



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E  
NANOBIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE NANOSSISTEMAS HÍBRIDOS PARA  
TRANSPORTE DE RESVERATROL ATRAVÉS DE MEMBRANA COM  
POROSIDADE SIMILAR À DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA

Linha de Pesquisa: Síntese e Caracterização de Complexos Nanoestruturados

Bruna Mendonça Lima

Orientador: Luciano Paulino da Silva  
Coorientadora: Cínthia Caetano Bonatto

Brasília-DF

Fevereiro 2023

Bruna Mendonça Lima

Dissertação de Mestrado

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE NANOSSISTEMAS HÍBRIDOS PARA  
TRANSPORTE DE RESVERATROL ATRAVÉS DE MEMBRANA COM  
POROSIDADE SIMILAR À DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Linha de pesquisa: Síntese e caracterização de complexos nanoestruturados.

Brasília-DF

Fevereiro 2023

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por todas as bênçãos recebidas e lições aprendidas.

Aos meus pais, Zelice e Geraldo, por terem me proporcionado tanto amor e encorajamento aos estudos desde a mais tenra idade. Sempre escutei: “Podem lhe tirar tudo, menos o seu conhecimento”. Nunca serei capaz de expressar o tamanho da minha gratidão. Amo vocês! Às minhas irmãs, Bianca e Beatriz, por todo o carinho e amizade. Biba e Trizinha, vocês sempre estão no meu coração.

Ao meu esposo, Emanuel Felipe, pela parceria de vida, por me incentivar nos sonhos mais loucos, me acalmar nos momentos de incertezas e por ser a vela mais maravilhosa do meu barco. Obrigada por tanto. Te amo e te admiro cada dia mais.

À minha filha Marina, que sempre me incentiva a ser uma mulher e mãe melhores a cada momento. Te amo do tamanho do universo, meu projetinho.

Aos meus orientadores, Luciano e Cíntia por toda a paciência e dedicação no meu aprendizado. Tenho um imenso respeito por vocês. Muitíssimo obrigada!

Às amigas, Lígia e Adriana por terem se tornado parte da família que podemos escolher na vida e por deixarem a vida mais leve.

A todos do LNANO, especialmente à Tatiane e ao Lúcio, que me ajudaram nesta caminhada. Nunca me esquecerei de todo o incentivo.

Eterna gratidão a todos que participaram, direta ou indiretamente, nesta jornada.

## RESUMO

O sistema nervoso central (SNC) é protegido por uma estrutura dinâmica semipermeável, denominada barreira hemato-encefálica (BHE), que blinda eficientemente esta área de possíveis alterações ocasionadas por agentes nocivos oriundos do meio ambiente. Nesse sentido, os nanossistemas lipossomais apresentam ganhos de desempenho e funcionalidade, tendo em vista facilitar a passagem de medicamentos por essa barreira. Dentre os nutracêuticos que podem ser utilizados terapeuticamente, o resveratrol (RES) mostra-se muito promissor por atuar como agente anti-inflamatório e antioxidante. No presente trabalho, foi confeccionado nanossistema lipossomal de fosfatidilcolina associado com micelas poloxâmico (pluronic F127) para encapsulamento de RES. Cada etapa dos experimentos (produção de micelas de pluronic F127 vazias e com RES, nanossistemas lipossomais vazios e com RES, nanossistemas lipossomais extrusados vazios e com RES) foram repetidas por três vezes para verificar sua reprodutibilidade, além de terem os valores de diâmetro hidrodinâmico (Z-Ave e números em percentual) e medidas de polidispersão (Pdl) contabilizados. Na avaliação de Z-Ave, cada grupamento obteve resultados distintos inclusive com diferenças estatísticas entre os mesmos, sendo necessário recorrer a análise do diâmetro hidrodinâmico em números para solucionar questionamentos. Já o Pdl evidenciou a importância da técnica de extrusão para obtenção de uma solução mais monodispersa (próximo de 0,2). Depois seguiu-se com avaliação da taxa de eficiência de encapsulamento nos nanossistemas lipossomais extrusados com RES obtendo taxa de encapsulamento variando de 63,94%, 89,10% e 100%. Além disso, foi construída nova estrutura extrusada lipossomal com RES e submetida a passagem por membrana com porosidade compatível a da BHE. Este nanossistema foi capaz de atravessar e manter seu tamanho próximo àquele de antes da passagem. O nanossistema lipossomal usado mostrou-se eficaz para encapsulamento de RES e possibilitou taxas de encapsulamento compatíveis com a literatura revisada quando comparado a outros tipos de nanossistemas. Os resultados confirmam as premissas iniciais de alta eficiência da capacidade de encapsulamento. Análises *in vitro* serão necessárias para verificar a funcionalidade de entrega de RES no SNC.

Palavras-Chave: Resveratrol, lipossoma, poloxâmico, barreira hemato encefálica

## ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is protected by a semipermeable dynamic structure, called the blood-brain barrier (BBB), which efficiently shields this area from possible changes caused by harmful agents from the environment. In this sense, liposomal nanosystems present gains in performance and functionality, with a view to facilitating the passage of drugs through this barrier. Among the nutraceuticals that can be therapeutically used, resveratrol (RES) is very promising for acting as an anti-inflammatory and antioxidant agent. In the present work, a liposomal phosphatidylcholine nanosystem was made associated with poloxamer (pluronic F127) micelles for RES encapsulation. Each step of the experiments (production of empty and RES-filled pluronic F127 micelles, empty and RES-filled liposomal nanosystems, empty and extruded liposomal nanosystems with RES) were repeated three times to verify their reproducibility, in addition to having the diameter values hydrodynamic (Z-Ave and percentage numbers) and polydispersion (Pdl) measurements accounted for. About the Z-Ave, each group obtained different results including statistical difference between them. Therefore was necessary to review the hydrodynamic diameter in numbers in order to solve this issue. The Pdl showed the importance of the extrusion method to obtain a more monodisperse solution (close to 0,2). Afterwards, the encapsulation rate was evaluated in the extruded liposomal nanosystems with RES with an encapsulation rate of 63.94%, 89.10% and 100%. Then, a new liposomal extruded structure was constructed with RES and subjected to passage through a membrane with porosity compatible with that of the BBB. This nanosystem was able to perform diapedesis and maintain its size close to before passage. The liposomal nanosystem proved to be effective for RES encapsulation with an encapsulation rate compatible with that of the reviewed literature when compared to other nanosystem types. The results confirm the initial assumptions of high efficiency of the encapsulation capacity. *In vitro* analyses will be necessary to verify the functionality of RES delivery through CNS.

Key Words: Resveratrol, liposome, poloxamer, blood-brain barrier

## Lista de Figuras

- Figura 1: Representação esquemática de uma nanoesfera (imagem da esquerda) e uma nanocápsula (imagem da direita). 28
- Figura 2: Representação da estrutura química dos tipos de resveratrol: trans e cis. 31
- Figura 3: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico (Z-Ave) dos nanossistemas micelares de Pluronic vazios. Valores de média e desvio padrão da média de quatro experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ). 42
- Figura 4: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas micelares de Pluronic vazios obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos. 42
- Figura 5: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas micelares de Pluronic com resveratrol. Valores de média e desvio padrão dos três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ). 43
- Figura 6: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas micelares de Pluronic com resveratrol obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos. 43
- Figura 7: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão dos três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ). 45
- Figura 8: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos. 45
- Figura 9: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais não extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão dos três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). 46
- Figura 10: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas lipossomais não extrusados com resveratrol obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos. 46

- Figura 11: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ) 49
- Figura 12: Distribuições do diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas lipossomais extrusados vazios por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos. 49
- Figura 13: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ). 50
- Figura 14: Distribuições do diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos. 50
- Figura 15: Avaliação do índice de polidispersividade das micelas vazias. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de quatro experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. 52
- Figura 16: Avaliação do índice de polidispersividade das micelas com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). 53
- Figura 17: Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ). 55
- Figura 18: Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais não extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. 56
- Figura 19: Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). 56

Figura 20: Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média obtidos a partir de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). 57

Figura 21: Curva padrão para avaliação da eficiência de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais extrusados com RES produzidos no dia 09/05/2022. 58

Figura 22: Curva padrão para avaliação da eficiência de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais extrusados com RES produzidos no dia 31/05/2022. 59

Figura 23: Curva padrão para avaliação da eficiência de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais extrusados com RES produzidos no dia 01/08/2022. 59

Figura 24: Avaliação dos diâmetros hidrodinâmicos (Z-Ave) dos nanossistemas lipossomais híbridos extrusado com resveratrol antes e após nova passagem por membrana de 50 nm. 61

Figura 25: Distribuições do diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol antes e após a passagem da membrana de 50 nm. 61

## Lista de Tabela

Tabela 1. Tabela comparativa dos índices de tamanho hidrodinâmico de 51 todas as etapas de todos os experimentos realizados. Dados representados com as médias e seus desvios padrões respectivos.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Ag - Prata

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Humana

Au - Ouro

BHE - Barreira Hemato Encefálica

CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de Cálcio

CENARGEN - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico

DPM - Desvio Padrão da Média

EPM - Erro Padrão da Média

FDA - *U.S. Food and Drug Administration*

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Maghemita

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - Magnetita

GUV - Vesículas Unilamelares Gigantes

IR - Infravermelho

KCl - Cloreto de Potássio

LNANO - Laboratório de Nanobiotecnologia

LUV - Vesículas Unilamelares Grandes

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

NaCl - Cloreto de Sódio

NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de Sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato Monossódico

NMCs - Nanopartículas de Carbono

NPs - Nanopartículas

NPMs - Nanopartículas Magnéticas

NTCs - Nanotubos de Carbono

OE - Óxido de Etileno

OP - Óxido de Polipropileno

PAA - Poliaminoácido

PAMAM - Poliamidoamino

PC - L-alfa-Fosfatidilcolina

PdI - Índice de Polidispersividade

PEG - Polietilenoglicol

RES - Resveratrol

Si - Sílica

SiNPs - Nanopartículas de Sílica

SNC - Sistema Nervoso Central

SIRT1 - Enzima Sirtuína 1

SOD - Superóxido Dismutase

SUV - Vesículas Unilamelares Pequenas

TGPS - d-alfa-tococalciferol polietilenoglicol

TiNPs - Nanopartículas de Titânio

UV - Radiação Ultravioleta

Z-Ave - Tamanho Hidrodinâmico Médio

ZnONPs - Nanopartículas de Óxido de Zinco

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1- NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS	17
2.1.1- NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	17
2.1.1.1- NANOPARTÍCULAS DE OURO	17
2.1.1.2- NANOPARTÍCULAS DE PRATA	18
2.1.1.3- NANOPARTÍCULAS DE ZINCO	18
2.1.1.4- NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO	19
2.1.1.5- NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	19
2.1.2- NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA	20
2.1.3- NANOPARTÍCULAS DE CARBONO	21
2.1.3.1- GRAFENO	21
2.1.3.2- FULLERENO	22
2.1.3.3- NANOTUBOS DE CARBONO	22
2.1.3.4- PONTOS DE CARBONO	22
2.2- NANOPARTÍCULAS ORGÂNICAS	23
2.2.1- LIPOSSOMAS	23
2.2.1.1- FOSFATIDILCOLINA	25

2.2.2- MICELAS	26
2.2.3- NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	27
2.2.4- DENDRÍMEROS	29
2.3- COPOLÍMEROS TRIBLOCOS	29
2.4- RESVERATROL	31
3- OBJETIVOS	34
3.1- OBJETIVO GERAL	34
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4- MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1- LISTA DE REAGENTES	34
4.2- LISTA DE MATERIAIS	35
4.3- LISTA DE EQUIPAMENTOS	35
4.4- PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO MIMÉTICA DE LÍQUOR	36
4.5- PREPARAÇÃO DAS MICELAS VAZIAS COM PLURONIC F127	36
4.6- PREPARAÇÃO DAS MICELAS DE PLURONIC F127 E RESVERATROL	36
4.7- PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM FOSFATIDILCOLINA VAZIOS E COM RESVERATROL	37
4.8- MICROEXTRUSÃO DE NANOSSISTEMAS	37
4.9- ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	37

4.10- VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO RESVERATROL	38
4.11- AVALIAÇÃO DA TRANSPOSIÇÃO DA MEMBRANA COM POROSIDADE COMPATÍVEL A DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	39
4.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.13- VIABILIDADE TÉCNICA DA EXECUÇÃO DO PROJETO	39
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1- DESENVOLVIMENTO DOS NANOSSISTEMAS HÍBRIDOS	39
5.2- ANÁLISE DO TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS	40
5.3- ANÁLISE DOS ÍNDICES DE POLIDISPERSIVIDADE DAS NANOPARTÍCULAS	51
5.4- EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	57
5.5- PASSAGEM POR MEMBRANA COM POROSIDADE COMPATÍVEL COM A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	59
6- CONCLUSÃO	62
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

## 1- INTRODUÇÃO

Com o progressivo aumento da longevidade e, conseqüentemente, o envelhecimento da população mundial cada vez mais significativo, as doenças neurodegenerativas apresentam-se como fatores de grande relevância socioeconômica para o século atual (MARESOVA *et. al*, 2016). O sistema nervoso central (SNC), composto pelo cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal, é responsável pela coordenação e estímulo às funções vitais do corpo humano. Muitas de suas células são extremamente especializadas e com baixa capacidade de se regenerarem quando sofrem algum dano (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Do ponto de vista neurológico, as duas doenças mais prevalentes na população geriátrica e que determinam importantes impactos na qualidade de vida tanto dos pacientes quanto dos familiares são a demência de Alzheimer e a doença de Parkinson. Contudo, apesar de frequentes na população mundial, ainda não existem alternativas eficientes e seguras para impedir a progressão e até mesmo possibilitar a cura dessas doenças (DUARTE *et. al*, 2015; PASSERI *et.al*, 2022).

O SNC é protegido por uma estrutura dinâmica semipermeável, denominada barreira hemato-encefálica (BHE), que blinda eficientemente esta área de possíveis alterações ocasionadas por agentes nocivos oriundos do meio ambiente (ex: medicamentos, substâncias químicas, toxinas, microrganismos, etc), além de auxiliar na mediação de respostas fisiológicas de grande relevância (AZAD *et. al*, 2015). Neste contexto, um dos fatores limitantes para a evolução do tratamento de inúmeras neuropatologias é a transposição de medicamentos através da BHE (VIEIRA e GAMARRA, 2016).

O acesso ao SNC pode ser realizado por meio invasivo, como procedimentos cirúrgicos ou injeções intratecais; ou não invasivo, sendo que neste último caso depende da capilaridade celular e capacidade de acesso através da BHE (TELEANU *et. al*, 2018). O potencial de atravessar a BHE é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos métodos visando à prevenção quanto ao tratamento de várias patologias neurológicas. Contudo, além desta habilidade, é importante ter conhecimento de quais substâncias trariam benefícios ao entrar em contato com as células nervosas centrais (NEVES *et. al*, 2016).

A nanotecnologia representa um campo novo que utiliza estratégias inovadoras para o desenvolvimento e modificações de materiais com a variação de tamanho tipicamente entre 1-100 nm em pelo menos uma dimensão (FAISAL e KUMAR, 2017). Os esforços de multidisciplinaridade conferidos pela nanotecnologia podem levar a novas visões acerca das possibilidades de medicamentos para atravessar a BHE e, conseqüentemente, oferecer novas alternativas terapêuticas. Algumas características como tamanho reduzido, biocompatibilidade, tempo de circulação sanguínea prolongado e não toxicidade convergem em favor desta alternativa como possibilidade real a ser explorada (TELEANU *et. al*, 2018).

Várias subdivisões podem ser utilizadas para classificar os tipos de nanomateriais e nanossistemas que apresentam potencial para atravessar a BHE com base em características estruturais e físico-químicas. Entre elas destacam-se as nanopartículas poliméricas, lipossomas, dendrímeros, micelas, nanopartículas inorgânicas (ouro, sílica e carbono); cada uma com suas vantagens e desvantagens intrínsecas (KAPIL *et. al*, 2014).

Entretanto, apenas transpor este obstáculo biológico geralmente não é o bastante com vistas à alguma intervenção terapêutica ou mesmo preventiva, já que é necessário também ter conhecimento sobre qual substância poderia trazer benefícios efetivos ao SNC. Nesse sentido, dentre as várias opções atualmente consideradas pode ser citado o resveratrol (NEVES *et. al*, 2016; ANDRADE *et. al*, 2018). O resveratrol (trans-3,40,5-trihydroxystilbene, RES) é uma biomolécula com estrutura polifenólica que pode ser encontrada em uvas (vinho tinto), tegumentos de amendoins, chocolate amargo, açaí, mirtilo, nozes, entre outros alimentos e pode acarretar em benefícios para várias doenças neurológicas como Parkinson, Alzheimer e gliomas (GUO *et. al*, 2013). De fato, após a criação da Teoria do Paradoxo Francês na década de 80, a ingestão de vinho, bebida rica em resveratrol, começou a ser vista como um potencial auxílio na prevenção de doenças cardiovasculares (FERRIÈRES, 2004) e direta- ou indiretamente também aquelas relacionadas ao SNC (SUN *et. al*, 2002; GUO *et. al*, 2013; MIGUEL *et. al*, 2021).

Quando o RES é aplicado diretamente na corrente sanguínea, o fígado e as células epiteliais intestinais ficam responsáveis por degradá-lo em menos de duas horas. Além disso, apenas a forma *trans* é benéfica para o SNC e esta pode ser facilmente modificada para sua forma isomérica (*cis*) por meio de aumento da temperatura, mudança de pH, incidência de luminosidade, entre outros. Ou seja, o

RES apresenta limitações biológicas e farmacológicas que potencialmente atrapalham e até mesmo limitam o seu amplo uso terapêutico (LOUREIRO *et. al*, 2017).

Contudo, inúmeros estudos recentes têm comprovado que diferentes tipos de nanossistemas são capazes de auxiliar a entrega do RES no SNC por meio da transposição eficaz da BHE. Não obstante, outros estudos têm reportado diversos benefícios do RES na profilaxia e tratamento de muitas patologias neurológicas (NEVES *et. al*, 2016; ANDRADE *et. al*, 2018; SANTOS *et. al*, 2019). Desse modo, os potenciais benefícios do RES à saúde humana o torna um composto promissor para o seu uso como suplemento dietético, ingrediente alimentar funcional, cosmético e até mesmo como produto terapêutico. Nesse sentido, com o advento da nanotecnologia foi possível avaliar abordagens terapêuticas à base de RES que antes não eram viáveis. Um dos exemplos desta maior eficácia é a possibilidade de atravessar a BHE e entregar o RES diretamente no SNC, prevenindo a degradação e eliminação precoces.

Por conseguinte, as nanopartículas (NPs) consistem em materiais com tamanho que variam de 1 a 100 nm, mas que em certos casos podem ser consideradas abaixo de 999 nm, desde que apresentem ganhos de desempenho ou funcionalidade. Diversos fármacos utilizados atualmente podem ser incluídos ou incorporados em nanocompósitos (ex: hidrogéis) e outros nanomateriais (ex: lipossomas e NPs) ou até em suas superfícies. Estes meios nanocarreadores podem ser subdivididos em orgânicos ou inorgânicos. Entre aqueles inorgânicos incluem-se nanopartículas metálicas (de ouro, de prata, de zinco, de titânio e magnéticas); nanopartículas de silício e de carbono; e dentre os orgânicos podem ser citados lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas e dendrímeros (KAYSER *et. al*, 2005; TELEANU *et. al*, 2018).

Além da utilização de partículas de tamanho nanométrico ser uma estratégia interessante para atingir alguns alvos específicos, faz-se necessário pontuar a importância da estabilização destes nanossistemas, objetivando controle e encapsulamento de fármacos desejáveis por tempo mais prolongado. Com este intuito, pode-se citar a associação de nanossistemas lipossomais com poloxâmero. Estes são formados por copolímeros triblocos, que promovem uma vantajosa associação com lipossomas, tendo em vista atuarem como emulsificantes e estabilizadores, com poucos relatos de efeitos adversos (LI, *et. al*, 2018).

