo, o menisco é caracterizado pelo mergulho do lado esquerdo (108 mm) e o fundo da célula do lado direito (128 mm), como ilustrado no resultado do perfil de transmissão (Figura 8). Os dados de uma análise podem ser reduzidos a uma única curva por uma integração adequada de cada um dos perfis de transmissão, i.e., a integral de transmissão (Figura 9). Um segmento horizontal da curva indica que o sistema coloidal em consideração não se altera em relação ao seu perfil de transmissão, no intervalo de tempo considerado. A curvatura representa a integral da cinética das partículas capturada no perfil de transmissão, traçada até a sedimentação ou formação de *creaming*, como no presente caso.

Figura 7 - Representação do ensaio de estabilidade acelerada utilizando tecnologia STEP.



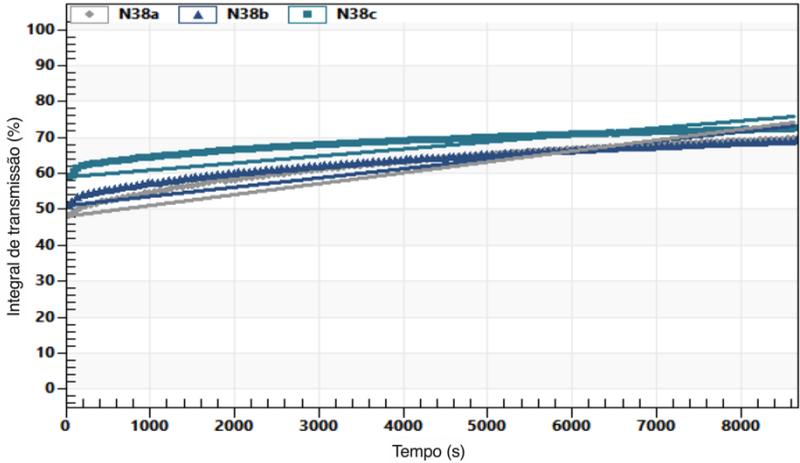
Fonte: LUM GmbH (com modificações).

Figura 8 - Perfil de transmissão de nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.



Fonte: A autora.

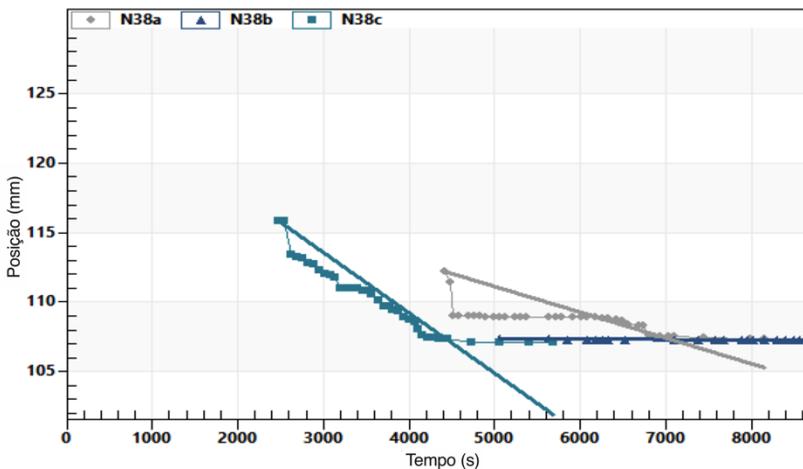
Figura 9 - Integral da transmissão de nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.



Fonte: A autora.

Para os fenômenos de separação de fases, os resultados gráficos observados ilustram o movimento entre a interface e a fase dispersa, em função do tempo. A posição do limite de fase é calculada ao longo do valor limite fornecido (% transmissão). Para isso, utiliza-se um modelo computacional com um algoritmo para o acompanhamento da evolução dinâmica do fluido, chamado *front-tracking* (Unverdi and Tryggvason 1992). Este algoritmo de avaliação é apropriado para sistemas dispersos com limites de fase claramente definidos e com partículas representando a interface. Os elementos da interface são movidos com a velocidade do fluido sobre uma malha de fluxo. Nos métodos de *front-tracking*, a interface (partículas) é marcada e traçada por um conjunto de pontos conectados formando uma malha menor que se move sobre a malha fixa no espaço. A vantagem deste tipo de método é a capacidade de localizar exatamente a posição da superfície livre. Para cada ponto no gráfico é calculada a distância do valor de intervalo definido. A figura 10 representa uma análise de *front-tracking* e ilustra o fenômeno de *creaming*, no qual a posição absoluta do limite de fase diminui com o tempo, enquanto a interface é detectada movendo-se em direção ao topo da célula de amostra. Com a sedimentação das nanopartículas, o oposto ocorre e a posição absoluta do limite de fase aumenta com o tempo (Estacio 2008).

Figura 10 - *Front tracking* das nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.



Fonte: A autora.

A estabilidade física das dispersões, como suspensões ou emulsões, é caracterizada pela classificação e quantificação do comportamento de separação devido à sedimentação, *creaming*, flotação, coalescência, degradação difusional, ou inversão de fase, por exemplo, como ilustrado na figura 11.

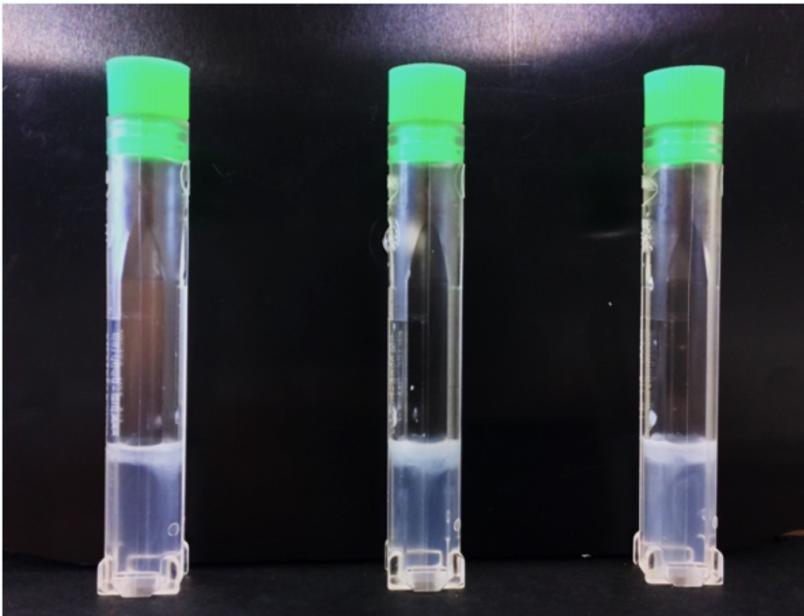
Figura 11 - Ilustração resumindo fenômenos físico-químicos que podem ocorrer com a desestabilização de uma suspensão/emulsão: sedimentação, *creaming*, flotação, coalescência, degradação difusional ou inversão de fase.



Fonte: LUM GmbH (com modificações).

Creaming é a migração da fase dispersa de uma emulsão para a superfície, sob a influência da flutuabilidade. As partículas flutuam dependendo do seu tamanho, densidade e viscosidade em relação à fase contínua (André, Willenbacher et al. 2003). A taxa de formação de *creaming* é prevista na Lei de Stokes, que expressa matematicamente a velocidade de assentamento de partículas esféricas suspensas em meio fluido (Detloff 2013). O *creaming*, ao contrário da floculação e coalescência, é um processo reversível. De fato, 24h após o estudo de estabilidade acelerada, o efeito visual de *creaming* (Figura 12) já havia sido revertido e o aspecto visual das nanopartículas mostrava-se normal.