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As nanopartículas podem ser diferenciadas por meio de suas formas (esféricas, cilíndricas, tubulares, cônicas, espirais, entre outras), tamanhos, superfícies (uniformes ou irregulares), estrutura (cristalinas ou amorfas), além dos materiais os quais foram utilizados para sua produção. Neste sentido, podem ser classificadas como inorgânicas ou orgânicas (EALIA e SARAVANAKUMAR, 2017).

### 2.1- NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS

As nanopartículas inorgânicas de ouro (Au), prata (Ag), sílica (Si) e carbono, têm despertado muita atenção nos últimos anos devido às suas propriedades únicas e distintas da porção original que são derivadas, principalmente as características ópticas e elétricas (ALEX e TIWARI, 2015).

#### 2.1.1- NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Podem ser formadas principalmente por meio de duas estratégias: “*Top-Down*” e “*Bottom-Up*”. A primeira abordagem se dá pela desintegração de um volume maior inicial do metal por meio de processos físicos, como ablação a laser, radiação ultravioleta (UV) e infravermelho (IR), técnicas de aerossóis, entre outros. A segunda abordagem ocorre pela formação de nanopartículas a partir de átomos a serem unidos por meio da redução de íons metálicos em meios reacionais. Neste caso, um precursor metálico (tipicamente um sal) é empregado visando à produção das NPs e seguida da estabilização com moléculas de interesse, prevenindo a agregação de NPs e evitando o processo de precipitação geralmente indesejado (ALEX e TIWARI, 2015).

Nanopartículas metálicas vêm sendo utilizadas amplamente nas áreas biomédicas devido às suas propriedades físico-químicas, como grande área de superfície, além dos seus pequenos tamanhos e apresentarem alta reatividade às células e estabilidade em diversas temperaturas. Contudo, com vistas à veiculação de fármacos de modo geral nanopartículas metálicas são reconhecidas como apresentando baixa capacidade de transporte de quantidades expressivas adsorvidas em suas superfícies (NEJATI *et. al*, 2021).

##### 2.1.1.1- NANOPARTÍCULAS DE OURO

O ouro sempre despertou interesse dos humanos, desde a Idade Antiga, inicialmente por sua beleza, facilidade do seu manuseio e valor agregado, mas nas

últimas décadas a atenção a este material foi direcionada à indústria (especialmente da informática) e também à medicina. As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam características muito cobiçadas tanto pelas áreas da química, biologia, engenharia e medicina. Dentre suas particularidades mais valorizadas estão a possibilidade de criação de NPs estáveis, não tóxicas e facilmente sintetizadas (AMINA e GUO, 2020).

Deste modo, estas NPs de ouro já foram recobertas com RES visando à prevenção de autoaglomeração destas, pois este flavonoide atua como agente redutor na sua síntese e como estabilizante das AuNPs (MOHANTY *et. al*, 2014).

#### 2.1.1.2- NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A prata é um outro metal muito visado, ao longo das civilizações, por diversas funcionalidades, dentre elas as características almejavéis em fabricação de joias, ornamentação, cutelaria, propriedades antimicrobianas e antivirais. Nas últimas décadas, as nanopartículas de prata (AgNPs) também vêm sendo utilizadas como biomarcadores, sensores biológicos e químicos (LARA *et. al*, 2011), agentes antimicrobianos, revestimento de dispositivos biomédicos, carreadores de medicamentos, sondas de imagem, plataformas de optoeletrônicas e diagnósticos (LEE e JUN, 2019).

Tendo em vista o aprimoramento das AgNPs, assim como das AuNPs, elas podem ser associadas ao RES para aumento da capacidade antibacteriana em relação ao uso apenas do flavonoide isolado (PARK *et. al*, 2016).

#### 2.1.1.3- NANOPARTÍCULAS DE ZINCO

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) ocupam o terceiro lugar como as nanopartículas metálicas mais comuns a serem utilizadas no dia-a-dia. As partículas de óxido de zinco com tamanho entre 200-400 nm refletem a luz branca e por isso são muito utilizadas nos filtros solares. Em tamanho nanométrico (ZnONPs), estes materiais têm a capacidade de absorver e dispersar a luz ultravioleta (UV), além de captarem a luz visível em vários comprimentos de onda e, com isso, tornam o produto invisível aos olhos do consumidor. Além disso, também podem ser utilizadas com agentes antimicrobianos, cosméticos, tintas, vários tipos de coberturas, melhorando a condutividade térmica de materiais como borracha e na pesquisa científica. Ou seja, são capazes de apresentar propriedades físico-químicas e biológicas bem amplas (CZYZOWSKA e BARBASZ, 2020).

Dentre as propriedades biológicas, pode-se citar a possibilidade de associação do RES juntamente com as ZnONPs no combate a COVID-19, tendo em vista que o zinco é um antiviral natural e poderia haver benefícios na associação com um nutracêutico anti-inflamatório (KELLENI, 2021).

#### 2.1.1.4- NANOPARTÍCULAS DE TITÂNIO

O titânio é um elemento químico bastante abundante no planeta Terra, ocupando o nono lugar em distribuição na superfície. Não é encontrado em seu estado metálico, sendo geralmente extraído em suas formas oxidadas. Os seus compostos são considerados pouco reativos/solúveis e de baixa toxicidade, sendo por muitas ocasiões utilizado como grupo controle negativo em vários estudos (SHI *et. al*, 2013).

Por ser conhecido como praticamente inerte em tamanhos maiores de 100 nm, partículas de titânio são bastante utilizadas em alimentos, bases para pigmentos (devido ao seu brilho, potencial de refletividade e resistência à descoloração), filtros solares, pastas de dentes, entre outros. Contudo, quando se leva em consideração o tamanho nanométrico, os danos em potencial para sistemas biológicos podem aparecer. As nanopartículas de titânio (TiNPs) tem capacidade de gerar radicais livres de oxigênio, aumentando a chance do desenvolvimento de inflamações, malformações e até carcinogênese (WEIR *et. al*, 2012; GRANDE e TUCCI, 2016).

Contudo, as TiNPs, como forma de nanofolhas, também já foram estudadas como terapia oncológica na associação com o RES, tendo em vista a melhoria do potencial quimioterápico e redução de danos teciduais como efeitos colaterais da terapia instituída (XIANG *et. al*, 2019).

#### 2.1.1.5- NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Do ponto de vista funcional, em se tratando de NPs, é crucial o controle não apenas do seu tamanho e forma, mas também conseguir direcioná-las adequadamente. Alguns dos métodos mais utilizados envolvem o uso de ligantes (como anticorpos) em suas superfícies visando direcioná-las a alvos específicos. Outra possibilidade é o uso de campos magnéticos adequados que podem conduzir as nanopartículas magnéticas (NPMs) tanto para fins diagnósticos quanto terapêuticos (MODY *et. al*, 2010).

Tanto os óxidos de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  - maghemita e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  - magnetita), quanto o ouro, a prata, o zinco, cobalto, o níquel, entre outros podem ser utilizados com tais

fins, porém este tópico abordará mais especificamente os primeiros (óxidos de ferro), pois é o mineral mais magnético da natureza (sendo utilizado para várias aplicações biológicas). As propriedades magnéticas dependem especialmente de dois fatores: a força de suas ligações e a distância entre os átomos. No uso em seres vivos deve-se utilizar alguns critérios como serem estáveis tanto na temperatura corpórea (que pode ser capaz de modificar o mecanismo de ligação entre os átomos), quanto na água (com pH 7) quanto em meios fisiológicos, apresentarem tamanho pequeno o suficiente para não sofrerem precipitação pela ação dos campos gravitacionais e serem estáveis em meio coloidal. Para a preparação das NPMs são visados métodos de obtenção que mantenham um formato único, sejam altamente estáveis e apresentem uma distribuição de tamanhos controlável (AKBARZADEH *et. al*, 2012; MATERÓN, *et. al*, 2021).

As NPMs apresentam várias vantagens, como em geral não apresentarem toxicidade, não levarem a imunogenicidade, suas superfícies podem ser modificadas para possibilitar o transporte de diferentes materiais (por exemplo: fragmentos de DNA, medicações e compostos distintos), podem ser utilizadas como vetores inclusive de outros tipos de NPs, têm boa biocompatibilidade e algumas têm superparamagnetismo (apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo) (GUO *et. al*, 2018, MATERÓN, *et. al*, 2021).

Do ponto de vista neurológico, também já foram tentadas formulações de RES com nanopartículas magnéticas para entrega de drogas em nível cerebral, utilizando a via nasal como entrada (ABBAS *et. al*, 2021).

### 2.1.2 - NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

As nanopartículas de sílica (SiNPs) são obtidas por meio da reação de uma solução alcoólica de alcóxidos de silício na presença de um catalisador de amônia. Esta reação pode ser realizada por spray pirólise, micro-emulsão, moinho de esferas ou moagem de bolas, deposição química de vapor e sol-gel, a qual é tida como a melhor técnica para obtenção destas NPs (além de apresentarem boa relação custo benefício). Os diferentes formatos a serem obtidos (*nanorods/nanobastões*, *nanoesferas*, *mesoporos*, *nanofilmes*, *nanotubos*) são resultados de interações entre moldes, surfactantes e as condições em meio sol-gel. As SiNPs podem ser divididas em mesoporosas e nanoporosas (MEER *et. al*, 2015; JEELANI *et. al*, 2020).

As primeiras podem ser utilizadas em entrega de fármacos, pois vários compostos podem ser aprisionados em seus poros (que variam normalmente de 2-20 nm) e ainda existe a possibilidade de serem confeccionadas em formas específicas que facilitem a entrega dos produtos através da membrana celular (como nanorods/nanobastões ou nanoesferas). Também podem ser extremamente estáveis em condições térmicas, químicas e mecânicas extremas. Já os materiais nanoporosos (cujos poros possuem diâmetros menores de 100 nm) são estruturas intermediárias entre a substância ativa e o ambiente biológico (MEER *et. al*, 2015; JUÈRE e KLEITZ, 2018).

Pela capacidade de adsorção nestas NPs é possível acrescentar fármacos (tanto com características hidrofóbicas quanto hidrofílicas), ligantes alvo / ligantes de anticorpos / revestimento de polímeros para direcionamento ao local de ação das mesmas, contrastes para obtenção de imagem, transporte de DNA / RNA / proteínas, tudo isso visando diversas funções teranósticas. Pode-se inclusive exemplificar a sua associação com RES no controle de células cancerígenas de mama (NARAYAN *et. al*, 2018; KECECILER-EMIR *et. al*, 2021).

Além disso, também é possível confeccionar as SiNPs para que haja uma liberação do conteúdo dos seus poros em determinadas circunstâncias (gatilhos) de temperatura, pH, luminosidade, estímulos magnéticos ou ultrassonográficos ou elétricos, resposta química e enzimática. Quando os materiais derivados de sílica entram na corrente sanguínea são absorvidos pelo retículo endoplasmático, onde são degradados e posteriormente excretados pela urina (NARAYAN, 2018; JEELANI, *et. al*, 2020).

### 2.1.3- NANOMATERIAIS DE CARBONO

Os nanomateriais de carbono (NMCs) são amplamente utilizados em diversas áreas como aparelhos eletrônicos, condução de calor, emissão por campo, energia e biomedicina. Podem ser subdivididas em: grafenos, fulerenos, nanotubos de carbono e pontos de carbono (*carbon dots*).

#### 2.1.3.1- GRAFENO

O grafeno é reconhecido como o bloco fundamental derivado de carbono grafitico sendo possível a formação de fulerenos, nanotubos de carbono e grafite a partir de sua estrutura. Apresenta força mecânica superior a vários outros compostos

de carbono devido à sua forma geométrica em dupla folha e alta razão área de superfície por volume. Podem ser produzidos por meio de deposição térmica de vapores químicos, deposição de vapores químicos por plasma aprimorado, sublimação de cristal único de carboneto de silício e exfoliação (CHOUDHARY *et. al*, 2014).

#### 2.1.3.2- FULLERENO

Os fulerenos são nanomoléculas esferoidais e estáveis de carbono. Geralmente, são constituídas por 60 ou 70 átomos de carbono distribuídos tipo domos geodésicos. A temperatura de formação destes NMCs é de aproximadamente 2.000°C, sendo o rendimento da reação muito baixo, em torno de 5%. Apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, que pode ser contornada por meio de modificações de superfície. Podem ser utilizados em terapias fotodinâmicas, atividades antioxidante / neuroprotetora / antimicrobiana / antiviral, aplicações fotovoltaicas e limitadores ópticos (SANTOS *et. al*, 2010).

#### 2.1.3.3- NANOTUBOS DE CARBONO (NTCs)

Os NTCs são cilindros sem “emendas” formados a partir de folhas de grafeno, sendo compostos por parede simples (única folha) ou paredes múltiplas (várias folhas sobrepostas) (VARSHNEY, 2013). Estes podem atuar como semicondutores em aparelhos nanoelétricos. NTCs são considerados os materiais mais fortes e mais resistentes já descobertos e podem ser integrados a outros materiais para aprimorar as resistências destes, melhorar características mecânicas / de condutividade elétrica e térmica, blindagem eletromagnética. Podem ser formados a partir do método de descarga em arco, ablação a laser e deposição de vapores químicos (CHOUDHARY *et. al*, 2014).

#### 2.1.3.4- PONTOS DE CARBONO (*Carbon dots*)

Pontos de carbono são estruturas que não ultrapassam 10 nm em seu maior diâmetro. Tem como principal característica o potencial de bioluminescência que pode ser utilizado em diversas aplicações biomédicas (biossensores e contrastes biológicos). Dependendo do seu tamanho e revestimento de sua superfície podem emitir comprimentos de onda de luz distintos, facilitando sua identificação (WANG e QIU, 2016).

## 2.2 - NANOPARTÍCULAS ORGÂNICAS

As NP orgânicas podem ser empregadas em tecnologias inovadoras como bioanálises, modelos de estudo do comportamento da interação de moléculas, como reconhecimento entre moléculas, transdução de sinais e interação de proteínas fusionadas a componentes de membranas; associação com biomoléculas tais quais DNA ou anticorpos visando reações catalíticas e para entrega de fármacos, entre outros. Foram concebidas originalmente para redução do risco de citotoxicidade que pode ser gerada pelos polímeros não biodegradáveis e materiais metálicos. Não só na área médica é possível vislumbrar suas aplicações, como também podem ser utilizadas na purificação e remediação de água, produção de alimentos e até mesmo em embalagens (FERACCI *et. al*, 2012). Dentre os principais tipos de NP orgânicas, pode-se citar: lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas e dendrímeros.

### 2.2.1- LIPOSSOMAS

Os lipossomas (ou lipossomos) são partículas esféricas vesiculares formadas por fosfolipídeos associadas ou não a colesterol, apresentando a capacidade de formar pelo menos uma bicamada lipídica circundando o cerne aquoso capaz de encapsular tanto substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas (GONDA *et. al*, 2019; BÉLTRAN-GRACIA *et. al*, 2019).

É notável a semelhança desse padrão descrito para esse nanossistema com a membrana celular e, por isso mesmo, o padrão estrutural dos lipossomas facilita a sua interação com as membranas, além de auxiliar na entrada nas células (GONDA *et. al*, 2019). Os lipossomas foram descobertos em 1965 e a partir da década de 70 são avaliados como possíveis carreadores eficientes de fármacos para dentro do organismo (KABANOV *et. al*, 1992).

Os lipossomas têm como principais características o fato de serem biodegradáveis, não causarem danos expressivos ou rejeições nos sistemas biológicos que são introduzidos, não são tóxicos, são pouco imunogênicos e são termossensíveis (já que nas temperaturas de 40-41°C podem ter sua camada envoltória alterada e facilitar a liberação dos princípios ativos encapsulados). A primeira nanoformulação lipossomal a ser disponibilizada no mercado farmacêutico foi o Doxil<sup>®</sup>, aprovado em 1995 pelo FDA, que é utilizado no tratamento de câncer de ovário e no sarcoma de Kaposi dos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DESHPANDE *et. al*, 2013; BÉLTRAN-GRACIA *et. al*, 2019).

As propriedades dos lipossomas podem ser alteradas não apenas por sua composição, mas também pelo tamanho, carga de superfície, número de lamelas, rigidez da bicamada lipídica, modificações de superfície e método de preparação. Sua classificação pode ser de acordo com a quantidade de lamelas ou do seu tamanho. Com relação à quantidade de camadas, os lipossomas unilamelares apresentam uma única bicamada de fosfolipídeos e os lipossomas multilamelares consistem de mais de uma bicamada de fosfolipídeos separadas por água. As vesículas lipossomais mais utilizadas são as unilamelares, as quais ainda podem receber as nomenclaturas de pequenas vesículas unilamelares ou SUVs (“*Small Unilamellar Vesicles*”), grandes vesículas unilamelares ou LUVs (“*Large Unilamellar Vesicles*”) e vesículas unilamelares gigantes ou GUVs (“*Giant Unilamellar Vesicles*”) de acordo com seus tamanhos (diâmetros). As SUVs apresentam diâmetros comumente entre 20 e 50 nm (o tamanho entre 51 e 99 não foi citado na referência, mas também podem ser consideradas SUVs); as LUVs são comumente consideradas com diâmetros entre 100 nm e 999 nm; e já as GUVs têm como propriedade serem maiores de 1 µm (chegando até a atingir dezenas de micrômetros e ser comparável ao tamanho de uma célula eucariótica) (SANTOS e CASTANHO, 2002; OLUSANYA *et. al.*, 2018).

É importante salientar, que mesmo um nanossistema tão promissor quanto os lipossomas, estes têm várias limitações intrínsecas como: são difíceis de serem armazenados por muito tempo (semanas); geralmente são capturados pelo retículo endoplasmático; custo de produção elevado; e podem sofrer a ação do sistema imune, sendo retirados rapidamente da circulação (KABANOV *et. al.*, 1992).

Outra limitação apresentada pelos lipossomas é o controle da taxa de liberação das drogas de seu interior. Não só é importante conseguir realizar a entrega do fármaco, mas também controlar a velocidade a qual ela é liberada no alvo. Uma alternativa seria a associação com poloxâmeros tendo em vista criar poros na membrana lipossomal e assim obter um controle da liberação da substância carregada (KIM *et. al.*, 2014).

A fim do aprimoramento funcional dos lipossomas, além da técnica citada, podem-se associar vários agentes em sua superfície, aprimorando a estrutura com relação às barreiras celulares biológicas e fisiológicas. Dentre os constituintes que podem ser associados, cita-se: polietilenoglicol (PEG), aptâmeros, anticorpos, proteínas, peptídeos, carboidratos, dentre outras moléculas. Ainda neste tema, é possível fazer uma classificação específica: lipossomas convencionais, lipossomas-

PEG ou lipossomas peguados (contêm uma camada externa de PEG), lipossomas com ligantes alvo (visando facilitar o reconhecimento de porções específicas de um órgão como um tumor, por exemplo) e lipossomas multifuncionais (utilizados tanto no diagnóstico como no tratamento de alguns tumores sólidos – com potencial teranóstico, que envolve simultaneamente terapia e diagnóstico) (OLUSANYA *et. al*, 2018). Portanto, a teoria de Paul Ehrlich da “Bala Mágica” de 1906 faz ainda mais sentido prático atualmente. Segundo esta suposição, seria importante a criação de um mecanismo para direcionar o transporte de medicamentos para o tecido-alvo, apenas revelando sua eficácia no local pré-determinado (SANTOS e CASTANHO, 2002; DESHPANDE *et. al*, 2013).

Dentre os componentes principais de lipossomas destacam-se os fosfolídeos que são lípidos complexos presentes nas células e que são constituintes de parede dos lipossomas, entre eles com destaque para a fosfatidilcolina.