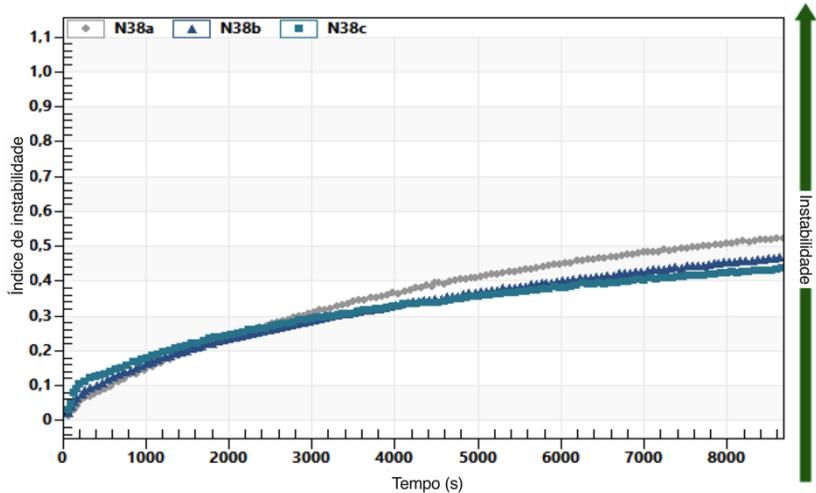
Figura 12 - Aspecto visual das nanopartículas de BCP após ensaio de estabilidade acelerada representando 3 meses, ilustrando fenômeno de *creaming*.



Fonte: A autora.

O índice de instabilidade é quantificado pela clarificação em um determinado tempo de separação, dividido pela sua clarificação máxima. A clarificação quantifica o aumento na transmissão (diminuição da concentração de partículas) devido à separação de fases por sedimentação ou *creaming*. Quando o índice de instabilidade é próximo a zero, a suspensão é considerada muito estável, uma vez que valores próximos a 1 ocorrem quando a dispersão está completamente separada (Detloff 2013). O índice de instabilidade das nanopartículas de BCP (Figura 13) apresentou valor de 0,474 ($\pm 0,043$), compatível com o fenômeno de *creaming* detectado na avaliação da estabilidade das nanopartículas de BCP. O princípio do teste de estabilidade acelerada, ao aplicar força gravitacional e centrífuga, é justamente desestabilizar a amostra para avaliar seu comportamento. É possível visualizar na figura 13 que o ângulo da curva é mais acentuado nos primeiros 2000 s, mantendo-se em um *plateau* pelos próximos 75% do tempo, levando à inferência de menor taxa de *creaming*.

Figura 13 - Índice de instabilidade das nanopartículas de BCP no ensaio de estabilidade acelerada.



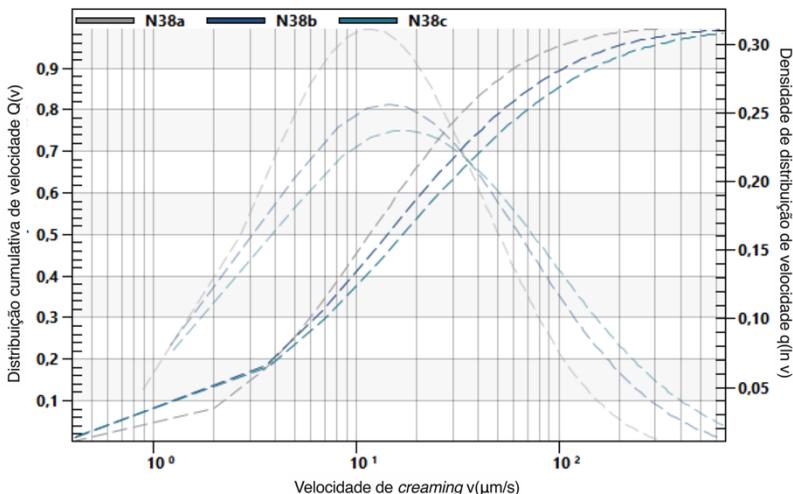
Fonte: A autora.

Neste caso, a velocidade de *creaming* foi quantificada como uma propriedade física da medida de velocidade de migração das partículas (v_{conc}). Esta variável é calculada introduzindo-se na equação de Stokes um parâmetro reológico, i.e., a função de impedimento (f_{hind}), que depende funcionalmente da concentração de volume (α) e da viscosidade dependente da concentração μ (α) da nanopartícula (Chiu, Chang et al. 2011).

Graficamente e numericamente, o processo de *creaming* é descrito na figura 14, correspondendo à distribuição cumulativa de velocidade das partículas na célula de amostra e densidade de distribuição de velocidade, em função da velocidade de sedimentação, dada em mm/h. A distribuição de Maxwell-Boltzmann descreve as velocidades de partículas em gases e fluidos, onde as partículas não interagem constantemente entre si, mas se movem livremente entre colisões curtas (Li, Kheifets et al. 2010). O primeiro eixo y representa a distribuição da velocidade cumulativa seguindo este modelo. O segundo eixo y representa a densidade da velocidade de distribuição das partículas, calculado por \ln da velocidade cumulativa de distribuição. O qual representa a porção de partículas que têm velocidade menor do que a apresentada. Isso indica que cerca de 10% das partículas se sedimentam com velocidade menor que 3,2 $\mu\text{m/s}$, 90% se sedimentam com velocidade menor 124 $\mu\text{m/s}$. Os valores sugerem velocidade

mediana de *creaming* próxima a 12,52 $\mu\text{m/s}$, como é possível observar na figura 14 a curva mais acentuada, indicando acumulação de partículas com velocidade próxima a $10^1 \mu\text{m/s}$, considerada baixa.

Figura 14 - Distribuição cumulativa de velocidade em função da velocidade de *creaming* das nanopartículas de BCP.



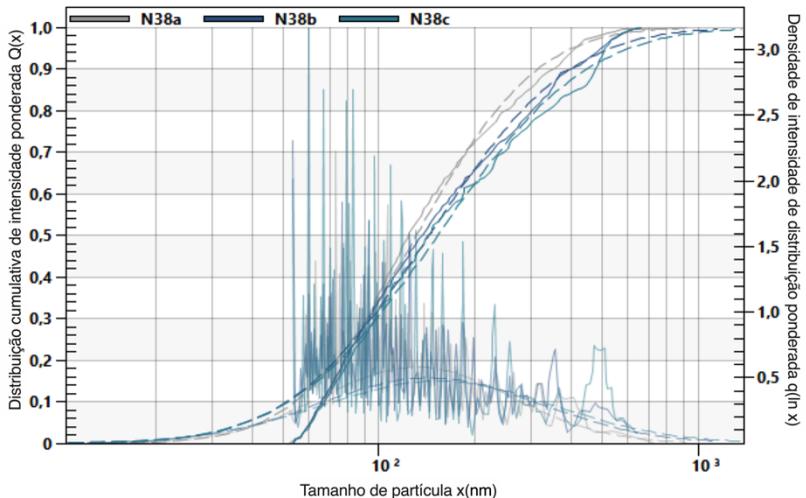
Fonte: A autora.

A determinação da distribuição de tamanho de partículas de BCP é mostrada na figura 15. Em simultâneo, é apresentada a distribuição cumulativa de tamanho de partículas e a densidade de distribuição ponderada em função do tamanho de partícula, em nm. A intensidade de distribuição cumulativa do tamanho de nanopartículas converte os dados da velocidade da distribuição para uma intensidade ponderada da gama de tamanho de partícula, fornecendo informações quantitativas e qualitativas de tamanho e de distribuição de tamanho de partículas na dispersão.

Após ensaio de estabilidade acelerada e formação de *creaming*, o padrão de distribuição do tamanho das nanopartículas contendo BCP manteve-se unimodal. A mediana de tamanho de partícula foi de 134 nm, próximo ao mensurado pela caracterização inicial por DLS, que apresentou média de 147 nm. Após a desestabilização, a distribuição de tamanhos de nanopartículas foi: $10\% \leq 66 \text{ nm}$, $50\% \leq 134 \text{ nm}$ e $90\% \leq 411 \text{ nm}$. Uma emulsão sob *creaming* tem maior probabilidade de coalescência devido à proximidade dos glóbulos na faixa do creme, o que pode levar ao processo de floculação ou de coalescência. Tal fato

não foi observado com as nanopartículas de BCP, aonde mesmo após ensaio de estabilidade acelerada, a distribuição do tamanho de partículas continuou equivalente ao avaliado pela caracterização de DLS.

Figura 15 - Distribuição cumulativa do tamanho de nanopartículas de BCP .



Fonte: A autora.

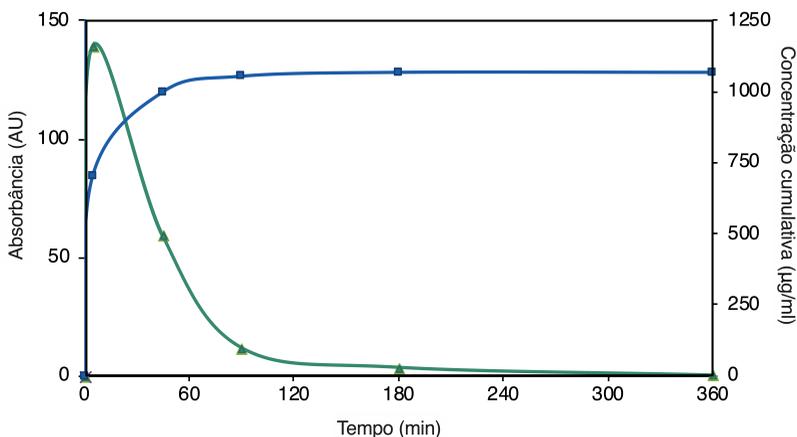
A medida de estabilidade é essencial à análises subsequentes em relação à descrição do comportamento de emulsões, e por conseguinte, ao entendimento de como as estruturas se relacionam e se comportam, visando a otimização da sua estrutura para o uso pretendido. Portanto, os resultados do ensaio de estabilidade acelerada permitem concluir que as nanopartículas de BCP apresentaram estabilidade adequada ao fim pretendido. Ressalta-se que se busca uma formulação estável o suficiente para viabilizar a produção, distribuição e administração do produto, porém não tão estável que entrave a liberação controlada do agonista *in loco*.

4.3 ESTUDOS *IN VITRO*

4.3.1. Cinética de liberação

Devido às suas dimensões diminutas, as formas de dosagem nanométricas possuem uma relação superfície-volume muito grande que altera as propriedades químicas, físicas e biológicas da forma de dosagem, permitindo-lhes atravessar as células e barreiras nos tecidos, alterando assim a farmacocinética e a farmacodinâmica do agente terapêutico (Perry, Reuter et al. 2012). A cinética de liberação do fármaco fornece informações críticas sobre o comportamento da forma de dosagem e é um parâmetro chave usado para avaliar segurança e eficácia do produto. Geralmente, estudos de liberação *in vitro* são realizados à 37°C (temperatura fisiológica). Uma das metodologias utilizadas é por separação de amostra (*Sample and Separate-SS*), no qual a forma de dosagem da nanoparticulada é introduzida no meio de liberação mantido em temperatura constante, após o que, a liberação do fármaco é avaliada por amostragem do meio (D'Souza 2014). O solvente de partição utilizado (clorofórmio) possui maior afinidade pelo BCP, e não quebra ou extrai as nanopartículas, que por sua vez, possuem mais afinidade pela fase aquosa. O resultado do perfil da cinética de liberação das nanopartículas de BCP *in vitro* está ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Cinética de liberação das nanopartículas de BCP *in vitro*. Absorbância (verde/triângulo) e concentração cumulativa (azul/quadrado).



Fonte: A autora.

Assim que a nanopartícula de BCP é adicionada ao meio de liberação, ocorre a maior porcentagem de liberação, diminuindo linearmente até 1h30. Após 3h, a concentração de BCP liberada em PBS atinge o valor zero, evidenciando que a degradação das nanopartículas de BCP e a total liberação do ativo ocorre em menos de 3 h. De fato, ao visualizar a curva de concentração cumulativa, é possível inferir que a liberação total do ativo ocorre em 60 min, visto que após este tempo a concentração se mantém linear até o final do experimento. Assim, conclui-se que as nanopartículas de BCP possuem liberação rápida em meio fisiológico. Consideramos esse perfil de liberação um sucesso, visto que as nanopartículas podem fornecer um veículo de liberação para atingir a corrente sanguínea diretamente, sem metabolismo de primeira passagem, tornando o BCP disponível em poucos minutos. Esse perfil é desejado devido a possíveis ligações com elementos sanguíneos e metabolização do ativo com o passar do tempo. Este perfil de liberação *in vitro* é semelhante ao encontrado em complexo de infusão de BCP-ciclodextrina (Liu, Yang et al. 2013).

A liberação controlada fornece cinética definida do fármaco, evita níveis sistêmicos tóxicos, melhora a adesão do paciente, protege o fármaco da quebra prematura e melhora a viabilidade biológica de um medicamento terapêutico (Alberti, S Coelho et al. 2017). A liberação controlada pode ocorrer principalmente por duas vias: difusão do fármaco e/ou degradação da matriz no qual o fármaco está incluso (Allen and Cullis 2004, Darrell 2006). Normalmente, a liberação controlada por difusão de fármaco ocorre quando este apresenta afinidade pelo meio no qual será liberado, o que não é o caso do BCP, já que o sangue é um meio aquoso, como pouca afinidade por moléculas lipofílicas sem a presença de um carreador. Além disso, o *design* das nanopartículas de BCP foi realizado buscando-se um polímero biodegradável em meio fisiológico. Além de controlar a solubilidade do fármaco, aumento da absorção, distribuição e penetração dos tecidos, o PEG pode ser reconhecido como um álcool primário e não como um xenobiótico específico. Isto, além de conferir maior biodegradabilidade, também confere propriedades furtivas, diminuindo a possibilidade de resposta imune, ou diminuição do tempo de circulação por captação macrofágica (Halperin 1999).

Ademais, o metabolismo do PEG foi elucidado, tanto aerobicamente como anaerobicamente. A via mais conhecida do metabolismo aeróbico do PEG é a oxidação dos grupos álcoois terminais e carboxílicos, seguido pela clivagem de uma ligação éter e da despolimerização em unidades de glicol. Estas podem entrar nas vias metabólicas centrais, e.g., o ciclo do ácido cítrico (TCA) e a via do glicerato. Ainda no contexto da metabolização do PEG, destaca-se que a atividade da enzima PEG desidrogenase (PEG-DH) é menor tendo

como substrato o PEG 400, em relação a homólogos de maior peso molecular, segundo os mesmos parâmetros ($V_{\max}=10,2$ U mg/ proteína e $K_m=0,7$ mM) (Kawai 2005).

A estrutura físico-química da hidrólise influencia o mecanismo de degradação da cápsula polimérica, bem como sua taxa global. Há dois principais tipos de erosão: *bulk* e superficial. Na erosão do tipo *bulk* a água penetra através da superfície da matriz, de modo que inicialmente não há perda de massa, até que ocorre falha total da superfície e por conseguinte, a completa dissolução da cápsula polimérica e liberação do ativo. Na erosão superficial há pouca penetração de água, o que gera perda linear de massa ao longo do tempo (Darrell 2006). Segundo o padrão de liberação observado ao BCP, infere-se que ocorre erosão do tipo *bulk*. Possivelmente, o mecanismo de degradação ocorre rapidamente através da penetração de água pela matriz polimérica, seguido por sua hidrólise, quebra de cadeia e oxidação, degradando a cadeia polimérica da cápsula e liberando quantidades altas de BCP logo após o contato com o meio fisiológico.

4.4 ESTUDOS *EX VIVO*

4.4.1 Ligação com proteínas plasmáticas

A análise cromatográfica (HPLC) dos biofluidos (sangue e fluido cerebrospinal) requereu a definição e padronização de metodologia para detectar e quantificar o ativo das nanopartículas ao longo do tempo, demonstrando a permeação no SNC. Após a otimização do sistema cromatográfico, a detecção do ativo nos biofluidos não resultou positiva, sugerindo que as nanopartículas ligam-se a alguma fração proteica ou celular dos biofluidos investigados, impedindo sua detecção na forma livre (resultados não mostrados).

Assim, optou-se pela realização de experimentos *ex vivo* de cinética de ligação das nanopartículas com elementos sanguíneos, um aspecto importante à análise do processo de ligação do ativo a componentes plasmáticos ou celulares. Buscou-se também teorizar o tipo de interação do biomaterial no sangue para permitir sua detecção.