#### 2.2.1.1- FOSFATIDILCOLINA

A fosfatidilcolina é um glicerofosfolípido produzido nos mamíferos por meio da colina, obtida tanto dos alimentos ricos em vitamina B8 quanto da metabolização da fosfatidiletanolamina (LI e VANCE, 2008). Pode ser considerado um importante substrato na produção de acetilcolina, neurotransmissor cerebral ligado à eficiência da memória e, portanto, com potencial como adjuvante em terapias relacionadas ao SNC (LI *et. al*, 2015).

Há também a possibilidade de obter este composto de forma natural, por meio de extrações de materiais de origem animal (por exemplo derivada de ovos de galinhas e de salmão) e de origem vegetal (derivado da soja), assim como de origem artificial. A obtenção de fosfatidilcolina de origem natural apresenta menor custo quando comparada aos de origem sintética ou semi-sintética, trazendo benefícios consideráveis no desenvolvimento de possíveis produtos. Além disso, podem ser purificados em diferentes níveis para o uso farmacológico, sendo que quanto maior a pureza do fosfolípido extraído, maior seu valor de mercado (GRIT e CROMMELIN, 1993; LI *et. al*, 2015).

A fosfatidilcolina derivada da soja é utilizada amplamente para a constituição de inúmeras nanopartículas lipídicas e lipossomas participando de sistemas de entrega de fármacos, apresentando vantagens, por exemplo, em auxiliar na liberação controlada de RES associada à melhora da resposta do estresse celular e controle do

espessamento da região intimal dos vasos (AMRI *et. al*, 2012), melhorando ainda a solubilidade de alguns fármacos como insulina para realização de um entrega mais eficiente (LIU *et. al*, 2007).

### 2.2.2- MICELAS

Outro tipo de nanossistemas orgânicos com alto potencial farmacológico seja pela simplicidade de produção e custo baixo são as micelas. Micelas são nanoestruturas anfipáticas (que apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas), geralmente adquirindo a forma esférica ao interagir com a água (HUSSEINI e PITT, 2009). Micelas têm uma região hidrofílica/polar (mais externa) e hidrofóbica/apolar (mais interna), o que possibilita carregar e transportar substâncias de característica hidrofóbica em seu interior com grande eficiência. Importante ressaltar que a porção apolar é geralmente constituída por hidrocarbonetos de ácidos graxos de cadeia longa, aumentando a eficiência de interação e transporte. Portanto, a maioria das micelas apresentam hidrocarbonetos lipídicos, mas também existem as detentoras de componentes poliméricos, denominadas micelas poliméricas, sendo que usualmente apresentam de 50 a 200 nm de diâmetro (MOURYA *et. al*, 2011).

Uma das principais vantagens em apresentar esta estrutura é a possibilidade das micelas de proteger uma droga lipofílica (geralmente) que se encontra no interior da estrutura. Nesse sentido, as micelas poliméricas vêm sendo cada vez mais utilizadas nos últimos anos não só como sistema eficaz de entrega de fármacos, mas também como surfactantes capazes de modificar a forma e as propriedades de outros nanossistemas para formação de nanossistemas híbridos. Dentre as principais vantagens das micelas destacam-se: o poder de aumentar a solubilidade e biodisponibilidade; de acumular em regiões específicas após transporte na corrente sanguínea; de poderem ser melhoradas por meio da incorporação de direcionadores para alvos específicos em sua superfície para aperfeiçoamento do seu alvo terapêutico; e é possível sua fácil reprodução com um custo acessível (TORCHILIN, 2001).

Além das características favoráveis já citadas, também é notável a melhoria da capacidade das micelas poliméricas de agir como direcionadoras para tumores (facilitando a penetração da medicação no local), modificando o tempo de circulação da droga no organismo e conseguindo proteger os princípios ativos da oxidação e da metabolização indesejáveis na corrente sanguínea. Os cernes destes nanossistemas

podem ser de diversos materiais, dentre eles os óxidos de polipropileno, poliaminoácidos (PAA), poliésteres ou combinados com polietilenoglicol (PEG) (CROY e KWON, 2006).

Importante salientar que mesmo esses nanossistemas micelares conseguindo facilitar a entrega de fármacos, também têm que ser avaliados com certa cautela. Surfactantes conhecidos como Cremofor EL e Polissorbato 80 não são inertes e assim podem ser biologicamente ativos, ou seja, podem provocar reações anafiláticas, hiperlipidemia e neurotoxicidade. Devido a estas e outras limitações, teve início a pesquisa em blocos de copolímeros de micelas a fim de melhorar a solubilidade, estabilidade e capacidade de entrega de drogas (CROY e KWON, 2006).

Esses blocos anfifílicos de copolímeros ainda são motivo para várias pesquisas e desenvolvimentos tecnológicos com vistas às suas aplicações em nanofármacos. Diferentemente das micelas convencionais que apresentam formas esféricas, os agregados micelares citados podem adquirir morfologias distintas tais quais: esferas, bastonetes, bastonetes ramificados, vesículas, túbulos, lamelas, entre outros. Os componentes não-esféricos apresentam essas variedades devido à diferença do tamanho da porção hidrofóbica em relação à parte hidrofílica. Além disso, a composição do copolímero formador pode alterar a capacidade de maleabilidade do material, além de interferir em suas relações e interações com os princípios ativos (TORCHILIN, 2001).

Estas estruturas mais complexas, com segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, são capazes de se auto-organizar em ambientes aquosos, apresentando capacidade dissolutiva de componentes gordurosos ou hidrofóbicos como é visto também em surfactantes de baixa massa molecular formadores de micelas. Entretanto, estes blocos de polímeros são mais estáveis e têm mais facilidade em agregar e incorporar moléculas no seu cerne. Dentre os polímeros mais aptos para formação de micelas quando em associação, pode-se citar o PEG juntamente com o PAA (BAE e KATAOKA, 2009).

### 2.2.3- NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Polímeros são macromoléculas formadas por uniões covalentes de monômeros, formando cadeias lineares ou ramificadas. Esses monômeros podem ter qualquer estrutura, desde que apresentam dois grupos funcionais que permitem interagir com outras estruturas monoméricas. De acordo com estas propriedades,

podem ser confeccionadas nanoestruturas poliméricas com propriedades específicas de acordo com seu alvo e o fármaco a ser entregue (BEGINES *et. al*, 2020).

As nanopartículas poliméricas apresentam uma faixa de tamanhos entre 10 a 999 nm de polímeros biodegradáveis, já que a biocompatibilidade é fator essencial para sua utilização em entrega de fármacos, produção de vacinas, cosméticos, entre outras aplicações. Geralmente promovem a estabilidade dos fármacos a serem entregues, têm baixo custo para produção em larga escala e podem ser confeccionadas com especificidade para seus alvos (KAYSER *et. al*, 2005).

As nanopartículas poliméricas realizam papel de entrega de drogas, pois podem ser facilmente manipuladas a fim de levar os fármacos para um alvo específico, sendo estáveis quando expostas à corrente sanguínea. As drogas que são carregadas em nanopartículas poliméricas podem ser dissolvidas, aprisionadas, encapsuladas ou ainda acopladas na matriz. A depender do mecanismo de confecção, as nanopartículas poliméricas podem ser tipo nanocápsulas (a droga fica restrita em uma cavidade que é circundada por uma única membrana polimérica) ou tipo nanoesféricas (são nanossistemas nos quais a droga fica uniformemente dispersa na matriz) conforme mostrado na Figura 1 (YADAV *et. al*, 2012).

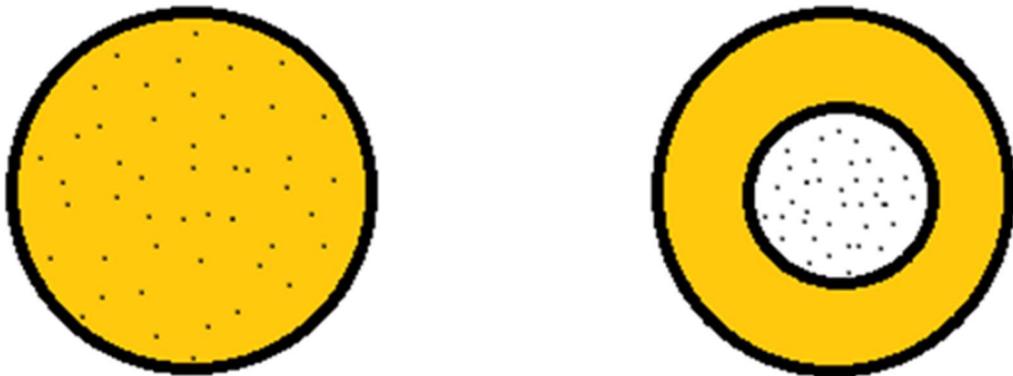


Figura 1: Representação esquemática de nanoesfera (imagem da esquerda) e nanocápsula (imagem da direita).

As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em várias subclassificações que são importantes para auxiliar na escolha da melhor partícula a ser utilizada para veiculação e aplicação de cada princípio ativo com base na origem, mecanismo de liberação, método de preparação, entre outros (YADAV *et. al*, 2012).

#### 2.2.4- DENDRÍMEROS

O termo dendrímero advém do grego “déndron” que significa árvore ou galhos e “meros” que significa parte ou porção. Isto significa que estruturas de dendrímeros têm morfologia semelhante às das ramificações de uma árvore, assim como ocorrem nos neurônios e suas ramificações também chamadas de dendrímeros (BOAS *et. al*, 2007). Estruturas dendriméricas foram sintetizadas pela primeira vez em 1978 (recebendo o nome de “moléculas cascatas”), porém só em 1985 foram descritos por Tomalia sendo formados a partir de monômeros de poliamidoamino (PAMAM) (TOMALIA *et. al*, 1985; CHAUHAN, 2018; MIRANDA, 2014). Estas nanoestruturas vêm sendo utilizadas com a finalidade de realizar entrega de drogas, entrega de genes, solubilização de drogas, marcação de substâncias, diagnóstico, catalisador químico e como ligante polivalente para reações biológicas (GAJBHIYE *et. al*, 2009).

Podem ter tamanhos entre 3 e 10 nm e suas ramificações partem de um único átomo, como o de nitrogênio. A partir deste centro, são associados vários outros elementos (como carbono, fósforo e nitrogênio) por meio de reações químicas e começam a ser formadas várias camadas concêntricas radiais ramificadas. Suas superfícies são modificadas de acordo com os grupamentos terminais de seus monômeros funcionais (MIRANDA, 2014).

A síntese deste tipo de nanomaterial por meio de unidades ramificadas de polímeros (dendrons) pode ser realizada pelo método divergente ou pelo método convergente. Quando a construção se dá a partir da incorporação de monômeros no núcleo ou core é chamado de divergente. Já no segundo caso, os monômeros são criados à parte e só depois associados em um núcleo central (MIRANDA, 2014).

A principal característica desta nanomolécula dendrimérica é dada pela geração a qual ela pertence, sendo determinada pelo seu crescimento do seu diâmetro de maneira linear (CHIS *et. al*, 2020), assim como existe ainda a possibilidade de classificar os dendrímeros de acordo com sua estrutura química e suas características (PUSHKAR *et. al*, 2006).

#### 2.3- COPOLÍMEROS TRIBLOCOS (PLURONIC)

Dentre os componentes que podem ser utilizados para o desenvolvimento de micelas poliméricas, nanopartículas poliméricas, nanocompósitos e mesmo como estabilizantes de nanopartículas inorgânicas, têm sido amplamente relatados e utilizados os denominados copolímeros triblocos. Também conhecidos como

poloxâmeros, são copolímeros em triblocos lineares iônicos compostos de um grupo central de óxido de polipropileno (OP) hidrofóbico cercado por duas cadeias hidrofílicas de óxido de etileno (OE), se organizando numa estrutura tipo A-B-A: OE-OP-OE. O número de cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas fornecerão diferentes características ao composto (KABANOV *et. al*, 2002; RAO *et. al*, 2016).

Uma característica importante deste material é que sua solubilidade se modifica de acordo com a temperatura a qual ele está sendo exposto. Por exemplo, na temperatura do corpo humano (37°C), a região OP é insolúvel e as regiões OEs são hidrossolúveis (KABANOV *et. al*, 2002; ALMEIDA *et. al*, 2020).

Os poloxâmeros podem ser acrescentados às membranas de lipossomas ou outros tipos de nanossistemas contribuindo para: 1- a formação de estruturas esféricas e lamelares as quais podem auxiliar na estabilidade da membrana dos sistemas de entrega de fármacos; 2- a introdução de grupamentos amino primários auxilia na ligação de outros grupamentos distintos nesta membrana; 3- as presenças de moléculas carregadas positivamente aumentam suas afinidades pela membrana também auxiliando na estabilidades da mesma. Os poloxâmeros (também denominados Pluronic como nome comercial) têm diversas aplicações farmacêuticas, como emulsificantes e estabilizantes, sendo considerados seguros pelo Federal Drug Administration (FDA) e já utilizados em compostos com vias de administração oftálmica, oral e parenteral (RAO *et. al*, 2016; GYULAI *et. al*, 2016; LI *et. al*, 2018).

A nomenclatura de cada copolímero é dada primeiro por uma letra que corresponde ao seu estado em temperatura ambiente: L= líquido, P= pastoso e F= flocos. Depois segue-se de dois ou três números, sendo que o primeiro número (ou os dois primeiros números no caso de três dígitos) multiplicados por 300 indicam o peso molecular da porção hidrofóbica e o último dígito à direita multiplicado por 10 dá a porcentagem de óxido de polietileno. Como exemplos de pluronic pode-se citar o F127, P85 e L61 (em ordem crescente de forças hidrofóbicas) (BATRAKOVA e KABANOV, 2008).

O Pluronic F127 encontra-se em estado líquido a baixas temperaturas (4-5°C), porém adquire características de gel à temperatura corpórea humana. Ele se destaca por suas inúmeras utilidades na área médica como efeitos bacteriostáticos contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* e citotóxicos contra células neoplásicas (ALMEIDA *et. al*, 2020). Também pode ser utilizado como biotinta em impressoras 3D para engenharia

de tecidos (SHAMMA *et. al*, 2022), produção de hidrogéis para redução de toxinas bacterianas durante infecções sistêmicas (ZOU *et. al*, 2021), auxilia no desbridamento de tecido necrótico em feridas e cicatrização de pele com queimaduras, aumentar potencial de quimioterápicos no tratamento para o câncer, realizar entrega de genes e reduzir adesões após procedimentos cirúrgicos (DOMINGUEZ-DELGADO *et. al*, 2016).

Os poloxâmeros também possuem a capacidade de se associarem a lipossomas em nanossistemas híbridos aumentando suas estabilidades a diferentes temperaturas e pHs de compostos hidrofóbicos, além de promover maior disponibilidade biológica dos mesmos (LI *et. al*, 2018).

#### 2.4- RESVERATROL (RES)

O resveratrol (RES) (3,4',5-trihidroxiestilbeno;  $C_{14}H_{12}O_3$ ) é um polifenol não flavonoide que pode ser obtido de várias fontes vegetais, destaque para: uvas, amendoim, ruibarbo e amêndoa do cacau, entre outros. Do ponto de vista da estrutura molecular, o RES pode ser encontrado naturalmente como dois isômeros: *trans* (forma ativa) e *cis* (resultante da forma *trans* quando exposta a radiação UV, calor e luz) (Figura 2). Essa molécula tem característica lipofílica, sendo mais facilmente solubilizada em solventes orgânicos como etanol (FONSECA-SANTOS e CHORILLI, 2020).

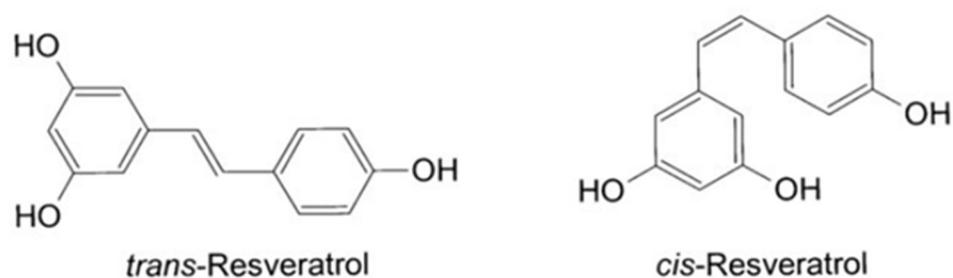


Figura 2: Representação da estrutura química dos tipos de resveratrol: *trans* e *cis*.

O uso da nanotecnologia pode auxiliar tanto no aumento da solubilidade quanto na estabilização do RES, reduzindo sua taxa de degradação. O RES apresenta propriedades anti-inflamatórias, anticâncer, anti apoptose, reduzindo os efeitos de diversas patologias e, em alguns casos, até mesmo sendo capaz até de impedir as suas progressões (FONSECA-SANTOS e CHORILLI, 2020). Isso porque tem sido

demonstrado que o RES atua no bom funcionamento mitocondrial, podendo auxiliar na proteção contra doenças neurodegenerativas (JARDIM *et. al*, 2017). Na cadeia respiratória mitocondrial, o  $O_2$  é utilizado como aceptor final de elétrons, sendo reduzido a  $H_2O$ . Entretanto, aproximadamente 5% destas reações geraram o ânion superóxido  $O_2^-$ , forma importante de produção de radicais livres na natureza. Um dos principais mecanismos de defesa deste ânion é a enzima superóxido dismutase (SOD), a qual é capaz de transformar o radical  $O_2^-$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . O RES aumenta o potencial de ação da SOD, sendo capaz de reduzir as taxas de radicais livres (ANTUNES-NETO, 2012).

A presença em excesso de radicais livres interfere diretamente em vários processos degenerativos cerebrais, causando danos em vários componentes celulares como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, que podem levar a danos irreversíveis. Assim, a utilização do RES em decorrência da sua propriedade antioxidante tem sido estudada também em doenças neurodegenerativas, como a demência de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla (FONSECA-SANTOS e CHORILLI, 2020). Dois marcadores frequentes na demência de Alzheimer (emaranhados neurofibrilares e as placas senis - depósitos de placas beta-amiloide) poderiam ser combatidos pela ação direta do RES em manter um bom funcionamento mitocondrial (RAHMAN *et. al*, 2020).

O RES também ativa a enzima sirtuína 1 (SIRT1), sendo que esta via inibe a ativação das células *natural-killers* (NK), com isso protege o cérebro do depósito de compostos do tipo beta-amiloide. A SIRT1 é uma histona deacetilase NAD dependente cuja função é importante para a manifestação de quadros neurodegenerativos. Além disso, auxilia no processo de reparo celular, reduzindo os efeitos do envelhecimento e aumentando o metabolismo. Sob estes aspectos, o RES também aumenta o potencial de reações anti-inflamatórias e antioxidantes, podendo, inclusive, apresentar efeito benéfico para outras doenças do SNC como doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e tumores cerebrais do tipo glioblastoma (SOUSA *et. al*, 2020; RAHMAN *et. al*, 2020).

Não obstante aos benefícios descritos acerca do RES, é importante mencionar que alguns estudos em humanos mostram resultados divergentes com relação aos seus benefícios. Os efeitos horméticos, potenciais estimulantes (consequentemente benéficos) em baixas dosagens e de inibição (efeitos tóxicos) em altas dosagens, podem explicar esta variação de resultados. Outrossim, em estudos clínicos, algumas

das possíveis causas para os resultados conflitantes são: 1) a seleção dos pacientes que farão a suplementação com o composto polifenólico; 2) a dosagem utilizada; e 3) a duração da suplementação (SHAUTO *et. al*, 2020).

Ao utilizar o RES em doses muito elevadas pode-se observar alterações como: redução da atividade do sistema de defesa antioxidante, aumento de radicais livres, maior peroxidação lipídica, inibição da função imune, indução à senescência e disruptura do potencial de membrana das mitocôndrias (SHAUTO *et. al*, 2020).