Sabe-se que partículas maiores que 200 nm são removidas pelo sistema reticuloendotelial (RES) (fígado, baço, macrófagos, monócitos), enquanto partículas menores que 70 nm são capturadas fisicamente pelos tecidos. As nanopartículas de BCP encontram-se entre esse intervalo de tamanho. Além disso, conforme previamente mencionado, a cadeia de PEG deve conferir propriedade furtiva devido à redução na captação pelo RES, menor ligação às proteínas e maior estabilidade em suspensão (Halperin 1999). Isso ocorre principalmente devido à estabilidade estérica que a molécula de PEG fornece à nanopartícula através da formação de concha de hidratação, que pode diminuir o

potencial zeta e impedir a interação da molécula com elementos sanguíneos (Knop 2010). De fato, estudos apontam que nanopartículas PEGuiladas com potencial zeta negativo resultaram em fraca ativação do sistema do complemento (Vonarbourg 2006). A estabilidade estérica criada pela molécula de PEG é maior do que a força de van der Waals entre a nanopartícula e as proteínas sanguíneas, protegendo assim a partícula do ataque da opsonina e consequente fagocitação, caracterizando as propriedades estéticas e furtivas do PEG (Muralidhalan 2014).

Ao observarmos a composição sanguínea, identificamos que a sua porção celular (hemácias e plaquetas) corresponde a aproximadamente 45% do seu peso, enquanto a porção líquida (plasma) equivale a cerca de 55%. Esta porção plasmática é uma solução complexa, contendo mais de 90% de água. Desta fração aquosa, aproximadamente 2-4% são gases e nutrientes, sendo transportados como sais, hormônios, carboidratos, lipídios e produtos do metabolismo. A outra parte (6-8%) do seu peso equivale à proteínas em plasma (mais de 3.000 tipos diferentes). Dentre estas, as mais significantes são as albuminas (58%) globulinas (38%) e fibrinogênio (4%). A maioria das proteínas do plasma sanguíneo é de carga negativa (Alberts 2017). Devido à natureza heterogênea das proteínas, a interação entre as mesmas e biomateriais pode ocorrer por diversos mecanismos. A adsorção inicial de proteínas será determinada por maior escala espacial de propriedades de superfície média, como interações eletrostáticas e estéricas (embora geralmente não se possa referir a repulsão de superfície carregada como mecanismo para inibir a adsorção de proteínas). Nesta, podem haver muitos componentes distintos, ambos atraentes (e.g., pontes de hidrogênio, íons, forças de Van Der Waals-VDW, hidrofobicidade, eletrostática) e repulsivos (entropia configuracional, volume excluído, potencial osmótico, entálpico, eletrostático e grau de hidratação, por exemplo), resultando em perfis de interação complexos e dinâmicos com as nanopartículas. Estágios secundários de adsorção de proteína dependem de processos de ligação adesiva biomolecular de menor alcance, que ocorrem quando a proteína está em contato próximo com a superfície do biomaterial. Por razões entrópicas, as cadeias proteicas evitam o espaço entre duas nanopartículas próximas, ou entre uma partícula e uma parede planar, e criam uma atração efetiva entre as partículas coloidais (Lewis 2000, Ortiz 2007, Israelachvili 2011). Por fim, como cada proteína tem sua própria química superficial heterogênea e potencial intermolecular único, o tipo e a intensidade da interação com as nanopartículas são de natureza complexa e sua caracterização foge ao escopo deste trabalho.

Como descrito anteriormente, o padrão de BCP, as nanopartículas e os fluidos biológicos foram analisados com sucesso através do método cromatográfico desenvolvido. Entretanto, tal não se

observou quando o material biológico de animais tratados com nanopartículas de BCP era analisado, i.e., o ativo não era detectado. O entendimento destes resultados pressupõe a compreensão do racional que guia as escolhas de métodos à extração do BCP, de detecção via HPLC e do processo de otimização do sistema de solventes utilizados na fase móvel da cromatografia. Em testes com fluidos biológicos em sistemas de HPLC, é praxe o uso de solvente orgânico como o metanol (MeOH) para precipitar proteínas, seguido da injeção do sobrenadante filtrado. Além disso, a acetonitrila (ACN) é um organosolvente utilizado à quebra das nanopartículas, permitindo a recuperação e a detecção do ativo no sistema cromatográfico. O processo de otimização deste sistema considerou por base protocolos de terpenos e canabinoides (de Almeida Borges, Ribeiro et al. 2013, Giese, Lewis et al. 2015), com modificações para otimizar a corrida cromatográfica. Por exemplo, o principal solvente da fase móvel é a ACN, mas observou-se que ao adicionar metanol, o tempo de corrida foi reduzido em 50% (15min). Diferentes proporções de ACN: MeOH foram testadas (9:1, 8:2 e 7:3), com melhores resultados observados quanto à separação e resolução do pico de BCP com a proporção de 8:2. Entretanto, como é necessário ter uma pequena porção de água devido à natureza dos fluidos biológicos, esta foi adicionada à fase móvel (modo isocrático, na proporção de 8:1:1 (ACN: MeOH: H₂O).

Num segundo momento, investigou-se a eficiência de uma série de solventes à extração do analito a partir da matriz complexa do biofluido. Para tal, a 50µl BCP NPs foram adicionados 100µl de plasma de rato, seguido de extração com os sistemas solventes mostrados na tabela 14. A mistura amostra-solução extratora foi submetida à agitação (vortex, 1 min) e em seguida submetida a ultrassom (3 min) e centrifugação (4°C, 10.000 rpm, 2 min), coletando-se o sobrenadante e concentrando-o sob fluxo de N₂, para posterior ressuspensão em 100µl ACN e análise por HPLC.

Tabela 14 - Otimização de protocolos de extração das nanopartículas de elementos plasmáticos ex vivo. Valores expressos em µl. (-) significa que o solvente não foi utilizado, (*) significa que ocorreu detecção de BCP no HPLC, e (x) que não houve detecção.

*	MeOH	DMF	HClO ₄	NaOH	THF	DMSO	SDS	BME	DC E	CHCl ₃	ACN	EtOH
x	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-

*	MeOH	DMF	HClO ₄	NaOH	THF	DMSO	SDS	BME	DC E	CHCl ₃	ACN	EtOH
x	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
x	-	-	40	30	-	-	-	-	-	-	-	-
x	-	-	40	30	-	-	-	-	-	500	100	-
x	-	-	40	30	-	-	-	-	250	250	100	-
x	-	-	40	30	-	-	-	-	250	500	100	-
*	-	-	-	-	250	-	-	-	-	250	100	-
x	-	250	-	-	-	-	-	-	-	250	100	-
x	-	-	-	-	-	250	-	-	-	250	100	-
*	-	-	-	-	250	-	20	-	-	250	100	-
x	-	-	-	-	250	-	-	100	-	250	100	-
x	-	-	-	-	250	-	20	100	-	250	100	-
x	-	-	40	-	-	-	20	-	250	250	100	-
x	-	-	40	-	-	-	-	20	250	250	100	-
x	-	-	40	-	-	-	-	20	250	250	100	-
*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400

Fonte: A autora.

Foi-se aumentando a polariidade do solvente para aumentar sua potência extratora, utilizado para ter o efeito de desnaturação e precipitação das proteínas, de modo que a ligação com as nanopartículas de BCP também cessasse, e o mesmo pudesse ser identificado. Após as primeiras tentativas sem sucesso de detecção, teorizou-se que os solventes poderiam estar quebrando também a cápsula polimérica e o BCP estaria livre em um meio aquoso pelo qual não tem a menor afinidade e poderia se ligar a lipoproteínas e outros carregadores lipídicos presentes no sangue. Optou-se pela adição de solventes orgânicos polares para dissolução e extração líquido-líquido eficiente do BCP da fração lipídica. O clorofórmio (CHCl₃) e o dicloroetano (DCE) foram identificados como solventes com maior afinidade pelo BCP, com 90,72 % e 94,22% de recuperação respectivamente (Canbay 2017).

Além disso, reações de saponificação e acidificação, seguidas de neutralização com base também foram testadas. Dentre todos os métodos testados (tabela 13), o único protocolo a extrair o BCP eficientemente da sua interação com elementos sanguíneos foi com a adição de tetrahidrofurano (THF) como desnaturante de proteínas, seguido da extração líquido-líquido com clorofórmio (destacado na tabela 13). A ressuspensão em ACN se manteve por ser compatível com a fase móvel do HPLC.

A desnaturação de proteínas é um processo no qual proteínas ou ácidos nucleicos perdem suas estruturas quaternárias, terciárias e secundárias que estão presentes no seu estado nativo, pela aplicação de algum *stress* ou composto externo tal como solvente orgânico, ácido ou base forte, sal inorgânico concentrado, calor ou radiação (Tanford 1968). A desnaturação das proteínas por solventes orgânicos deve-se principalmente ao rompimento de interações não-covalentes. A maioria dos solventes orgânicos é desnaturante, como os utilizados nos testes de extração: metanol (MeOH), etanol (EtOH) e THF (Wang, Lim et al. 2014). Já a precipitação de proteínas pelo ácido perclórico (HClO_4) é um dos protocolos de precipitação de proteínas mais amplamente utilizados (Layne 1957), uma vez que não apenas remove a maior parte da proteína presente na amostra, mas também funciona para estabilizar muitos dos analitos de moléculas pequenas. As bases funcionam de forma semelhante aos ácidos na desnaturação, neste experimento foi utilizado o bicarbonato de sódio (NaOH). O 2-mercaptoetanol (BME) foi testado pela sua capacidade redutora de ligações dissulfeto. Agentes caotrópicos, que interrompem a rede de ligação de hidrogênio entre as moléculas de água, como o dodecil sulfato de sódio (SDS) também foram testados (Wang, Lim et al. 2014). Podemos inferir com base na falha destes mecanismos de extrair eficientemente o BCP, que os mecanismos de desnaturação do THF são a chave para entender a interação formada entre os elementos sanguíneos e as nanopartículas de BCP.

O THF é um éter cíclico com a fórmula $(\text{CH}_2)_4\text{O}$, sendo frequentemente usado na ciência dos polímeros por ser um solvente orgânico miscível em água capaz de dissolver polímeros. Além disso, o THF é uma base de Lewis fraca que forma complexos moleculares com muitos haletos de metais de transição (Müller 2000). Portanto, além de provocar o rompimento de interações não-covalentes, como solvente orgânico, sua capacidade de dissolver polímeros possivelmente está ligada à sua maior eficiência. Essa característica deve conferir sinergia ao surtir efeito tanto nas proteínas quanto aos polímeros a elas ligados. Da mesma forma, a habilidade de formar complexos com metais, muda o equilíbrio iônico da superfície da ligação inter partícula-proteína, alterando equilíbrio estérico e eletrostático. Para macromoléculas

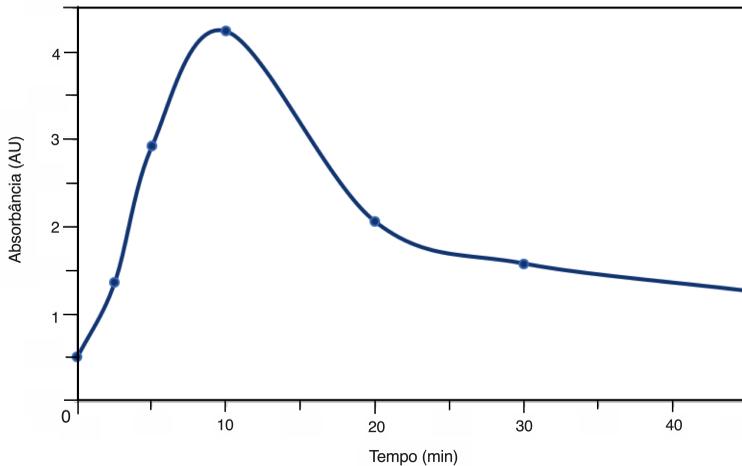
(proteínas) ligadas a um colóide (nanopartículas poliméricas), há uma conformação de equilíbrio. Sendo que qualquer desvio dessa conformação de equilíbrio, por exemplo, após alterações iônicas, resulta em uma repulsão não-linear, superando a ligação por forças de VDW, e contribuindo para a ruptura da ligação entre proteínas e nanopartícula polimérica (Lewis 2000, Ortiz 2007).

Comum a todas as misturas de solventes é o comportamento de proteínas em solventes orgânicos, i.e., sua precipitação. O passo de desnaturação física, através do ultrassom, buscou potencializar o efeito obtido pela desnaturação química. Além disto, a centrifugação sob baixa temperatura após a adição de mistura de solventes orgânicos induziu boa separação de fases, facilitando a recuperação do analito. Com as interações proteínas-nanopartículas quebradas, é necessário transferir o BCP apolar de um solvente para outro, sendo os dois solventes imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, através da extração líquido-líquido. Desta forma não há extração de proteínas, apenas a extração da parte lipídica polar fracionada após ao processo de desnaturação.

Lipídios ocorrem de múltiplas formas nos tecidos, mas lipídios complexos estão associados com proteínas e polissacarídeos, por exemplo, com os quais interagem por forças hidrofóbicas, VDW e em alguns casos, forças iônicas. De modo a libertar todos os lípidos da sua associação com membranas celulares ou com lipoproteínas (Alberts 2017), o solvente ideal ou a mistura de solventes deve ser de caráter polar, não reagindo com componentes lipídicos da amostra. As duas principais características estruturais dos lipídios que controlam a sua solubilidade em solventes orgânicos são o tamanho das cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicas do ácido graxo ou outras porções alifáticas e grupos funcionais polares. Diversos solventes podem ser utilizados como extratores, mas o método clássico (Folch, Lees et al. 1957) é com clorofórmio-metanol. Como apontado previamente, o clorofórmio possui grande afinidade com BCP e como comprovado experimentalmente, foi o melhor extrator por partição.

Esta otimização de extração foi realizada apenas com a fração plasmática do sangue por motivos de padronização. Mas a cinética de ligação *ex vivo* (figura 17) foi realizada em sangue completo, mimetizando mais realisticamente os processos fisiológicos.

Figura 17 - Perfil de ligação das nanopartículas de BCP com elementos sanguíneos de ratos *ex vivo*.



Fonte: A autora.

O perfil de ligação das nanopartículas de BCP aos elementos sanguíneos mostra a influência que a cápsula polimérica tem na afinidade com os elementos sanguíneos. Pode-se observar na figura 17 a ocorrência de provável ligação do BCP com os elementos do sanguíneos, devido à não recuperação do ativo nos primeiros minutos. É possível inferir que esta ligação, por sua vez, diminui ao longo do tempo, de modo que a cada momento amostral, mais BCP foi recuperado. Dez minutos após o início do processo de recuperação, maiores valores desta variável foram observados. Na sequência, até o final do experimento, a recuperação decaiu linearmente.

Assume-se que a interação proteína-BCP deve ter ocorrido *in vivo* de forma potencializada. É amplamente reconhecido que o microambiente de uma célula desempenha um papel importante em sua função e comportamento. Embora os modelos *ex vivo* possam reproduzir melhor a complexidade do cenário *in vivo* em comparação com modelos *in vitro*, as diferenças no microambiente podem causar diferenças entre os dados *ex vivo* e *in vivo*. A diferença de complexidade entre um organismo ao nível de sistema e uma porção deste sistema (eg. sangue) analisado *ex vivo* é fundamental, como a falta dos tecidos adjacentes, hemodinâmica e suprimento normal de nutrientes. Neste experimento, como modelo biológico de estudo, foram analisadas as interações com os elementos sanguíneos, principalmente proteínas e lipoproteínas. Pode-se mimetizar e inferir conclusões sobre interações de natureza

físico-química. Entretanto, o modelo biológico experimental não permite mimetizar o grau de interações biológicas necessárias. A absorção de um fármaco *in vivo* sofre influência dos vasos sanguíneos, interage com membranas, é captado por tecidos, transportadores celulares específicos e além de tudo, é metabolizado (Rowland and Tozer 2011). A incapacidade de simular todas as respostas fisiológicas e metabólicas *ex vivo* também nos impede de elucidar todos os mecanismos de interação fisiológica com as nanopartículas de BCP. Não obstante, todas essas informações *in vitro* e *ex vivo* levam à conclusão de que as nanopartículas de BCP são aptas para administração fisiológica.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho uma formulação contendo nanopartículas de β -cariofileno foi desenvolvida com sucesso, representando a conclusão da primeira etapa do desenvolvimento e otimização de um protótipo terapêutico aplicado à neurodegeneração. Esse trabalho desenvolveu a primeira nanopartícula polimérica de β -cariofileno e também adequada para a administração intranasal. Além disso, o design das nanopartículas apresentou características físico-químicas adequadas em relação à aplicação pretendida. Sendo que o diâmetro médio das nanopartículas foi inferior a 200 nm, com distribuição uniforme e morfologia circular. O pH da formulação apresentou caráter levemente ácido e hipotônico. A eficiência de encapsulação do β -cariofileno e teor ativo das nanopartículas foi alto no processo de nanoencapsulação. A carga de superfície foi negativa, contribuindo para sua estabilidade em prateleira. As nanopartículas apresentaram liberação controlada em meio fisiológico, e interação com material biológico, portanto, sendo apta para testes pré-clínicos. Concluindo com sucesso os objetivos almejados inicialmente neste trabalho.