Para doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, ainda não existe cura, nem prevenção e com o progressivo envelhecimento da população mundial, estes quadros estão cada vez mais frequentes. As medicações disponíveis visam atualmente ao alívio dos sintomas (por exemplo, a levodopa nos pacientes com Parkinson) e redução da velocidade de progressão das patologias, tais quais os anticolinesterásicos nos pacientes com demência de Alzheimer (DURÃES *et. al*, 2018).

Estudos *in vitro* e *in vivo* (MISRA *et. al*, 2016; BAYSAL *et. al*, 2017; ARISOY *et. al*, 2020) destas medicações utilizando nanotecnologia já foram tentados com relativo sucesso para travessia da barreira hemato-encefálica e melhoria dos seus efeitos colaterais, contudo ainda não foi obtido dados concretos quanto à prevenção ou a cura destas patologias.

Segundo dados do Global Burden of Disease, 2017, nos Estados Unidos entre 1990 e 2017, as três patologias neurológicas que mais retiraram dias de vida útil de uma pessoa foram acidente vascular cerebral seguido de síndromes demenciais e enxaquecas.

Existe uma importância não apenas social, mas também econômica ao se abordar doenças neurodegenerativas e seus impactos. Um dos principais incentivos às pesquisas com RES é a sua capacidade de agir como potente substância anti-inflamatória impedindo a progressão de insultos após lesão inicial (ASHRAFIZADEH *et. al*, 2020; MIGUEL *et. al*, 2021). Contudo, o RES também pode levar a efeitos colaterais indesejados a depender da sua dosagem. Em dosagens maiores que 1 g por dia podem apresentar manifestações gastrointestinais (náuseas, diarreia e dor abdominal) (PATEL *et. al*, 2011).

Uma grande vantagem da nanotecnologia seria impedir ou pelo menos minimizar estes efeitos indesejados, potencializando ao máximo os efeitos benéficos do RES, sem necessariamente utilizar grandes dosagens para tal, tentando evitar o

efeito hormético. Assim, por meio de distintos nanomateriais e estratégias seria possível reduzir algumas limitações ao uso do composto polifenólico, assim como melhorar a baixa solubilidade, reduzir a fotossensibilidade e tentar conter a grande taxa de degradação metabólica que a substância será submetida ao entrar no organismo (SHARIF-RAD *et. al*, 2021).

O RES já foi associado a diversos tipos de nanomateriais objetivando distintas aplicações. É importante entender que a escolha do nanossistema responsável pela veiculação do fármaco pode influenciar diretamente tanto na proteção do mesmo até região alvo, quanto na eficácia da entrega.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1- OBJETIVO GERAL**

- Desenvolver, caracterizar e otimizar nanossistema híbrido visando à veiculação de resveratrol para possíveis aplicações neurofarmacológicas.

#### **3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Produzir lipossomas de fosfatidilcolina com poloxâmero complexado com resveratrol;
- Caracterizar o tamanho dos nanossistemas produzidos contendo resveratrol;
- Avaliar a eficiência de encapsulamento do resveratrol por nanossistemas híbridos de lipossomas com poloxâmero;
- Avaliar a capacidade de transposição dos nanossistemas híbridos contendo resveratrol por membrana compatível com a porosidade da barreira hematoencefálica.

### **4- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1- LISTA DE REAGENTES**

- Água ultrapura tipo I (Gehaka, Brasil);

- Bicarbonato de sódio -  $\text{NaHCO}_3$  (Neon, Brasil);
- Cloreto de cálcio -  $\text{CaCl}_2$  (Dinâmica, Brasil);
- Cloreto de magnésio -  $\text{MgCl}_2$  (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Cloreto de potássio -  $\text{KCl}$  (VETEC, Brasil);
- Cloreto de sódio -  $\text{NaCl}$  (Proquimios, Brasil);
- Clorofórmio (Dinâmica, Brasil);
- Etanol PA (Dinâmica, Brasil);
- Fosfato monossódico -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Proquimios, Brasil);
- Glicose (VETEC, Brasil);
- L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina P5638 - PC (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Pluronic<sup>®</sup> F127 (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Resveratrol  $\geq 99\%$  - RES (HPLC) (Sigma-Aldrich, Alemanha);

#### 4.2- LISTA DE MATERIAIS

- Balão de fundo redondo de 100 mL (PHOX, Brasil)
- Becker 25 mL (PHOX, Brasil)
- Becker 250 mL (Pyrex, Alemanha)
- Filme de laboratório (Parafilm M<sup>®</sup>, American National 26 Can, EUA);
- Filtros 10 mm (Avanti, EUA)
- Luva para procedimento não cirúrgico (Super Max, Malásia);
- Membranas de policarbonato de 0,1  $\mu\text{m}$  e 0,05  $\mu\text{m}$  (Avanti, EUA)
- Microtubos de polipropileno do tipo Eppendorf de 1,5 mL (Olen, China);
- Ponteiras com filtro
- Ponteiras simples
- Proveta 100 mL (PERLAB, Brasil)
- Ultrafiltro tipo Amicon Ultra 10K (Millipore, Irlanda)

#### 4.3- LISTA DE EQUIPAMENTOS

- Balança eletrônica de precisão (Q520-3, Quimis, Brasil)
- Banho ultratermostático (Q214M2, Quimis, Brasil)
- Bomba de vácuo-compressor (LT 40, LIMATEC, Brasil)
- Espectrofotômetro UV-Vis (Quimis)
- Evaporador rotativo (Quimis)
- Microcentrífuga refrigerada (5418 R, Eppendorf)

- Micropipetas P10, P20, P200 e P1000 (Labmate, HTL)
- Mini-extruder Set (Avanti)
- Vortex multifuncional (Kasvi)
- Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern, Reino Unido)

#### 4.4- PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO MIMÉTICA DE LÍQUOR

Seguindo o protocolo com adaptações do Cold Spring Harbor Protocols, 2011, para produção de solução mimética de líquido para a realização dos testes de formulação foram utilizadas as seguintes sais/concentrações: NaCl 119 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26,2 mM, KCl 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM e glicose 10 mM. Assim, para produzir 100 mL de solução foram utilizados 0,6955 g de NaCl, 0,2201 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,0186 g de KCl, 0,0119 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0264 g de MgCl<sub>2</sub> e 0,1801 g de glicose colocados em um Becker e em seguida adicionada com auxílio de uma proveta água tipo I suficiente para completar 100 mL, seguido de agitação magnética por 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM (0,0367 g). Esta solução foi filtrada em 0,22 µm, posteriormente subdividida em alíquotas de 12 mL as quais foram seladas com Parafilm e armazenadas na geladeira a 4°C.

#### 4.5- PREPARAÇÃO DAS MICELAS VAZIAS DE PLURONIC F127

Para preparação de complexos micelares de poloxâmero foi utilizada como referência a concentração micelar crítica de 3,3 g/L de Pluronic F127 (GYULAI *et. al*, 2016). Para tal, em balança analítica, foi pesado 0,0033 g de Pluronic F127 e colocado em um balão de fundo redondo de 100 mL ao qual foi adicionado 1 mL de etanol PA e submetido ao evaporador rotativo Quimis a 25°C por 2 h. O filme formado foi reconstituído com 1 mL de solução de líquido mimético, após avaliação do mesmo por espalhamento de luz dinâmico (DLS) para certificar a ausência de estruturas em nanoescala na solução armazenada.

#### 4.6- PREPARAÇÃO DAS MICELAS DE PLURONIC F127 E RESVERATROL

Seguindo metodologia adaptada de RAO *et. al* (2016) foram utilizados Pluronic 0,0033 g, resveratrol 142 µL (de uma concentração inicial de 0,2327 mg/mL) e etanol PA 858 µL com quantidade suficiente para completar 1 mL. A solução preparada foi mantida em balão de fundo redondo de 100 mL, revestido de papel alumínio, tendo em vista que o resveratrol é fotossensível, e submetida ao evaporador rotativo Quimis

a 25°C por 2 h. Posteriormente o filme formado foi reconstituído com líquor mimético de modo similar ao descrito para as micelas vazias.

#### 4.7- PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM FOSFATIDILCOLINA VAZIOS E COM RESVERATROL

Para produção de filme de lipídico, foram realizadas adaptações às metodologias descritas por GYULAI *et. al* (2016) e LI *et. al* (2018), onde foi utilizado 0,013 g de L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina (PC) diluída em 1 mL de clorofórmio dentro de um balão de fundo redondo de 100 mL e submetido a agitador vórtex multifuncional na velocidade 2.640 rpm. Todo este processo foi realizado dentro do ambiente de capela à exaustão. Posteriormente, o balão com a solução foi submetido ao evaporador rotativo a 40°C por 1 h. Depois, este filme formado foi reconstituído com as micelas produzidas previamente (de Pluronic somente – vazia ou de Pluronic complexado a resveratrol) e submetido ao agitador vórtex multifuncional na velocidade 2.640 rpm por 5 minutos. A suspensão obtida era armazenada a 4°C e posteriormente analisada por espalhamento de luz dinâmica (DLS) para avaliação da polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico.

#### 4.8- MICROEXTRUSÃO DE NANOSSISTEMAS

No intuito de obter uma suspensão com maior homogeneidade no tamanho das NPs, foi realizado o processo de microextrusão. As NPs vazias e contendo resveratrol foram submetidas a essa atividade sendo utilizado um Mini Extruder Set com filtros de 100  $\mu$ m e membrana de 100 nm de poros de exclusão. Primeiro a membrana foi hidratada com a solução mimética de líquor, visando reduzir a perda do material a ser extrusado. Em seguida, foram realizadas 13 passagens manuais consecutivas através da membrana e posterior análise por DLS para verificação das distribuições de tamanhos dos nanossistemas produzidos.

#### 4.9- ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

Utilizando o aparelho Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern, Reino Unido) foi realizada análise dos nanossistemas lipossomais por espalhamento de luz dinâmico, em modo automático, utilizando laser HE-NE (4 mW) com ângulo de 173° operando a 633 nm.

Cada etapa dos experimentos (produção micelas vazias, micelas com RES, lipossomas vazios, lipossomas com micelas contendo RES, lipossomas extrusados vazios e lipossomas extrusados com micelas contendo RES) foi repetida por 3 vezes (experimentos ou lotes) para testar sua reprodutibilidade. Cada experimento era submetido a 3 análises por DLS e cada triplicata era realizada sem diluição, utilizando a cuveta DTS 0012 e obtendo os índices de polidispersividade (Pdl) e avaliação do tamanho hidrodinâmico (Z-Ave).

#### 4.10- VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO RESVERATROL

Em centrífuga refrigerada foram distribuídos diametralmente 2 microtubos com ultrafiltros contendo capacidade de 0,5 mL dos lipossomas extrusados com micelas de Pluronic vazias e 0,5 mL do lipossoma extrusado com micelas de Pluronic com RES. Foram realizados 3 ciclos de centrifugação independentes sendo o primeiro ciclo por 10 minutos a 2.000 rpm, seguido de um ciclo de 20 minutos a 4.000 rpm e por último um ciclo de 30 min a 4.000 rpm. A fração retida no ultrafiltro foi colocada novamente na centrífuga por 10 minutos a 4.000 rpm, na posição invertida para coleta dos nanossistemas em novo recipiente. A parte que passou no ultrafiltro foi aspirada com auxílio de micropipeta e colocada em novo microtubo. Para avaliar a quantidade de RES em cada amostra foi utilizado um espectrofotômetro UV/Visível. Primeiro foi lida em cubeta de quartzo uma solução com 1 mL de etanol que foi considerada a medida zero ou “branca”. Depois colocou o equipamento foi ajustado para o comprimento de onda de 310 nm (máximo de absorção do RES). Como foi trabalhado com uma solução final dos lipossomas de um décimo da concentração, teve de ser feita uma solução inicial de resveratrol com etanol de um décimo da concentração inicial, ou seja, 14,2 µL de resveratrol diluído em 985,8 µL de etanol PA. Os dados eram colocados em uma curva de excel, fornecendo uma curva de diluição. Por último, 100 µL das amostras que foram submetidas a filtragem foram diluídas em 900 µL de etanol PA e verificadas suas leituras. Todo o experimento, desde a produção dos lipossomas extrusados, vazios e com RES, e a verificação da eficiência de encapsulamento foi realizada três vezes a fim de verificar a reprodutibilidade. A eficiência de encapsulamento é dada pela fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento: Droga total - Droga livre} \times 100\%$$

#### 4.11- AVALIAÇÃO DA TRANSPOSIÇÃO DA MEMBRANA COM POROSIDADE COMPATÍVEL À DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Para simular condição similar àquela encontrada na BHE foi realizada produção de um novo lote de lipossomas extrusados (com membrana de 100 nm) com RES, os quais após foram avaliados por DLS. Posteriormente, a amostra foi submetida a uma passagem única manual por membrana de 50 nm (porosidade similar àquela da BHE) utilizando sistema de Mini-Extruder Avanti e reavaliados por DLS para determinar o diâmetro e Pdl.

#### 4.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) ou desvio padrão da média (D.P.M.) utilizando programas computacionais para obtenção de gráficos. A análise dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) por meio do programa PAST de HAMMER *et. al*, 2001, com nível de significância fixado em  $P < 0,05$  e foi utilizado Teste de Tukey tendo em vista verificar diferença entre os grupos analisados.

#### 4.13- VIABILIDADE TÉCNICA DA EXECUÇÃO DO PROJETO

O projeto foi realizado no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), coordenado pelo Dr. Luciano Paulino da Silva. Este laboratório possui infraestrutura adequada para a produção e análise dos nanossistemas a serem utilizados, além de contar com equipe técnica multidisciplinar para oferecer suporte aos experimentos.

### **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1- DESENVOLVIMENTO DOS NANOSSISTEMAS HÍBRIDOS

Dentre diversas opções de NPs orgânicas ou inorgânicas que poderiam ser utilizadas como sistemas para veiculação de RES foi decidido por nanossistemas híbridos de lipossomas de fosfatidilcolina e poloxâmero tendo em vista o potencial desse tipo de nanossistema para oferecer melhor biodisponibilidade, menos toxicidade (pois já existem medicações com tecnologia de polaxâmeros e de lipossomas de fosfatidilcolina) e menor custo quando comparado a outras NPs (como

as metálicas). De fato, lipossomas são considerados nanoestruturas adequadas para a realização da entrega de fármacos (SHAH *et. al*, 2019). Adicionalmente, nos trabalhos de PANDITA *et. al* (2014) e MINGKWAN *et. al* (2015), os poloxâmeros também foram utilizados como forma de estabilizar nanossistemas responsáveis pelo transporte de substâncias hidrofóbicas, a exemplo do RES. Como forma de acentuar mimetismo e biocompatibilidade, todos os nanossistemas híbridos do presente estudo, nas suas fases de elaboração, também foram estabilizados com líquor artificial, produzido seguindo o protocolo adaptado do Cold Spring Harbor Protocols, 2011. Foi adotada esta medida para observar o comportamento dos nanossistemas híbridos em solução compatível (similar) com a que estariam expostos no SNC.

Os lipossomas de fosfatidilcolina associados a micelas de Pluronic com RES foram produzidos de acordo com adaptações em metodologia descrita por GYULAI *et. al* (2016) e LI *et. al* (2018) com vistas ao desenvolvimento de nanossistemas híbridos, mas destacando-se que a combinação de lipossomas com micelas de poloxâmeros para veiculação de RES trata-se de estratégia inédita na literatura levantada. Além da produção dos nanossistemas híbridos com RES, também foram avaliados os lipossomas de fosfatidilcolina com poloxâmero “vazios” que foram utilizados como controle.

## 5.2- ANÁLISE DO TAMANHO HIDRODINÂMICO DOS NANOSSISTEMAS

O Z-Average, ou de modo abreviado no presente estudo como Z-Ave, representa a avaliação de tamanho (diâmetro) hidrodinâmico obtido a partir de valores de intensidade obtidos por DLS, medidos em nanômetros. A partir do momento que foram obtidos os nanossistemas híbridos, a reprodutibilidade do processo foi avaliada em dias distintos (experimentos ou lotes).

Primeiramente, foram produzidas micelas com Pluronic F127 vazias (obtendo valores de Z-Ave de  $310,2 \pm 57,2$  nm;  $406,3 \pm 119,5$  nm e  $845,1 \pm 195,3$  nm para cada um dos 3 experimentos, respectivamente) e com RES (cujos valores de Z-Ave foram  $61,0 \pm 3,2$  nm;  $102,8 \pm 45,0$  nm e  $869,9 \pm 161,7$  nm, para cada um dos 3 experimentos, respectivamente).

Após avaliação estatística utilizando teste Tukey, o grupo das micelas vazias obteve um  $p < 0,05$ , ou seja, as amostras possuíam diferença significativa entre o 1° e 3° e entre o 2° e 3° experimentos produzidos. Em concordância, no grupo das micelas

com RES foi obtido  $p < 0,05$ , com diferenças significativas entre o 1° e 3° e entre o 2° e 3° experimentos realizados quando avaliando o Z-Ave (Figura 3 e Figura 5).

Tendo em vista a diferença de Z-Ave observada entre os grupos de micelas vazias e as contendo RES e mesmo em função das diferenças de Z-Ave de um mesmo grupo entre experimentos (lotes), as amostras também foram avaliadas quanto à distribuição do diâmetro hidrodinâmico em número.

Na Figura 4, os tamanhos obtidos para sistemas micelares vazios foram em média de  $23,55 \pm 1,01$  nm;  $16,83 \pm 3,33$  nm; e  $16,05 \pm 9,60$  nm, respectivamente, para o 1°, 2° e 3° experimentos. Na figura 6, as médias dos tamanhos micelares contendo RES com base na distribuição do diâmetro hidrodinâmico em número foram de  $17,49 \pm 1,02$  nm;  $20,34 \pm 0,22$  nm e  $18,61 \pm 3,28$  nm. Apesar dos tamanhos similares quando avaliados como distribuição do diâmetro hidrodinâmico em número (Figuras 4 e 6) contrastar com aqueles observados pela análise do Z-Ave (Figuras 3 e 5) uma justificativa relaciona-se com a possibilidade das micelas formarem espontaneamente arranjos supramoleculares ou aglomerados, ocasionando uma superestimação do tamanho da amostra pelo Z-Ave. Outra explicação plausível para a diferença do 3° experimento das micelas vazias, seria a verificação da formação de duas subpopulações, sendo que uma delas com tamanhos menores de 10 nm.

No artigo de SUKSIRIWORAPONG *et. al* , 2014, é mencionado que nanopartículas poliméricas podem ser formadas a partir de copolímeros anfifílicos, como os poloxâmeros. O trabalho de MINGKWAN *et. al* , 2015, descreve a formação de micelas poliméricas contendo Pluronic P123 e Pluronic F127 associados à succinato de d-alfa-tococalciferol polietilenoglicol (TGPS) para encapsular itraconazol, substância hidrofóbica que age como antifúngico. Foram obtidos tamanhos de micelas de 8 - 17 nm e 9 - 28 nm, respectivamente. Esses tamanhos foram similares àqueles obtidos com base na distribuição em número na presente dissertação apresentada.