Neste trabalho foram desenvolvidas nanopartículas de BCP com sucesso, mas ainda existem alguns estudos pré-clínicos para comprovar seu efeito *in vitro* e *in vivo*, bem como estudar a permeação das nanopartículas de β -cariofileno através da BHE em relação ao seu perfil farmacocinético. A incapacidade de simular todas as respostas fisiológicas e metabólicas *ex vivo* também nos impede de elucidar todos os mecanismos de interação fisiológica com as nanopartículas de BCP. Por isso, é importante realizar estudos de farmacocinética, toxicologia e metabolismo para gerar informações sobre absorção, distribuição, metabolismo e excreção importantes para o desenvolvimento do fármaco. Após estabelecimento da segurança, é importante realizar estudos de eficácia e farmacodinâmica, como avaliação de biomarcadores, níveis de citocinas inflamatórias, ensaio de proliferação celular e apoptose de células neurais. Além do estudo de modelos *in vivo* de DA, DP e EM para determinar a aplicabilidade do protótipo desenvolvido neste trabalho. Se os resultados se mostrarem favoráveis, ainda é possível expandir a avaliação do efeito no sistema nervoso central, verificando se a relação com a neuroinflamação teria efeito na memória, nocicepção e até mesmo em modulação neurotransmissora como em ansiedade e depressão, ou em epilepsia. Ao combinar um agente terapêutico canabinoide com nanotecnologia, desenvolvemos uma área de pesquisa em demanda com alto valor agregado, além de representar elevado potencial de descobertas estratégicas para o desenvolvimento da ciência, tecnologia e saúde.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, B., N. Ahmad, A. Saeed and N. Islam (1995). "Rheology of poly (vinyl pyrrolidone) in aqueous and organic media." JOURNAL-CHEMICAL SOCIETY OF PAKISTAN **17**: 7-7.
- Alberti, T., D. S Coelho, A. Voytena, H. Pitz, M. de Pra, L. Mazzarino, S. Kuhnen, R. M Ribeiro-do-Valle, M. Maraschin and B. Veleirinho (2017). "Nanotechnology: A Promising Tool Towards Wound Healing." Current pharmaceutical design **23**(24): 3515-3528.
- Alberti, T. B., W. L. R. Barbosa, J. L. F. Vieira, N. R. B. Raposo and R. C. Dutra (2017). "(-)- β -Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis." International Journal of Molecular Sciences **18**(4): 691.
- Alberti, T. B., R. Marcon, M. A. Bicca, N. R. B. Raposo, J. B. Calixto and R. C. Dutra (2014). "Essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating Th1/Treg cell balance." Journal of ethnopharmacology **155**(1): 485-494.
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*, Garland science.
- Allen, L. and H. C. Ansel (2013). *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Wolters Kluwer Health.
- Allen, T. M. and P. R. Cullis (2004). "Drug delivery systems: entering the mainstream." Science **303**(5665): 1818-1822.
- Amor, S., F. Puentes, D. Baker and P. Van Der Valk (2010). "Inflammation in neurodegenerative diseases." Immunology **129**(2): 154-169.
- André, V., N. Willenbacher, H. Debus, L. Börger, P. Fernandez, T. Frechen and J. Rieger (2003). "Prediction of emulsion stability: facts and myth." Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide **102**.
- Assis, L. C., M. R. Straliotto, D. Engel, M. A. Hort, R. C. Dutra and A. F. De Bem (2014). " β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway." Neuroscience **279**: 220-231.
- Atwood, B. K., A. Straiker and K. Mackie (2012). "CB 2: therapeutic target-in-waiting." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **38**(1): 16-20.
- Aurora, J. (2002). "Development of nasal delivery systems: a review." Drug Deliv Technol **2**(7): 1-8.
- Bahi, A., S. Al Mansouri, E. Al Memari, M. Al Ameri, S. M. Nurulain and S. Ojha (2014). " β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice." Physiology & behavior **135**: 119-124.
- Bawa, P., P. Pradeep, P. Kumar, Y. E. Choonara, G. Modi and V. Pillay (2016). "Multi-target therapeutics for neuropsychiatric and neurodegenerative disorders." Drug discovery today **21**(12): 1886-1914.

Bento, A. F., R. Marcon, R. C. Dutra, R. F. Claudino, M. Cola, D. F. Leite and J. B. Calixto (2011). "beta-Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway." Am J Pathol **178**(3): 1153-1166.

Brewster, M. E. and T. Loftsson (2007). "Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers." Advanced drug delivery reviews **59**(7): 645-666.

Canbay, H. S. (2017). "Effectiveness of Liquid-Liquid Extraction, Solid Phase Extraction, and Headspace Technique for Determination of Some Volatile Water-Soluble Compounds of Rose Aromatic Water." International journal of analytical chemistry **2017**.

Carson, M. J., J. M. Doose, B. Melchior, C. D. Schmid and C. C. Ploix (2006). "CNS immune privilege: hiding in plain sight." Immunological reviews **213**(1): 48-65.

Chang , H. J., J. M. Kim, J. C. Lee, W. K. Kim and H. S. Chun (2013). "Protective effect of β -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury." Journal of Medicinal Food **16**(6): 471-480.

Chen, W.-W., X. I. A. Zhang and W.-J. Huang (2016). "Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review)." Molecular Medicine Reports **13**(4): 3391-3396.

Cheng, Y., Z. Dong and S. Liu (2014). " β -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway." Pharmacology **94**(1-2): 1-12.

Chiu, H.-T., C.-Y. Chang, T.-Y. Chiang, M.-T. Kuo and Y.-H. Wang (2011). "Using analytical centrifugation to characterize the dispersibility and particle size distributions of organic/inorganic composite coatings." Journal of Polymer Research **18**(6): 1587-1596.

Currais, A., O. Quehenberger, A. M. Armando, D. Daugherty, P. Maher and D. Schubert (2016). "Amyloid proteotoxicity initiates an inflammatory response blocked by cannabinoids." NPJ aging and mechanisms of disease **2**: 16012.

D'Souza, S. (2014). "A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms." Advances in Pharmaceutics **2014**.

Danaei, M., M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani and M. Mozafari (2018). "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems." Pharmaceutics **10**(2): 57.

Darrell, I. (2006). 20.462J Molecular Principles of Biomaterials. Spring. Massachusetts Institute of Technology: MIT OpenCourseWare, License: Creative Commons BY-NC-SA.

de Almeida Borges, V. R., A. F. Ribeiro, C. de Souza Anselmo, L. M. Cabral and V. P. de Sousa (2013). "Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers β -

caryophyllene and α -humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design." Journal of Chromatography B **940**: 35-41.

de Silva, D. J. and J. M. Olver (2005). "Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) lubricant facilitates insertion of porous spherical orbital implants." Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery **21**(4): 301-302.

de Villiers, M. M., P. Aramwit and G. S. Kwon (2008). Nanotechnology in Drug Delivery, Springer New York.

Detloff, T. S., T; Lerche, D (2013). "Instability Index." Dispersion Letters Technical.

Di Marzo, V. (2008). "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?" Nature Reviews Drug Discovery **7**(5): 438-455.

Dutra, R. C., F. G. Braga, E. S. Coimbra, A. D. Silva and N. R. Barbosa (2009). "Antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*." Revista Brasileira de Farmacognosia **19**(2A): 429-435.

Dutra, R. C., R. F. Claudino, A. F. Bento, R. Marcon, É. C. Schmidt, Z. L. Bouzon, L. F. Pianowski and J. B. Calixto (2011). "Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice." PloS one **6**(11): e27122.

Dutra, R. C., M. B. Fava, C. C. Alves, A. P. Ferreira and N. R. Barbosa (2009). "Antitumorogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds." Journal of pharmacy and pharmacology **61**(2): 243-250.

Dutra, R. C., R. Trevizani, F. Pittella and N. R. Barbosa (2008). "Antinociceptive activity of the essential oil and fractions of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds." Lat. Am. J. Pharm **27**(6): 865-870.

Esposito, G., D. De Filippis, R. Carnuccio, A. A. Izzo and T. Iuvone (2006). "The marijuana component cannabidiol inhibits β -amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/ β -catenin pathway rescue in PC12 cells." Journal of molecular medicine **84**(3): 253-258.

Estacio, K. C. (2008). Simulação de escoamento de fluidos em superfícies definidas por pontos não organizados, Universidade de São Paulo.

Fernandes, E. S., G. F. Passos, R. Medeiros, F. M. Da Cunha, J. Ferreira, M. M. Campos, P. L.F. and J. B. Calixto (2007). "Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*." European Journal of Pharmacology **569**(3): 228-236.

Ferreira, D. A. S. (2014). Avaliação do efeito protetor do betacariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas, Universidade de São Paulo.

Ferrer, I. (2014). "Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic." Frontiers in pharmacology **5**: 37.

Folch, J., M. Lees and G. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Frank, S. (2014). "Treatment of Huntington's Disease." Neurotherapeutics **11**(1): 153-160.

Gao, H. (2016). "Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery." Acta Pharmaceutica Sinica. B **6**(4): 268-286.

Gertsch, J., M. Leonti, S. Raduner, I. Racz, J. Z. Chen, X. Q. Xie, K. H. Altmann, M. Karsak and A. Zimmer (2008). "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9099-9104.

Gertsch, J., R. G. Pertwee and V. Di Marzo (2010). "Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant—do they exist?" British journal of pharmacology **160**(3): 523-529.

Giese, M. W., M. A. Lewis, L. Giese and K. M. Smith (2015). "Method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis." Journal of AOAC International **98**(6): 1503-1522.

Halperin, A. (1999). "Polymer brushes that resist adsorption of model proteins: design parameters." Langmuir **15**(7): 2525-2533.

Hazekamp, A. (2007). Cannabis: extracting the medicine, Department of Pharmacognosy, (IBL), Faculty of Science, Leiden University.

Higuchi, W. and J. Misra (1962). "Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof." Journal of pharmaceutical sciences **51**(5): 459-466.

Hill, A. J., C. M. Williams, B. J. Whalley and G. J. Stephens (2012). "Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders." Pharmacology & therapeutics **133**(1): 79-97.

Holgado, M., L. Martín-Banderas, J. Álvarez-Fuentes and M. Fernández-Arévalo (2017). "Neuroprotective effect of cannabinoids nanoplatforms in neurodegenerative diseases." Journal of Drug Delivery Science and Technology **42**: 84-93.

Hu, Y., Z. Zeng, B. Wang and S. Guo (2017). "trans-caryophyllene inhibits amyloid β (a β) oligomer-induced neuroinflammation in Bv-2 microglial cells." International immunopharmacology **51**: 91-98.

Israelachvili, J. N. (2011). Intermolecular and surface forces, Academic press.

Jain, K. K. (2012). "Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier." Nanomedicine **7**(8): 1225-1233.

Jaiswal, M., R. Dudhe and P. K. Sharma (2015). "Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system." 3 Biotech **5**(2): 123-127.

Jeon, P., S. Yang, H. Jeong and H. Kim (2011). "Cannabinoid receptor agonist protects cultured dopaminergic neurons from the death by the proteasomal dysfunction." Anatomy & cell biology **44**(2): 135-142.

Kawai, F. (2005). "Biodegradation of polyethers (polyethylene glycol, polypropylene glycol, polytetramethylene glycol, and others)."

Kennedy, M. E., A. W. Stamford, X. Chen, K. Cox, J. N. Cumming, M. F. Dockendorf, M. Egan, L. Ereshefsky, R. A. Hodgson, L. A. Hyde, S. Jhee, H. J. Kleijn, R. Kuvelkar, W. Li, B. A. Mattson, H. Mei, J. Palcza, J. D. Scott, M. Tanen, M. D. Troyer, J. L. Tseng, J. A. Stone, E. M. Parker and M. S. Forman (2016). "The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients." Science Translational Medicine **8**(363): 363ra150-363ra150.

Khanam, H., A. Ali, M. Asif and Shamsuzzaman "Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review." European Journal of Medicinal Chemistry.

Klauke, A.-L., I. Racz, B. Pradier, A. Markert, A. Zimmer, J. Gertsch and A. Zimmer (2014). "The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain." European Neuropsychopharmacology **24**(4): 608-620.

Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., & Schubert, U. S. (2010). "Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives." Angewandte chemie international edition, **49**(36), 6288-6308.

Köfalvi, A. (2007). Cannabinoids and the Brain, Springer Science & Business Media.

Kreuter, J. (2014). "Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know?" Advanced drug delivery reviews **71**: 2-14.

Kumari, A., S. K. Yadav and S. C. Yadav (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." Colloids Surf. B Biointerfaces **75**(1): 1-18.

Kushwaha, S. K., R. K. Keshari and A. Rai (2011). "Advances in nasal trans-mucosal drug delivery." Journal of applied pharmaceutical science **1**(7): 21.

Layne, E. (1957). "[73] Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins."

Lewis, J. A. (2000). "Colloidal Processing of Ceramics." Journal of the American Ceramic Society **83**(10): 2341-2359.

Li, T., S. Kheifets, D. Medellin and M. G. Raizen (2010). "Measurement of the instantaneous velocity of a Brownian particle." Science **328**(5986): 1673-1675.

Liu, H., Z. Song, D. Liao, T. Zhang, F. Liu, K. Zhuang, K. Luo and L. Yang (2015). "Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice." Neurochemical research **40**(1): 118-123.

Liu, H., G. Yang, Y. Tang, D. Cao, T. Qi, Y. Qi and G. Fan (2013). "Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of β -caryophyllene/ β -cyclodextrin inclusion complex." International journal of pharmaceutics **450**(1-2): 304-310.

Lou, J., Z. Teng, L. Zhang, J. Yang, L. Ma, F. Wang, X. Tian, R. An, M. Yang and Q. Zhang (2017). " β -Caryophyllene/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex improves cognitive deficits in rats with vascular dementia through the cannabinoid receptor type 2-mediated pathway." Frontiers in pharmacology **8**: 2.

Martín Banderas, L., J. Álvarez Fuentes, M. M. Durán Lobato, J. C. Prados Salazar, C. Melguizo Alonso, M. M. Fernández Arévalo and M. Á. Holgado Villafuerte (2012). "Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies."

Martín-Moreno, A. M., D. Reigada, B. G. Ramírez, R. Mechoulam, N. Innamorato, A. Cuadrado and M. L. de Ceballos (2011). "Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimers' disease." Molecular pharmacology: mol. 111.071290.

Masserini, M. (2013). "Nanoparticles for brain drug delivery." ISRN biochemistry **2013**.

Mathew, A., T. Fukuda, Y. Nagaoka, T. Hasumura, H. Morimoto, Y. Yoshida, T. Maekawa, K. Venugopal and D. S. Kumar (2012). "Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease." PLoS One **7**(3): e32616.

Mazzarino, L., I. Otsuka, S. Halila, L. d. S. Bubniak, S. Mazzucco, M. C. Santos-Silva, E. Lemos-Senna and R. Borsali (2014). "Xyloglucan-block-Poly (ϵ -Caprolactone) Copolymer Nanoparticles Coated with Chitosan as Biocompatible Mucoadhesive Drug Delivery System." Macromolecular bioscience **14**(5): 709-719.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (1995). "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases." Brain Research Reviews **21**(2): 195-218.