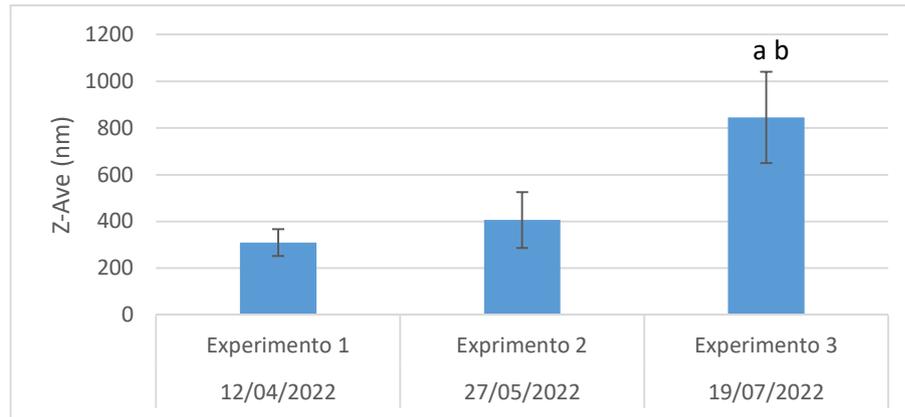


Figura 3. Avaliação do diâmetro hidrodinâmico (Z-Ave) dos nanossistemas micelares de Pluronic vazios. Valores de média e desvio padrão da média de quatro experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

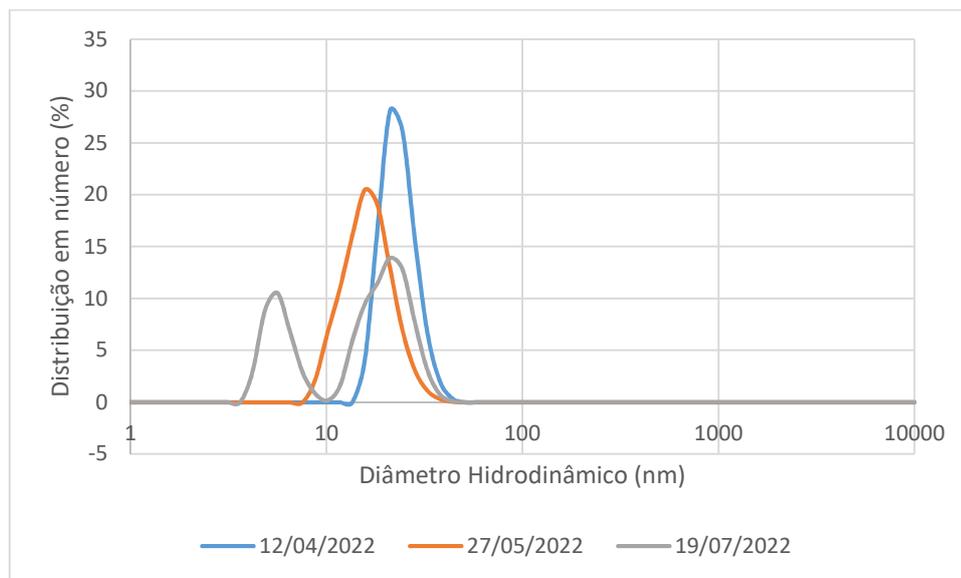


Figura 4: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas micelares de Pluronic vazios obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos.

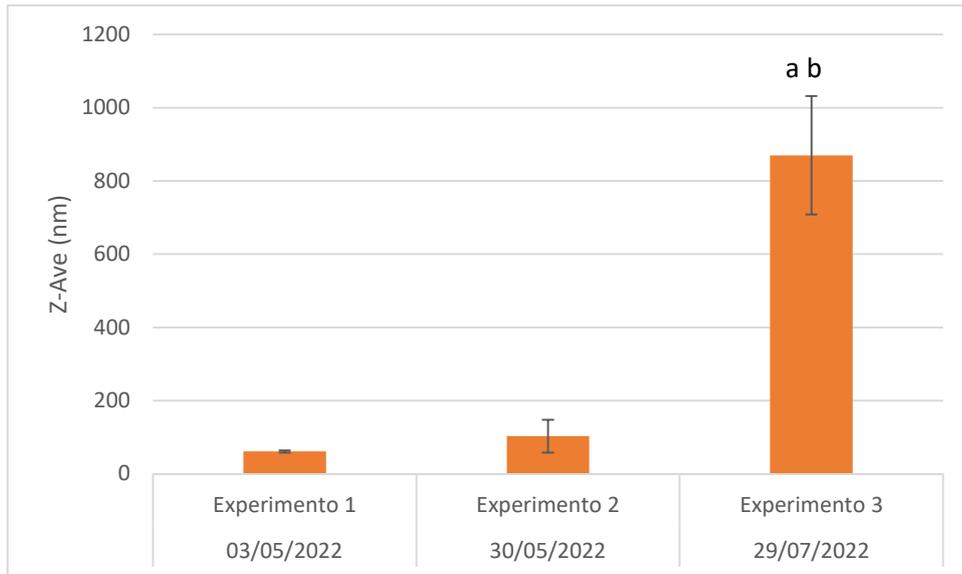


Figura 5. Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas micelares de Pluronic com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

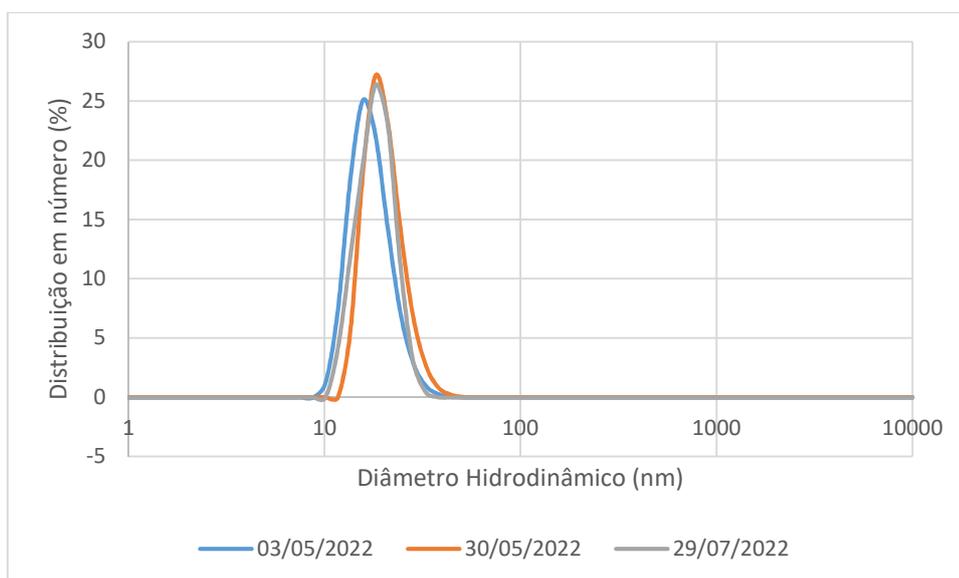


Figura 6: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas micelares de Pluronic com resveratrol obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos.

Nos experimentos de nanossistemas lipossomais não extrusados vazios foram obtidos valores de Z-Ave de  $307,4 \pm 15,1$  nm;  $394 \pm 16,8$  nm;  $315,1 \pm 9$  nm, respectivamente, no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 7). Já nos experimentos de nanossistemas lipossomais não extrusados contendo RES foram obtidos valores de Z-Ave de  $865,1 \pm 38,1$  nm;  $1199,3 \pm 77,1$  nm;  $1171,6 \pm 17,2$  nm, respectivamente, no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 9).

Após submissão à análise estatística com teste de Tukey, no grupo de nanossistemas lipossomais não extrusados vazios foi observada diferença estatística entre o Z-Ave do 1° e o 2° experimentos e entre o 2° e o 3° experimentos, mas não entre o 1° e o 3° experimentos. No grupo de nanossistemas não extrusados contendo RES, houve diferença no Z-Ave entre o 1° e o 2° experimentos e entre o 1° e o 3° experimentos, mas não entre o 2° e o 3° experimentos.

Tendo em vista as diferenças apresentadas, foram avaliados também a distribuição do tamanho hidrodinâmico em número entre os grupos de nanossistemas lipossomais não extrusados vazios, obtendo-se  $67,64 \pm 18,68$  nm;  $97,46 \pm 9,50$  nm e  $144,1 \pm 117,1$  nm (Figura 8); conquanto nos grupo de nanossistemas lipossomais não extrusados contendo RES foram obtidos  $148,9 \pm 11,7$  nm;  $96,16 \pm 21,10$  nm e  $46,83 \pm 21,9$  nm (Figura 10).

Enquanto as medidas em Z-Ave não permitem avaliar de maneira direta e adequadamente as possíveis subpopulações ou mesmo representa a medida mais indicada quando avaliando amostras polidispersas, assim que o diâmetro hidrodinâmico foi avaliado em número tornou-se possível observar presença de subpopulações nos 1° e 3° experimentos dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios os quais coincidentemente apresentam similaridade estatística em relação ao Z-Ave. Na Figura 10, uma possível justificativa do experimento 1 ser estatisticamente distinto dos demais, seria a presença de 3 subpopulações, sendo que uma delas de tamanho próximo a 1000 nm. Estes fatos podem corroborar com a importância da extrusão na tentativa de se obter uma uniformidade das nanoestruturas.

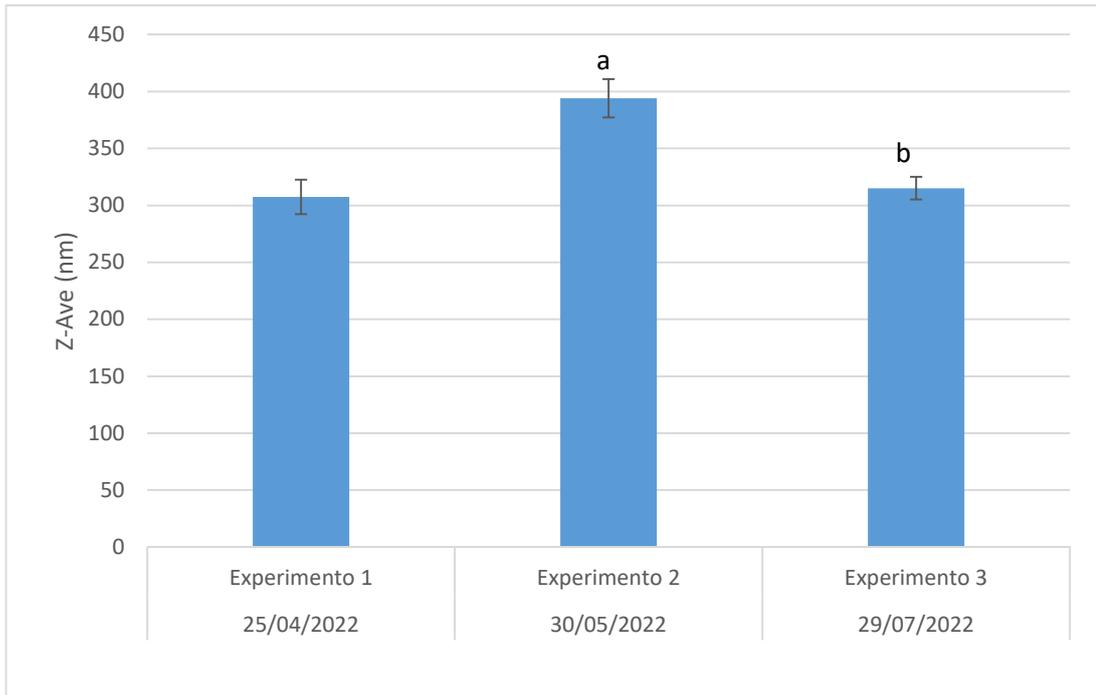


Figura 7: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

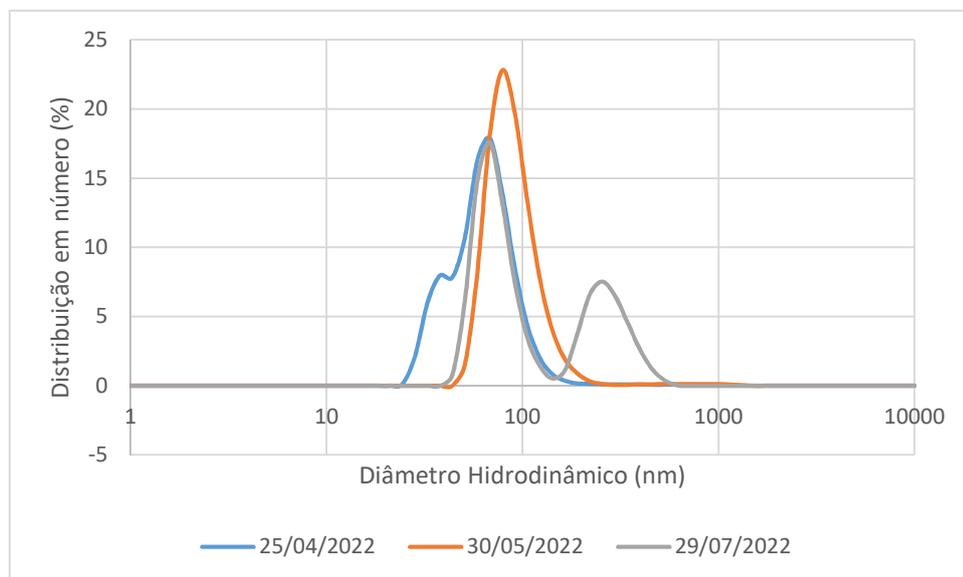


Figura 8: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos.

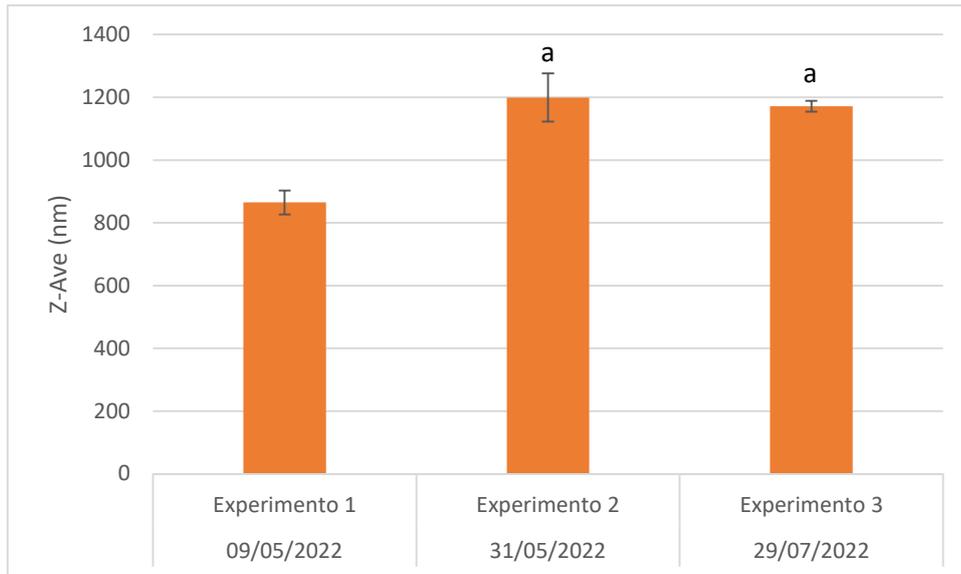


Figura 9: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais não extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ).

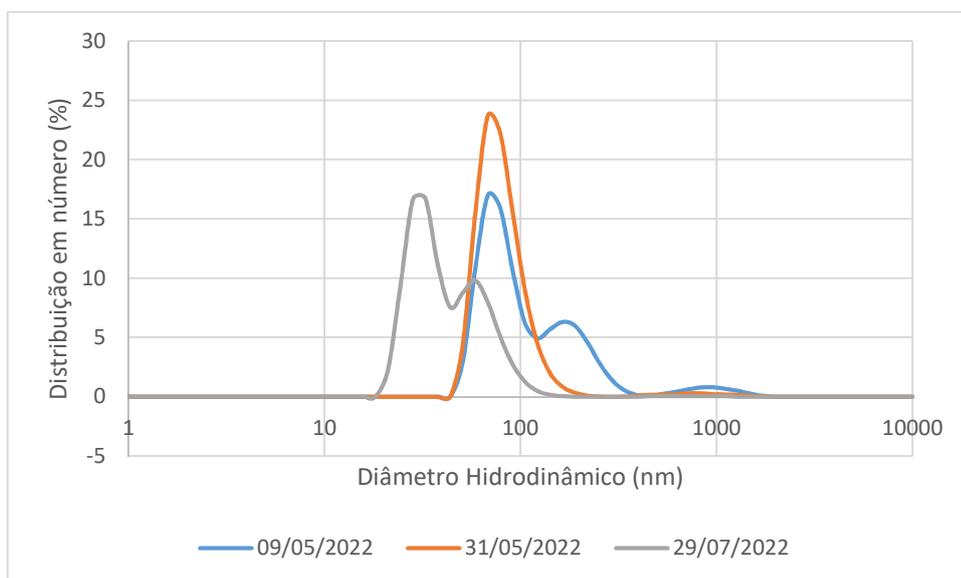


Figura 10: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas lipossomais não extrusados com resveratrol obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos.

Nos experimentos de nanossistemas lipossomais extrusados vazios foram obtidos Z-Ave de  $134,3 \pm 1,5$  nm;  $225,3 \pm 1,8$  nm;  $253,5 \pm 1,07$  nm, respectivamente, no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 11). Finalmente nos experimentos de nanossistemas lipossomais extrusados com RES foram obtidos Z-Ave de  $200,5 \pm 1,4$  nm;  $218,2 \pm 1,1$  nm;  $232,3 \pm 0,9$  nm, respectivamente, no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 13). Com relação à análise estatística com o teste Tukey, os nanossistemas extrusados, tanto os vazios quanto os nanossistemas contendo RES, houve diferença estatística entre todas as amostras.

Na avaliação dos diâmetros hidrodinâmicos em número nos experimentos de nanossistemas lipossomais extrusados vazios foram obtidos valores de  $99,78 \pm 2,83$  nm;  $43,66 \pm 8,79$  nm e  $57,91 \pm 9,84$  nm, respectivamente (Figura 12). Nos experimentos dos nanossistemas extrusados com RES obteve-se  $97,21 \pm 43,93$  nm;  $122,2 \pm 15,32$  nm;  $81,84 \pm 27,29$  nm respectivamente (Figura 14). Neste caso, apesar de ter sido utilizado uma membrana com poros de 100 nm para extrusão, o Z-Ave evidenciou estruturas em torno de 200 nm e na avaliação do diâmetro hidrodinâmico em número foram observadas populações majoritárias em torno de 100 nm.

No trabalho de RIGON *et. al*, 2016, para transporte de RES através da pele, foram produzidos dois tipos de nanopartículas por meio de sonicação, uma com ácido esteárico com poloxâmero e outra com ácido esteárico, poloxâmero e lecitina de soja. As NP foram submetidas à avaliação de tamanho hidrodinâmico tanto vazias quanto contendo RES. Os valores de Z-Ave apresentaram diferença estatística em todas as amostras, independente da associação com RES, de modo similar ao que foi observado no presente estudo. Já BHARDWAJ e BURGESS, 2010, avaliou lipossomas de distintas composições (dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina e distearoilfosfatidilcolina), antes e após extrusão dos mesmos. Os lipossomas submetidos à extrusão tinham tamanhos menores que os não submetidos e também se notou interação com o grupamento -acil dos lipídeos (o que não foi possível analisar na atual Dissertação). Não há menção sobre diferenças estatísticas entre as amostras analisadas do mesmo material. Importante salientar que o tamanho dos lipossomas à base de dimiristoilfosfatidilcolina contendo dexametasona (anti-inflamatório esteroide com característica hidrofóbica) antes da extrusão tinham valor de  $1012,35 \pm 131,96$  nm e após a extrusão a variação se alterou para  $43,45 \pm 1,29$  nm. Também foi possível observar redução importante entre os

nanossistemas da atual Dissertação ( $1078,6 \pm 34,39$  nm sem extrusão e contendo RES ;  $217 \pm 18,03$  nm com extrusão e contendo RES).