Mildew, P., R. Mites, A. Solutions, M. Blog and C. Sequencing (2004). "Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on b-amyloid-induced toxicity in PC12 cells." Journal of Neurochemistry **89**: 134-141.

Miller, C.A. (1988). "Spontaneous emulsification produced by diffusion—a review." Colloids and Surfaces **29**.1: 89-102.

Molina, P. E., A. Amedee, N. J. LeCapitaine, J. Zabaleta, M. Mohan, P. Winsauer and C. V. Stouwe (2011). "Cannabinoid neuroimmune modulation of SIV disease." Journal of Neuroimmune Pharmacology **6**(4): 516.

More, S. V. and D.-K. Choi (2015). "Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection." Molecular neurodegeneration **10**(1): 17.

Mosley, R. L. and H. E. Gendelman (2010). "Control of neuroinflammation as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders." Experimental neurology **222**(1): 1-5.

Müller, H. (2000). "Tetrahydrofuran." Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.

Muralidharan, P., Mallory, E., Malapit, M., Hayes, D., & Mansour, H. (2014). "Inhalable PEGylated phospholipid nanocarriers and PEGylated therapeutics for respiratory delivery as aerosolized colloidal dispersions and dry powder inhalers." Pharmaceutics **6**(2), 333-353.

Nair, L. S. and C. T. Laurencin (2007). "Biodegradable polymers as biomaterials." Progress in polymer science **32**(8): 762-798.

Neumann, H., M. Kotter and R. Franklin (2008). "Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration." Brain **132**(2): 288-295.

Nishiyama, N. and H. Takemoto (2014). Polymeric micelles. Encyclopedia of polymeric nanomaterials. S. Kobayashi and K. Müllen. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 1-7.

Nowacek, A., L. M. Kosloski and H. E. Gendelman (2009). "Neurodegenerative disorders and nanoformulated drug development." Nanomedicine (London, England) **4**(5): 541-555.

Ojha, S., H. Javed, S. Azimullah and M. E. Haque (2016). "β-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease." Molecular and cellular biochemistry **418**(1-2): 59-70.

Ortiz, C. (2007). 3.052 Nanomechanics of Materials and Biomaterials. Massachusetts Institute of Technology: MIT OpenCourseWare, License: Creative Commons BY-NC-SA.

Owens, T., I. Bechmann and B. Engelhardt (2008). "Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **67**(12): 1113-1121.

Paula-Freire, L. I. G. d., M. Andersen, V. Gama, G. Molska and E. Carlini (2014). "The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice." Phytomedicine **21**(3): 356-362.

Perry, J. L., K. G. Reuter, M. P. Kai, K. P. Herlihy, S. W. Jones, J. C. Luft, M. Napier, J. E. Bear and J. M. DeSimone (2012). "PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics." Nano letters **12**(10): 5304-5310.

Pertwee, R. G. (2009). "Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines." British journal of pharmacology **156**(3): 397-411.

Prausnitz, M. R. and R. Langer (2008). "Transdermal drug delivery." Nat Biotech **26**(11): 1261-1268.

Quintans-Júnior, L. J., A. A. Araújo, R. G. Brito, P. L. Santos, J. S. Quintans, P. P. Menezes, M. R. Serafini, G. F. Silva, F. M. Carvalho and N. K. Brogden (2016). " β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn." Life sciences **149**: 34-41.

Ramos, J. A. and M. Guzman "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" TRENDS in Pharmacological Sciences **28**(1).

Ransohoff, R. M. (2016). "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration." Science **353**(6301): 777-783.

Rowland, M. and T. N. Tozer (2011). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications, Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins.

Sanchez, A. J. and A. Garcia-Merino (2012). "Neuroprotective agents: cannabinoids." Clinical Immunology **142**(1): 57-67.

Santos, N. A. G., N. M. Martins, F. M. Sisti, L. S. Fernandes, R. S. Ferreira, O. de Freitas and A. C. Santos (2017). "The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neuritogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism." Chemico-biological interactions **261**: 86-95.

Santos, P. S., T. C. Oliveira, R. Júnior, L. Mário, A. Figueiras and L. C. Nunes (2018). " β -caryophyllene Delivery Systems: Enhancing the Oral Pharmacokinetic and Stability." Current pharmaceutical design **24**(29): 3440-3453.

Schwartz, M., A. London and R. Shechter (2009). "Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity." Neuroscience **158**(3): 1133-1142.

Sharma, D., R. K. Sharma, N. Sharma, R. Gabrani, S. K. Sharma, J. Ali and S. Dang (2015). "Nose-to-brain delivery of PLGA-diazepam nanoparticles." AAPS PharmSciTech **16**(5): 1108-1121.

Soppimath, K. S., T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni and W. E. Rudzinski (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices." Journal of controlled release **70**(1-2): 1-20.

Sosnik, A., J. das Neves and B. Sarmiento (2014). "Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review." Progress in Polymer Science **39**(12): 2030-2075.

Stella, N. (2010). "Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas." *Glia* **58**(9): 1017-1030.

Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Advances in protein chemistry*, Elsevier. **23**: 121-282.

Tian, X., J. Peng, J. Zhong, M. Yang, J. Pang, J. Lou, M. Li, R. An, Q. Zhang and L. Xu (2016). " β -Caryophyllene protects in vitro neurovascular unit against oxygen-glucose deprivation and re-oxygenation-induced injury." *Journal of neurochemistry* **139**(5): 757-768.

Tosi, G., B. Bortot, B. Ruozi, D. Dolcetta, M. A. Vandelli, F. Forni and G. M. Severini (2013). "Potential use of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier." *Current medicinal chemistry* **20**(17): 2212-2225.

Touw, M. (1981). "The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet." *Journal of psychoactive drugs* **13**(1): 23-34.

Trippier, P. C., K. J. Labby, D. D. Hawker, J. J. Mataka and R. B. Silverman (2013). "Target- and Mechanism-Based Therapeutics for Neurodegenerative Diseases: Strength in Numbers." *Journal of medicinal chemistry* **56**(8): 3121-3147.

Turner, C. E., M. A. Elshohly and E. G. Boeren (1980). "Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents." *Journal of Natural Products* **43**(2): 169-234.

Unverdi, S. O. and G. Tryggvason (1992). "A front-tracking method for viscous, incompressible, multi-fluid flows." *Journal of Computational Physics* **100**(1): 25-37.

Valdeolivas, S., V. Satta, R. G. Pertwee, J. Fernández-Ruiz and O. Sagredo (2012). "Sativex-like Combination of Phytocannabinoids is Neuroprotective in Malonate-Lesioned Rats, an Inflammatory Model of Huntington's Disease: Role of CB1 and CB2 Receptors." *ACS Chemical Neuroscience* **3**(5): 400-406.

Viveros-Paredes, J. M., R. E. González-Castañeda, J. Gertsch, V. Chaparro-Huerta, R. I. López-Roa, E. Vázquez-Valls, C. Beas-Zarate, A. Camins-Espuny and M. E. Flores-Soto (2017). "Neuroprotective Effects of β -Caryophyllene against Dopaminergic Neuron Injury in a Murine Model of Parkinson's Disease Induced by MPTP." *Pharmaceuticals* **10**(3): 60.

Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J. C., & Benoit, J. P. (2006). "Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake." *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **78**(3), 620-628.

Wang, X., H. J. Lim and A. Son (2014). "Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization." Environmental health and toxicology **29**.

World Health, O. (2006). Neurological disorders: public health challenges, World Health Organization.

World Health, O. (2007). "Global burden of neurological disorders: estimates and projections." Neurological Disorders: Public Health Challenges, Geneva: World Health Organization: 27-39.

Wyss-Coray, T. and L. Mucke (2002). "Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword." Neuron **35**(3): 419-432.

Yacoubian, T. A. (2017). Chapter 1 - Neurodegenerative Disorders: Why Do We Need New Therapies? A2 - Adejare, Adeboye. Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders, Academic Press: 1-16.

Zuardi, A. W. (2008). "Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action." Revista brasileira de psiquiatria **30**(3): 271-280.