Estes dados são similares e estão de acordo com a literatura (OLSON *et. al*, 1979; ONG *et. al*, 2016; GUO *et. al*, 2018) que afirma que com a técnica de extrusão há a possibilidade na maioria das vezes de controle mais adequado de tamanho dos lipossomas e sua reprodutibilidade. Outras abordagens como a sonicação poderiam ser utilizadas para uniformizar os lipossomas. De fato, ISAILOVIĆ *et. al* (2013) descreve em seu trabalho semelhanças entre os tamanhos dos lipossomas após sonicação e após extrusão. Contudo, ONG *et. al* , 2016, avalia os diferentes métodos de readequação de tamanho de lipossomas e classifica a extrusão como o melhor método, sendo, portanto, aquele empregado nessa Dissertação.

Também foram obtidos os intervalos de confiança, por meio das medidas de erro padrão, os quais ficaram contemplados dentro do intervalo de confiança de 95% das amostras.

Mesmo com a variação de tamanho encontrada, tendo em vista que o alvo desses nanossistemas seria a passagem pela BHE, faz-se necessário citar CHEN e CHIANG (2020) os quais mencionam que lipossomas menores de 1000 nm teriam plasticidade e seriam capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica. Como os lipossomas produzidos neste trabalho são menores de 300 nm (Z-Ave), eles teriam uma facilidade ainda maior para a penetração no SNC.

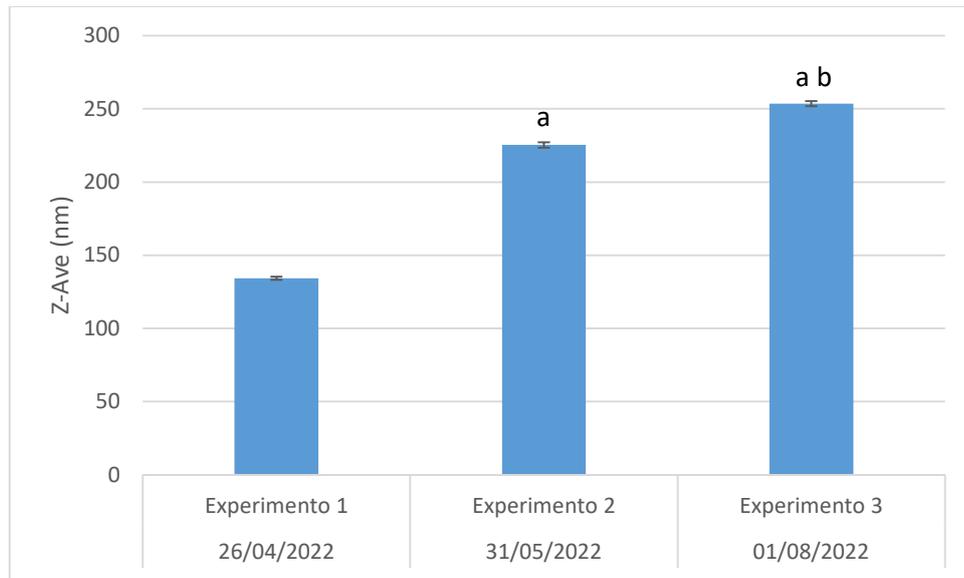


Figura 11: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

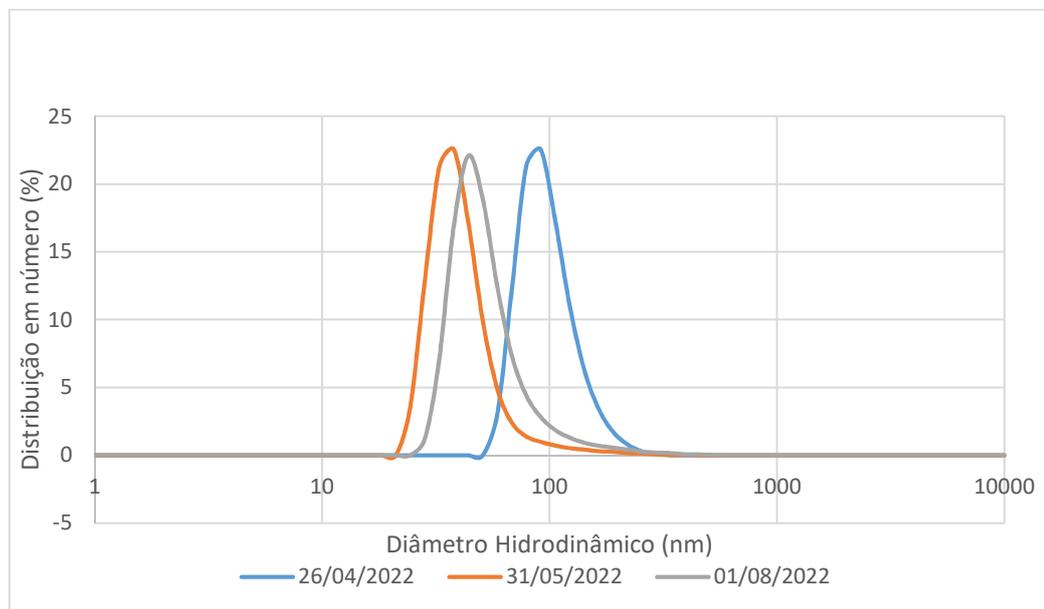


Figura 12: Distribuições de diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas lipossomais extrusados vazios obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos.

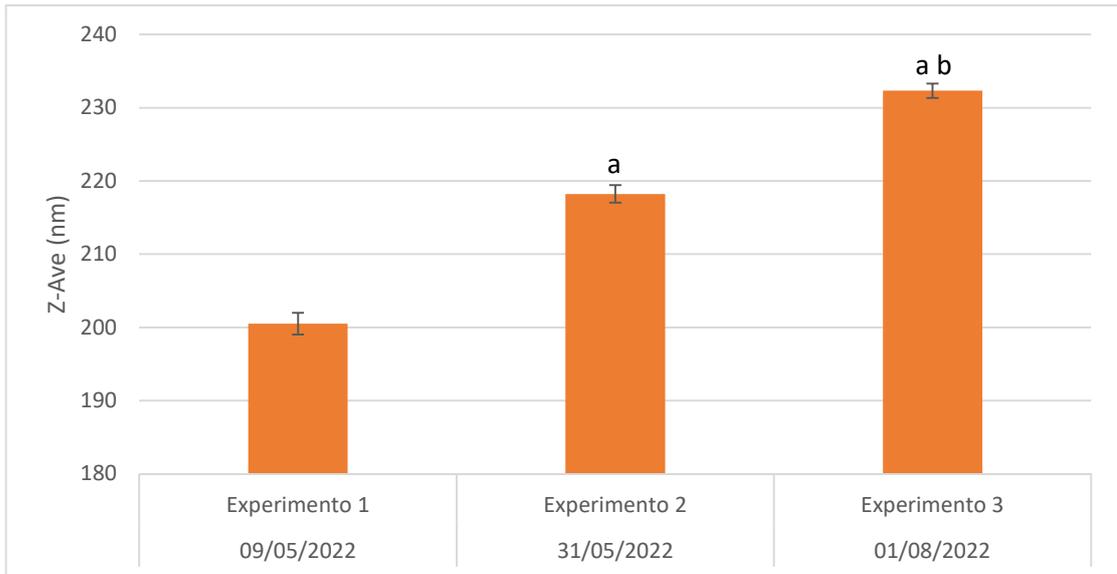


Figura 13: Avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

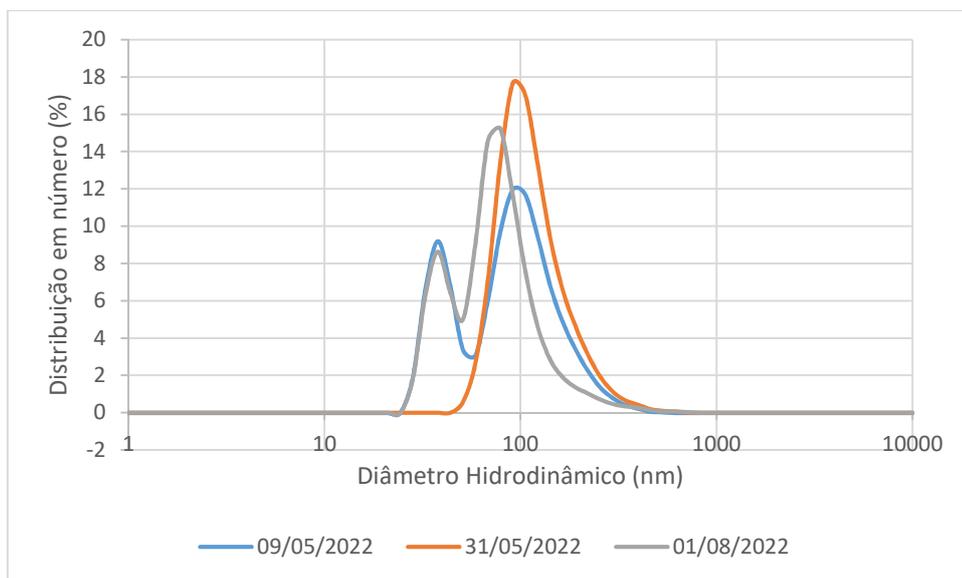


Figura 14: Distribuições do diâmetro hidrodinâmico em números dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol obtidas por espalhamento de luz dinâmico a partir de três experimentos distintos.

Na Tabela 1 pode-se observar a comparação entre todos os dados dos Z-Ave obtidos em cada grupamento distinto.

		Medidas de Z-Ave		
		1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento
Nanossistemas				
Micelares		23,55 ± 1,01 nm	16,83 ± 3,33 nm	16,05 ± 9,60 nm
Vazios				
Nanossistemas				
Micelares	com	17,49 ± 1,02 nm	20,34 ± 0,22 nm	18,61 ± 3,28 nm
RES				
Nanossistemas				
Lipossomais		307,4 ± 15,1 nm	394 ± 16,8 nm	315,1 ± 9 nm
Vazios				
Nanossistemas				
Lipossomais	com	865,1 ± 38,1 nm	1199,3 ± 77,1 nm	1171,6 ± 17,2 nm
RES				
Nanossistemas				
Lipossomais		134,3 ± 1,5 nm	225,3 ± 1,8 nm	253,5 ± 1,07 nm
Extrusos Vazios				
Nanossistemas				
Lipossomais		200,5 ± 1,4 nm	218,2 ± 1,1 nm	232,3 ± 0,9 nm
Extrusos com RES				

Tabela 1. Dados comparativos dos índices de tamanho hidrodinâmico de todas as etapas de todos os experimentos realizados. Dados representados com as médias e seus desvios padrões respectivos.

### 5.3- ANÁLISE DOS ÍNDICES DE POLIDISPERSIVIDADE DOS NANOSSISTEMAS

O índice de polidispersividade (Pdl) é uma medida utilizada para avaliar a uniformidade de nanossistemas dispersos em uma suspensão analisada. Assim, análises de Pdl foram realizadas para cada um dos nanossistemas reproduzidos em três dias distintos (experimentos ou lotes), sendo apresentados de modo independente.

Inicialmente foram obtidas micelas vazias com valores de Pdl  $0,823 \pm 0,162$ ;  $0,708 \pm 0,253$  e  $0,747 \pm 0,115$ , respectivamente (Figura 15); ou contendo RES nas quais os Pdl foram  $0,993 \pm 0,010$ ;  $0,385 \pm 0,229$  e  $0,710 \pm 0,080$  por essa ordem, para cada experimento realizado (Figura 16). Após análise estatística, as micelas vazias obtiveram um  $p=0,752$ , comprovando pelo teste de Tukey que não observou diferença nos valores de Pdl entre as amostras (lotes). Porém, as micelas contendo RES apresentaram  $p=0,0054$  e o teste de Tukey evidenciou distinções entre a primeira amostra e a segunda amostra (lotes) deste grupo.

No trabalho de MINGKWAN *et. al* (2015), as micelas poliméricas obtidas com Pluronic F127 e TGPS contendo intraconazol apresentaram valores de 0,094 (monodispersas) a 0,537 (moderadamente polidispersas). Em outro estudo desenvolvido por EL-GENDY *et. al* (2017), a variação dos Pdl obtidos no experimento de formação de micelas de Pluronic F123 e Pluronic F127 encapsulando olmesartana foi de 0,09 (monodispersas) a 0,37 (baixa polidispersividade). Estes Pdl são bem menores que os achados no presente estudo, fato que pode ter sido influenciado pelo tamanho das micelas produzidas em comparação às confeccionadas nos trabalhos citados.

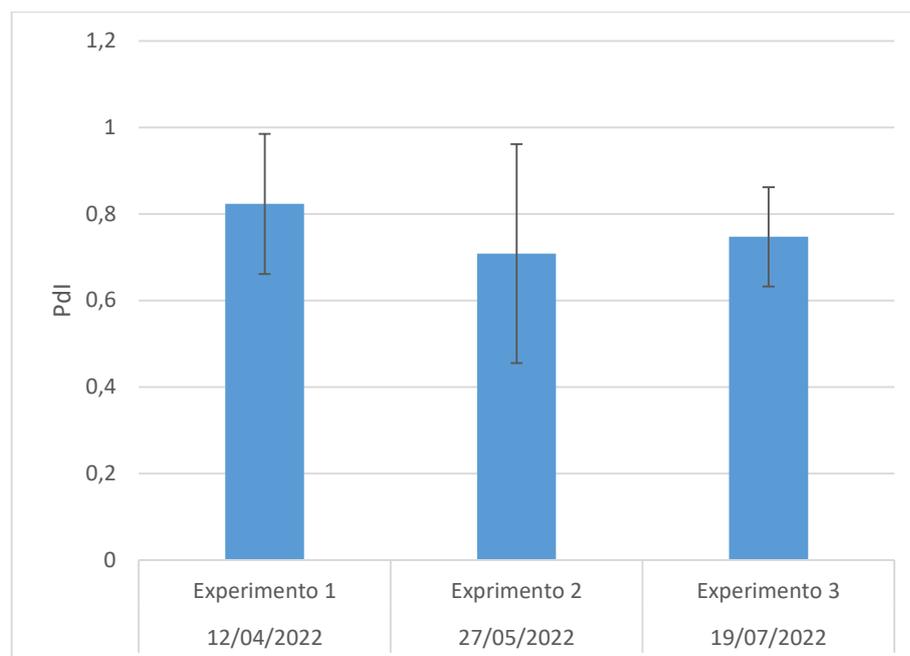


Figura 15. Avaliação do índice de polidispersividade das micelas vazias. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico.

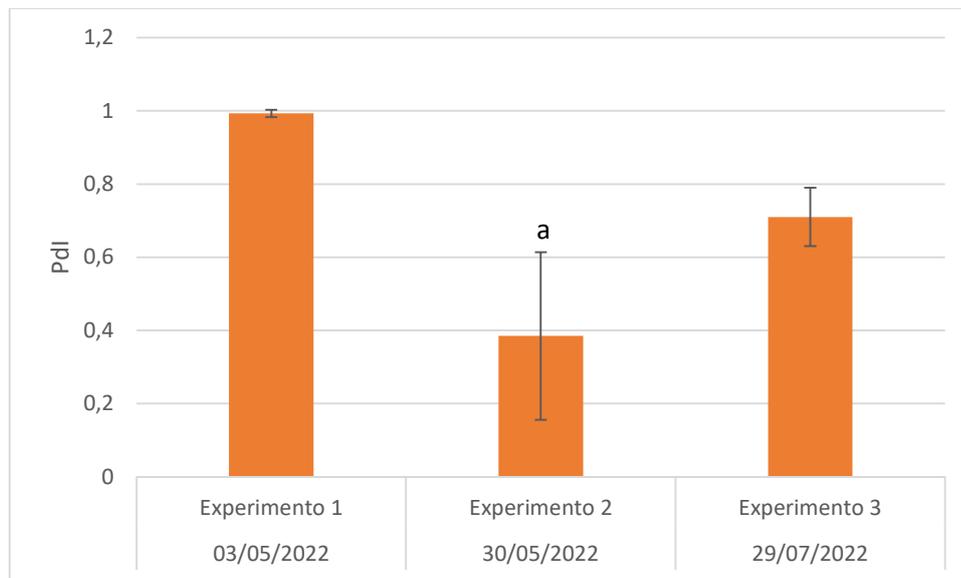


Figura 16. Avaliação do índice de polidispersividade das micelas com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ).

Nos experimentos com nanossistemas lipossomais híbridos não extrusados vazios foram obtidos valores de PDI de  $0,663 \pm 0,048$ ;  $0,721 \pm 0,062$ ;  $0,451 \pm 0,151$ , respectivamente, no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 17). Já nos experimentos para formação de nanossistemas lipossomais híbridos não extrusados contendo RES foram obtidos valores de  $0,932 \pm 0,033$ ;  $0,650 \pm 0,217$ ;  $0,764 \pm 0,044$  no 1°, 2° e 3° experimentos, respectivamente (Figura 18). Ainda nos experimentos com nanossistemas lipossomais híbridos extrusados vazios foram obtidos  $0,086 \pm 0,014$ ;  $0,257 \pm 0,004$ ;  $0,268 \pm 0,003$ , respectivamente, no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 19). Por fim, nos experimentos com nanossistemas lipossomais híbridos extrusados contendo RES foram obtidos  $0,196 \pm 0,010$ ;  $0,238 \pm 0,007$ ;  $0,253 \pm 0,006$  respectivamente no 1°, 2° e 3° experimentos (Figura 20).

Em suma, os nanossistemas lipossomais híbridos não extrusados vazios apresentaram PDI em média de 0,611 (variando de 0,451 a 0,721). Em contraste, nos nanossistemas lipossomais híbridos extrusados vazios, pode-se observar que os PDI das estruturas encontradas ficaram em torno de 0,200 (variando entre 0,080 e 0,268), indicando maior uniformidade. Similarmente, os nanossistemas lipossomais híbridos não extrusados contendo RES apresentaram valores de PDI em média de 0,782 (com variação de 0,650 a 0,932) e os nanossistemas lipossomais híbridos extrusados

contendo RES exibiram valores de Pdl em média de 0,229 (com variação de 0,196 a 0,253).

Comumente, considera-se que valores de Pdl acima de 0,400 são característicos de distribuições heterogêneas (moderadamente a altamente polidispersas) no nanossistema, o que pode sugerir presença de aglomerados/agregados de partículas ou aumento de tamanho das mesmas. Já valores de Pdl abaixo de 0,200 revelam uma tendência à monodispersão. Quando os valores ficam acima de 0,700, há a presença de uma grande variedade de tamanho das partículas da amostra (altamente polidispersas) (KRAUSE *et. al*, 2010; RIGON *et. al*, 2016).

Portanto, pode-se afirmar que, com a técnica de extrusão, tanto os nanossistemas lipossomais híbridos vazios quanto os que continham RES apresentaram mudança com relação a dispersibilidade, deixando de ser polidispersos e se tornando monodispersos ou com tendência notória à monodispersão. Esta característica também foi observada no trabalho de ISAILOVIĆ *et. al* (2013), no qual foram obtidos lipossomas extrusados contendo RES com Pdl de 0,15-0,22, em comparação a técnica de sonicação cujo Pdl variou de 0,23-0,47. No artigo recente de EVERS *et. al* (2022) foram produzidos nanossistemas lipossomais híbridos visando transporte de RNA interferentes curtos (para impedir a translação de proteínas patogênicas) e, após a extrusão dos mesmos, foi obtido um Pdl em torno de 0,200, similar aos dados obtidos na vigente pesquisa para o RES.

Outros fatores, além da extrusão, também poderiam influenciar nas medidas de Pdl. No estudo de RIGON *et. al*, 2016 também foram obtidos lipossomas de fosfatidilcolina com poloxâmero e RES vazios com média de Pdl de 0,200, que corresponderia a uma tendência à monodispersão, mesmo sem a extrusão, empregando processo de sonicação. Na publicação de LI *et. al*, 2018, foram confeccionados lipossomas com Pluronic F127 para transporte de curcumina. Os resultados sugeriram que quanto menor o percentual de Pluronic na solução, mais homogênea é a suspensão lipossomal formada (com Pdl entre 0,200 e 0,400).

Também foram obtidos os intervalos de confiança, por meio das medidas de erro padrão. Nessas condições, as medidas encontradas estão dentro de uma estimativa de intervalo de confiança de 95% das amostras. Contudo, cada uma das três medidas foram submetidas ao teste de Tukey evidenciando diferenças entre os lotes (experimentos) do mesmo grupo. No grupo dos nanossistemas lipossomais

híbridos não extrusados vazios foi observada diferença estatística significativa entre os 2° e 3° experimentos, sem disparidade entre o 1° e 2° e entre o 1° e o 3° ( $p < 0,05$ ). No grupo dos nanossistemas lipossomais híbridos não extrusados com RES, não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras de diferentes lotes. No de nanossistemas lipossomais híbridos extrusados vazios, a diferença ficou entre os 1° e 2° e entre 1° e 3°, sem diferença entre o 2° e 3° ( $p < 0,05$ ). E no de nanossistemas lipossomais híbridos extrusados com RES, o teste Tukey evidenciou distinção entre o 1° e 2° e entre o 2° e 3°, porém sem discordância entre a 2° e 3° amostras ( $p < 0,05$ ). Tendo em vista os dados apresentados, fica clara a dificuldade em se reproduzir os nanossistemas em escala laboratorial quanto às medidas de Pdl, mas que o uso da extrusão aumenta a uniformidade dos sistemas pelo menos quanto à faixa obtida.

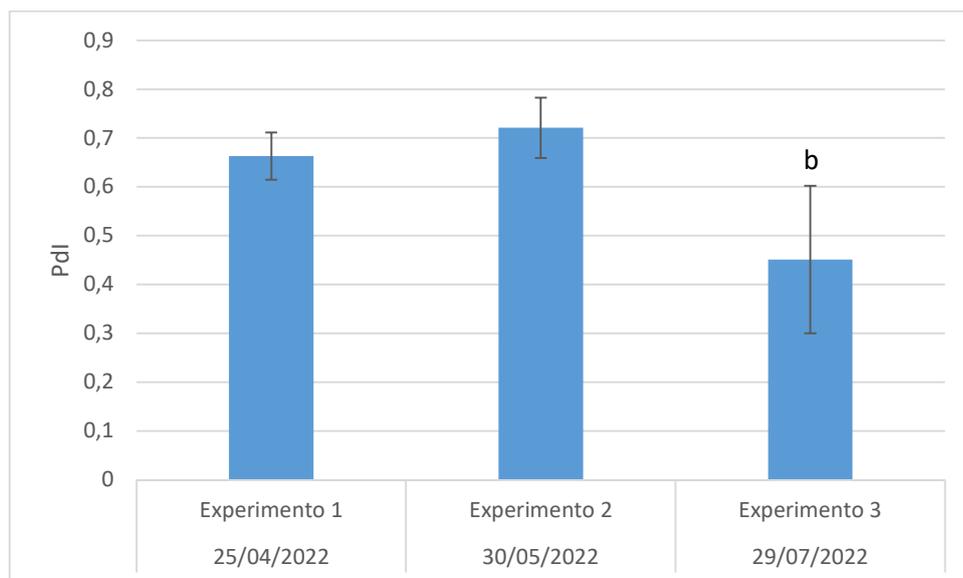


Figura 17. Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais não extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

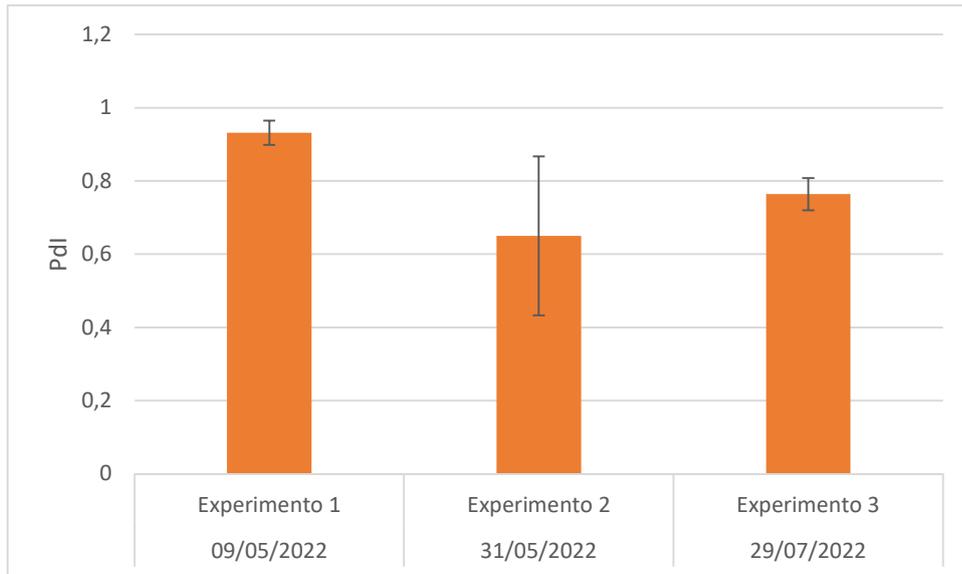


Figura 18. Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais não extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico.

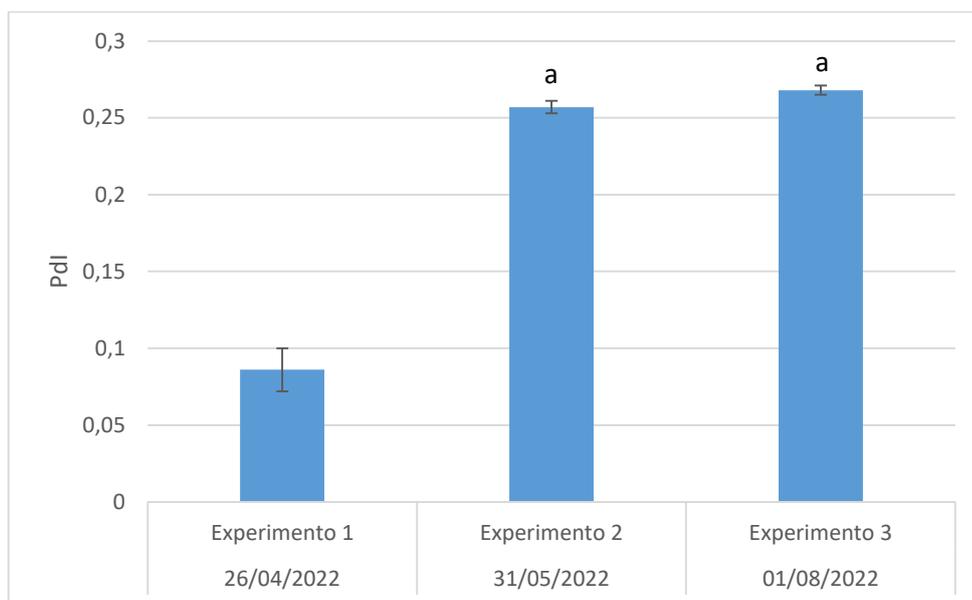


Figura 19: Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais extrusados vazios. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ).

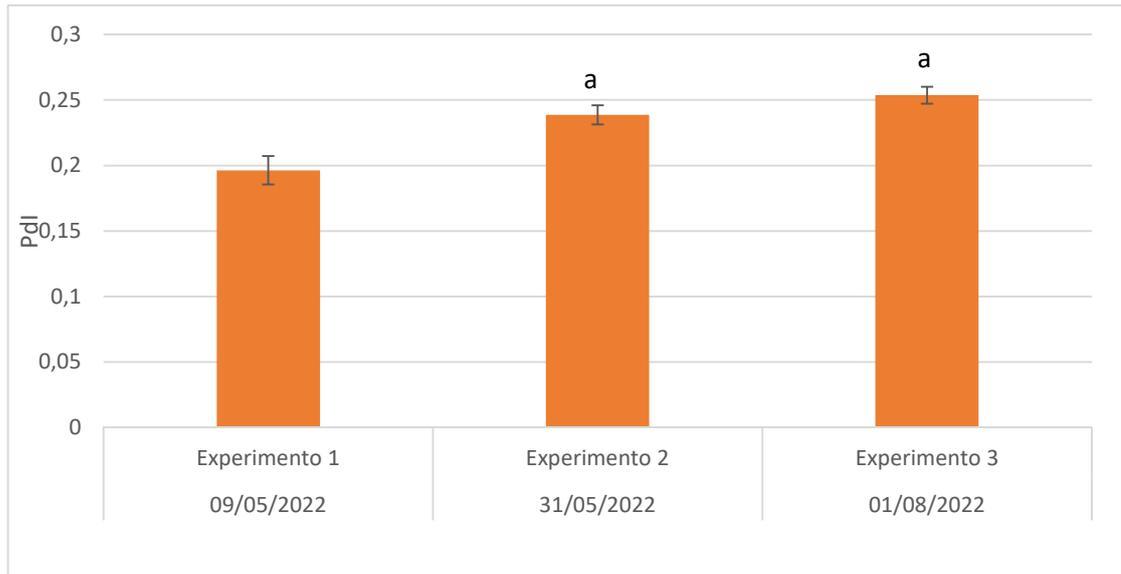


Figura 20: Avaliação do índice de polidispersividade dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol. Valores de média e desvio padrão da média de três experimentos distintos e obtidos a partir de três leituras independentes por espalhamento de luz dinâmico. <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao experimento 1 ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4- AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Por meio da análise espectrofotométrica, foram realizadas medidas para obtenção de curvas padrão para quantificação de RES. Assim, foram obtidas curvas de concentração de RES de 0 a 100% (em relação à concentração máxima encapsulada) variando a cada 10%, com suas respectivas equações e valores de  $R^2$ .

Na primeira curva padrão (Figura 21), foi taxa de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais híbridos extrusados com RES avaliada nesse ensaio foi de 63,94%. Já na segunda curva padrão (Figura 22), a taxa de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais híbridos extrusados com RES obtida foi de 89,10%. Por fim, na terceira análise (Figura 23), a qual foi obtido 100% de taxa de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais híbridos extrusados com RES.

No trabalho de SALAMA *et. al*, 2012 também foi utilizada uma combinação de fosfatidilcolina com poloxâmeros para veicular olanzapina a ser administrada por via nasal para o SNC. A taxa de encapsulamento teve uma variação de 64,92% a 76,10%. Já no artigo de ASHIZAWA *et. al*, 2019, foram produzidos lipossomas com fosfatidilcolina, associada a colesterol e poloxâmero para transportar oligonucleotídeos para as células de Purkinje do cerebelo. Foi considerada que a eficiência de encapsulamento foi um sucesso, tendo em vista que atingiu valores acima de 70%. Na dissertação de PADILLA (2014) foi descrita a produção de

lipossomas com fosfatidilcolina e poloxâmero para transporte cutâneo de fluconazol e obteve uma taxa de encapsulamento de 96,84%. Os dados de SANTOS (2011) na confecção de sistema lipídico de monoestearato de glicerila, ácido oléico e poloxâmero para transporte de praziquantel, obtiveram uma eficiência da taxa de encapsulamento variando de 83 a 88%, a depender da quantidade de praziquantel utilizada.

Desse modo, as eficiências de encapsulamento obtidas no presente estudo são compatíveis com aquelas para outros princípios ativos hidrofóbicos obtidos a partir da literatura atual na área.

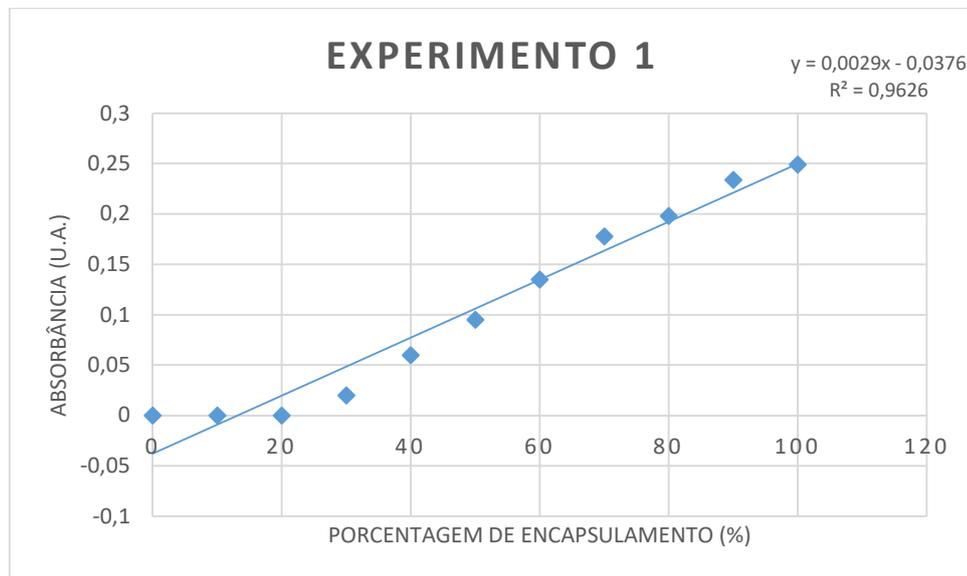


Figura 21: Curva padrão para avaliação da eficiência de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais extrusados com RES produzidos no dia 09/05/2022.

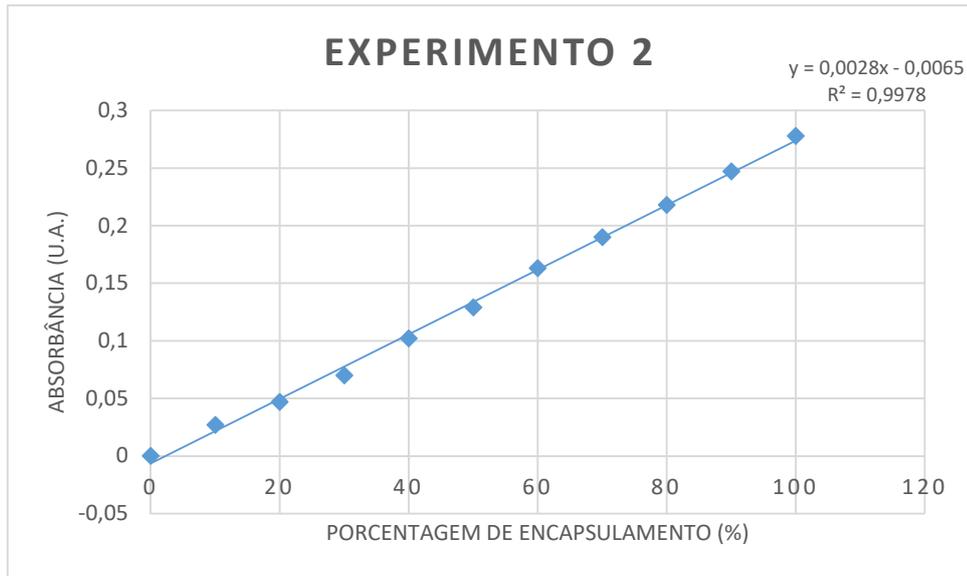


Figura 22: Curva padrão para avaliação da eficiência de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais extrusados com RES produzidos no dia 31/05/2022.

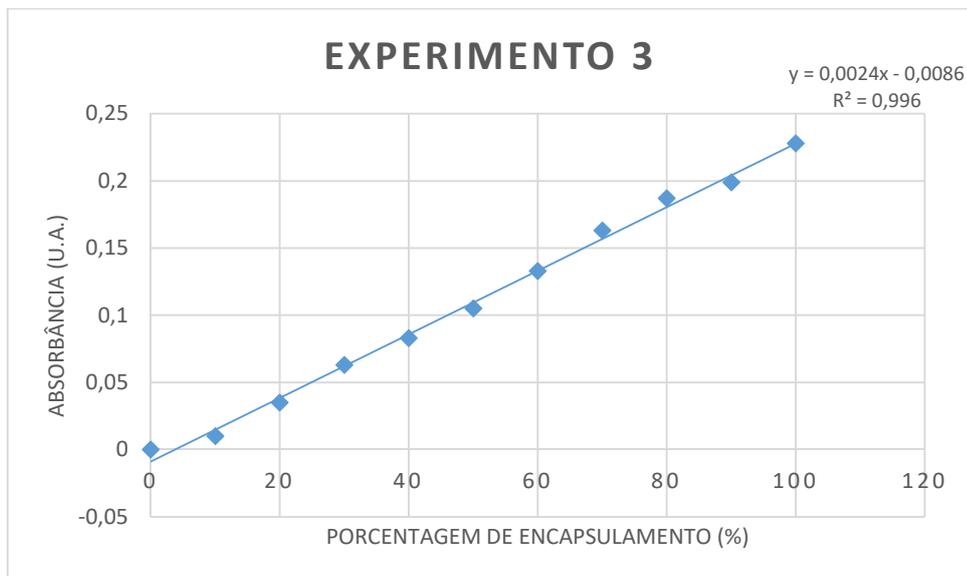


Figura 23: Curva padrão para avaliação da eficiência de encapsulamento dos nanossistemas lipossomais extrusados com RES produzidos no dia 01/08/2022.

### 5.5- AVALIAÇÃO DA PASSAGEM DOS NANOSSISTEMAS HÍBRIDOS POR MEMBRANA COM POROSIDADE COMPATÍVEL COM A BHE

Foi realizado um último teste para validação *in vitro* do nanossistema híbrido contendo RES desenvolvido quanto à capacidade de transpor a BHE por meio da passagem através de membrana com porosidade compatível (similar) com a da BHE.

O nanossistema lipossomal híbrido contendo Pluronic e RES foi produzido e depois submetido à passagem única por compressão manual por membrana de 50 nm. A escolha da membrana com tal porosidade se deu em função de LOCKMAN *et. al*, 2002 ter afirmado que a porosidade ideal para travessia da BHE seria de menos de 100 nm, já TSOU *et. al*, 2017 e CEÑA e JÁTIVA, 2018 citam que estruturas menores de 200 nm possuem mais chance de adentrar a BHE.

O nanossistema lipossomal híbrido contendo RES foi avaliado antes e após a passagem através da membrana. Assim, o tamanho médio (Z-Ave) antes da passagem foi de 132,3 nm e depois foi pouco reduzido para 118,8 nm (Figura 24). Isso significa que mesmo passando em um poro de 50 nm, o diâmetro dos lipossomas se mantiveram relativamente constantes, mostrando sua capacidade de diapedese (deformação para transpor barreiras). Os poros da BHE variam de 20 a 300 nm, então o fato de que o lipossoma com Pluronic e RES ter apresentado diâmetro hidrodinâmico inicial de 132 nm parece não ter comprometido a passagem por uma barreira física com porosidade de 50 nm, sendo muito promissor considerando a possibilidade de entrega do RES no SNC através da BHE.

Não obstante, também foram avaliados os diâmetros hidrodinâmicos em número desses nanossistemas que foram de  $88,80 \pm 10,18$  nm e  $75,83 \pm 6,66$  nm, respectivamente antes e após a passagem pela barreira de 50 nm (Figura 25). Esses dados evidenciam a manutenção de apenas uma população de nanoestruturas predominante em cada análise, além de manter o tamanho similar após diapedese.

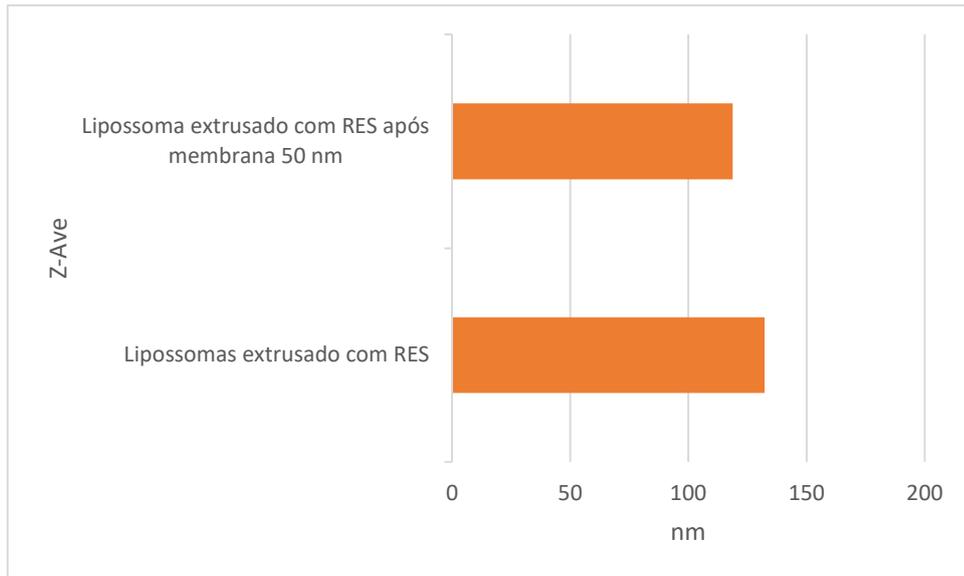


Figura 24: Avaliação dos diâmetros hidrodinâmicos (Z-Ave) dos nanossistemas lipossomais híbridos extrusados com resveratrol antes e após nova passagem por membrana com porosidade de 50 nm.

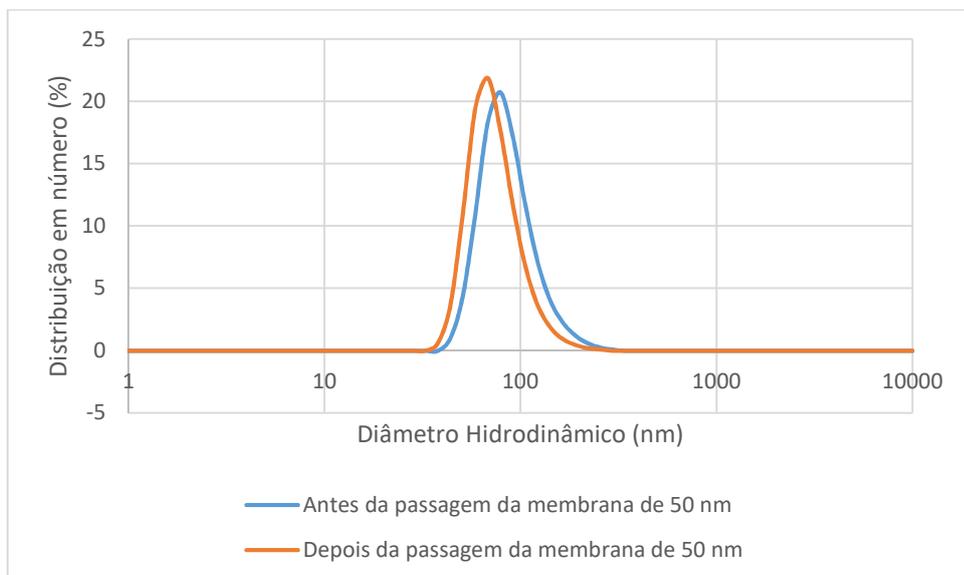


Figura 25: Distribuições do diâmetro hidrodinâmico em número dos nanossistemas lipossomais extrusados com resveratrol antes e após a passagem por membrana com porosidade de 50 nm.

Importante salientar que algumas das principais limitações do uso de nanopartículas lipídicas e lipossomas são sua instabilidade plasmática, rápida liberação de seu conteúdo e serem reabsorvidos pelo sistema retículo endotelial celular (HERNANDEZ e SHUKLA, 2021). Assim, o uso de poloxâmeros como o Pluronic F127 proposto no presente estudo poderia manter a estabilidade plasmática da estrutura, aumentando seu tempo de encapsulamento da droga como já foi sugerido em trabalho anterior (ZHAN *et. al*, 2015).

Além disso, o uso desse tipo de nanossistema poderia propiciar entrega mais efetiva por variadas rotas de administração. No artigo de PHACONPAI *et. al* (2010) foram produzidos lipossomas de fosfatidilcolina de soja contendo quercetina, flavonoide com ação antioxidante e anti-inflamatória, o qual foi administrado via nasal em ratos e foram obtidas taxas reduzidas de peroxidação lipídica. Este mecanismo de acesso ao SNC também foi elencado por CORREIA *et. al* (2022) como a maneira mais eficaz de obter sucesso na entrega de fármacos.

Outra vantagem da associação utilizada de modo inédito neste presente estudo é que, na temperatura média corporal de 36,7°C, a formulação de nanossistema híbrido desenvolvida tenderia a ficar geleificada devido ao Pluronic, dificultando a degradação precoce e aumentando a eficiência de uma possível liberação sustentada.

## **6- CONCLUSÃO**

O nanossistema híbrido (à base de Pluronic F127 e fosfatidilcolina em meio de líquido mimético) mostrou-se eficaz em produzir, por extrusão, estruturas uniformes em nanoescala para encapsulamento de resveratrol com potencial para atravessar barreiras com porosidade inferior às dimensões das nanoestruturas formadas.

Através das medidas do Z-Ave pode-se perceber tamanhos distintos a partir dos nanossistemas avaliados (micelas vazias e com RES, nanossistemas lipossomais não extrusados vazios e com RES, nanossistemas lipossomais extrusados vazios e com RES). Ainda foi possível perceber diferenças significativas de Z-Ave entre os experimentos dos nanossistemas extrusados avaliados, com pressuposto de possível dificuldade em suas reprodutibilidades. Contudo, ao se avaliar as medidas de distribuição do tamanho hidrodinâmico em números, os dados mostravam certa uniformidade dos grupos analisados, especialmente os extrusados.

Além do Z-Ave obtido através do espalhamento de luz dinâmico, também foi possível verificar o Pdl. Com este dado ficou clara a tendência a monodispersão após a extrusão dos nanossistemas.

Assim, o presente trabalho possibilitou produzir nanossistemas lipídicos contendo resveratrol com taxa de encapsulamento semelhante com a da literatura revisada para outros tipos de nanossistemas. Foi possível confirmar a propriedade

dos lipossomas de se deformar, tendo em vista passar por aberturas menores que seu diâmetro inicial, e depois ter a capacidade de voltar ao tamanho original.

Os resultados confirmam as premissas iniciais de alta eficiência da capacidade de encapsulamento através das análises *in vitro*.

Almejando futuras perspectivas, é necessário destacar a possibilidade do uso da mesma formulação para entrega de outras drogas hidrofóbicas, tal como o RES, para SNC com objetivo de redução de custo das medicações e aumento de suas eficácias.

Serão necessários futuros estudos *in vitro* para verificação de funcionalidade de entrega de RES, como ensaios de citotoxicidade.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; REFAI, H.; EL SAYED, N.; RASHED, L. A.; MOUSA, M. R.; ZEWAİL, M. Superparamagnetic iron oxide loaded chitosan coated bilosomes for magnetic nose to brain targeting of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 610, 2021. ID 121244. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121244>
- AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 144, 2012. <http://www.nanoscalereslett.com/content/7/1/144>
- ALEX, S.; TIWARI, A. Funcionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications – A review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 1869-1894, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9718>
- ALMEIDA, T. C. *et. al.* Polymeric micelles containing resveratrol: development, characterization, cytotoxicity on tumor cells and antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000418401>
- AMINA, S. J.; GUO, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 9823-9857, 2020. DOI: <http://doi.org/10.2147/IJN.S279094>

- AMIRI, M.; JAFARI, S.; KURD, M.; MOHAMADPOUR, H.; KHAYATI, M.; GHOBADINEZHAD, F.; TAVALLAEI, O.; DERAKHSHANKHAH, H.; MALVAJERD, S. S.; IZADI, Z. Engineered Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as New Generations of Blood–Brain Barrier Transmitters. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, p. 4475-4490, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00540>
- AMRI, A.; CHAUMEIL, C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 182-193, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.083>
- ANDRADE, S.; RAMALHO, M. J.; PEREIRA, M. C.; LOUREIRO, J. A. Resveratrol brain delivery for neurological disorders prevention and treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1261, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01261>
- ANTUNES NETO, J. M. F. Formação de espécies reativas de oxigênio e exercício físico. **Revista Digital**, v. 17, n. 168, 2012. Lecturas: Educación Física y Deportes. Disponível em: <<http://www.efdeportes.com/efd168/especies-reactivas-de-oxigenio-e-exercicio-fisico.htm>>.
- ARISOY, S.; SAYINER, O.; COMOGLU, T.; ONAL, D.; ATALAY, O.; PEHLIVANOGLU, B. In Vitro and in Vivo Evaluation of Levodopa Loaded Nanoparticles for Nose to Brain Delivery. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1740257>.
- ASHIZAWA, A. T.; HOLT, J.; FAUST, K.; LIU, W.; TIWARI, A.; ZHANG, N.; ASHIZAWA, T. Intravenously Administered Novel Liposomes, DCL64, Deliver Oligonucleotides to Cerebellar Purkinje Cells. **The Cerebellum**, v. 18, p. 99-108, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12311-018-0961-2>
- ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; NAJAFI, M.; SAMARGHANDIAN, S.; MOHAMMADINEJAD, R.; AHN, K. S. Resveratrol targeting tau proteins, amyloid-beta aggregations, and their adverse effects: An updated review. **Phytotherapy Research**, v. 34, p. 2867-2888, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6732> .

- AZAD, T. D.; PAN, J.; CONNOLY, I.D.; REMINGTON, A.; WILSON, C. M.; GRANT, G. A. Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. *Neurosurgical Focus*, v. 38, n. 3, 2015.
- BAE, Y.; KATAOKA, K. Intelligent polymeric micelles from functional poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 10, p. 768-784, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.016> >.
- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. p. 98-106, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.013>
- BAYSAL, I.; UCAR, G.; GULTEKINOGLU, M.; ULUBAYRAM, K.; YABANOGLU-CIFTCI, S. Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, p. 33-45, 2017. DOI: <https://10.1007/s00702-016-1527-4>
- BEGINES, B.; ORTIZ, T.; PÉREZ-ARANDA, M.; MARTÍNEZ, G.; MERINERO, M.; ARGÜELLES-ARIAS, F.; ALCUDIA, A. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. **Nanomaterials**, v. 10, p. 1403, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10071403>
- BELTRÁN-GRACIA, E.; LÓPEZ-CAMACHO, A.; HIGUERA-CIAPARA, I.; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, J. B.; VALLEJO-CARDONA, A. A. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. **Cancer Nanotechnology**, v. 10, n. 11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y>
- BEYENE, H. D.; WERKNEH, A. A.; BEZABHA, H. K.; AMBAYE, T. G. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, p. 18-23, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001>
- BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone.

- International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 181-189, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.003>
- BOAS, U.; CHRISTENSEN, J. B.; HEEGAARD, P. M. H. **Dendrimers: Design, Synthesis and Chemical Properties**. In: *Dendrimers in Medicine e Biotechnology*. S.I.: RSC Publising, 2006. Capítulo 1, p. 1-27. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781847552679-00001>
- CEÑA, V; JÁTIVA, P. Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. **Nanomedicine**. v. 13, 2018, p. 1513-1516. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0139>
- CHAUHAN, A. S. Dendrimers for Drug Delivery. **Molecules**, v. 23, p. 938, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040938>
- CHEN, M. H.; CHIANG, B. H. Modification of curcumin-loaded liposome with edible compounds to enhance ability of crossing blood brain barrier. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 599, 2020. ID 124862. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124862>
- CHIS, A. A. et al. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. **Molecules**, v. 25, p. 3982, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25173982>
- CHOUDHARY, N.; HWANG, S.; CHOI, W. In: BHUSHAN, B. et al. **Handbook of Nanomaterials Properties**. Berlin: Springer-Verlag, 2014. Cap 21, p. 709-729. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-31107-9\\_37](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31107-9_37)
- COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. **Artificial Cerebrospinal Fluid Recipe**. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/9/pdb.rec065730.full?sid=12bf15e6-46cc-4d05-acf9-4766c1c4c5e5>. Acesso em: 07/03/2022, às 8:03h.
- CORREIA, A. C.; MONTEIRO, A. R.; SILVA, R.; MOREIRA, J. N.; SOUSA LOBO, J. M.; SILVA, A. C. Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the blood-brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 189, 2022. ID 114485. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114485>

- CROY, S. R.; KWON, G. S. Polymeric Micelles for Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 36, p. 4669-4684, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.2174/138161206779026245> >.
- CZYŻOWSKA, A.; BARBASZ, A. A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies? **International Journal of Environmental Health Research**, v. 32, n. 4, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1805415>
- DESPHPANDE, P. P.; BISWAS, S.; TORCHILIN, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. **Nanomedicine**, v. 8, n.9, p. 1509-1528, 2013.
- DOMÍNGUEZ-DELGADO, C. L.; FUENTES-PRADO, E.; ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; VIDAL-ROMERO, G.; RODRÍGUEZ-CRUZ, I. M.; DÍAZ-TORRES, R. **Chitosan and Pluronic® F-127: Pharmaceutical Applications**. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. New York: Taylor and Francis, 2016. p. 1513-1535. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/E-EBPP-120050057>
- DUARTE, A. M. G. Resveratrol and extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases. Masters thesis, 2015.
- DURÃES, F.; PINTO, M.; SOUSA, E. Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, 2018. DOI: <https://10.3390/ph11020044>
- EALIA, S. A. M.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, v. 263, 2017. ID 032019. DOI:<https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- EL-GENDY, M. A.; EL-ASSAL, M. I. A.; TADROS, M. I.; EL-GAZAYERLY, O. N. Olmesartan Medoxomil-loaded mixed micelles: Preparation, characterization and in vitro evaluation. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 90-94, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.04.001>
- EVERS, M. J. W.; VAN DE WAKKER, S. I.; DE GROOT, E. M.; JONG, O. G. de; GITZ-FRANÇOIS, J. J. J.; SEINEN, C. S.; SLUIJTER, J. P. G.; SCHIFFELERS, R. M.; VADER, P. Functional siRNA Delivery by Extracellular Vesicle-Liposome Hybrid Nanoparticles. **Advanced Healthcare Materials**, v. 11, 2022. ID 2101202. DOI: <http://doi.org/10.1002/adhm.202101202>

- FAISAL, N.; KUMAR, K. Polymer and metal nanocomposites in biomedical applications. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 7, p. 2286-2294, 2017.
- FEIGIN, V. L. *et. al.* Burden of Neurological Disorders Across the US From 1990-2017: A Global Burden of Disease Study. **Jama Neurology**, v. 78, n. 2, p. 165-176, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.4152>
- FERACCI, H.; GUTIERREZ, B. S.; HEMPEL, W.; GIL, I. S. G. **Organic Nanoparticles**. In: FUENTE, Jesus M. de la; GRAZU, V. Nanobiotechnology: inorganic nanoparticles vs organic nanoparticles. S.I.: Frontiers of Nanoscience, v. 4, 2012. p. 197-230. Capítulo 8. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415769-9.00008-X>
- FERRIÈRES, J. The french paradox: lessons for other countries. **Heart**, v. 90, p. 107-111, 2004.
- FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. The uses of resveratrol for neurological diseases treatment and insights for nanotechnology based-drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119832>
- FREITAS, P. G. C. de; OLIVEIRA, J.; BARBOSA, R.; ELOY, J. de O. Encapsulação de resveratrol em nanopartículas poliméricas a base de policaprolactona e TPGS. **Encontros Universitários da UFC**, Fortaleza, v. 3, 2018.
- GAJBHIYE, V.; PALANIRAJAN, V. K.; TEKADE, R. K.; JAIN, N. K. Dendrimers as therapeutic agents: a systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 989-1003, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1211/jpp/61.08.0002>
- GONDA, A.; ZHAO, N.; SHAH, J. V.; CALVELLI, H. R.; KANTAMNENI, H.; FRANCIS, N. L.; GANAPATHY, V. Engineering Tumor-Targeting Nanoparticles as Vehicles for Precision Nanomedicine. **Med One**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.20900/mo.20190021> .
- GRANDE, F.; TUCCI, P. Titanium Dioxide Nanoparticles: a Risk for Human Health? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160321114341>
- GRIT, M.; CROMMELIN, D. J. A. Chemical stability of liposomes" implications for their physical stability. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, p. 3-18, 1993.

- GUO, P.; HUANG, J.; ZHAO, Y.; MARTIN, C. R.; ZARE, R. N.; MOSES, M. A. Nanomaterial Preparation by Extrusion through Nanoporous Membranes. **Small**, v. 14, 2018. ID 1703493. DOI: <http://doi.org/10.1002/sml.201703493>
- GUO, T.; LIN, M.; HUANG, J.; ZHOU, C.; TIAN, W.; YU, H.; JIANG, X.; YE, J.; SHI, Y.; XIAO, Y.; BIAN, X.; FENG, X. The Recent Advances of Magnetic Nanoparticles in Medicine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2018, 8 p., 2018. ID 7805147. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/7805147>
- GUO, W.; LI, A.; JIA, Z.; YUAN, Y.; DAI, H.; LI, H. Transferrin modified PEG-PLA-resveratrol conjugates: in vitro and in vivo studies for glioma. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, p. 41-47, 2013.
- GYULAI, G.; MAGYAR, A.; ROHONCZY, J.; OROSZ, J.; YAMASAKI, M.; BOSZE, SZ.; KISS, É. Preparation and characterization of cationic Pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles. **Express Polymer Letters**, v. 10, n. 3, p. 216-226, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.20>
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, vol. 4, n. 1, art. 4: 9pp, 2001. DOI: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- HERNANDEZ, C.; SHUKLA, S. Liposome based drug delivery as a potential treatment option for Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 6, p. 1190-1198, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327328>
- HUSSEINI, G. A.; PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 10, p. 1137-1152, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.008> >.
- ISAILOVIC, B. D.; KOSTIĆ, I. T.; ZVONAR, A.; OREVIĆ, V. B.; GAŠPERLIN, M.; NEDOVIĆ, V. A.; BUGARSKI, B. M. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 181-189, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.006>

- JARDIM, F. R.; ROSSI, F. T. de R.; NASCIMENTO, M. X.; BARROS, R. G. da S.; BORGES, P. A.; PRESCILIO, I. C.; OLIVEIRA, M. R. de. Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review. **Molecular Neurobiology**, v. 55, p. 2085-2101, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0448-z>
- JEELANI, P. G.; MULAY, P.; VENKAT, R.; RAMALINGAM, C. Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. **Silicon**, v. 12, p. 1337-1354, 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12633-019-00229-y> >.
- JUÈRE, E.; KLEITZ, F. On the nanopore confinement of therapeutic drugs into mesoporous silica materials and its implications. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 270, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.04.031> >.
- JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia e seus métodos de estudo**. Histologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 1-18.
- KABANOV, A. V. *et al.* A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene) - poly (oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. **Journal of Controlled Release**, v. 22, n. 2, p. 141-157, 1992.
- KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 759-779, 2002.
- KAPIL, A.; AGGARWAL, G.; HARIKUMAR, S. L. Nanotechnology in novel drug delivery system. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 4, n. 5, p. 21-28, 2014.
- KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 3-5, 2005.
- KECECILER-EMIR, C.; ILHAN-AYISIGI, E.; CELEN-ERDEN, C. *et al.* Synthesis of Resveratrol Loaded Hybrid Silica-PAMAM Dendrimer Nanoparticles With Emphases on Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytotoxicity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, p. 219-225, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00897-5>

- KELLENI, M. T. 2021, Resveratrol-zinc nanoparticles or pterostilbene-zinc: potential COVID-19 mono and adjuvant therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 139 (2021) 111626
- KIM, J. C.; CHUNG, Y. I.; KIM, Y. H.; TAE, G. The Modulation of the Permeability and the Cellular Uptake of Liposome by Stable Anchoring of Lipid-Conjugated Pluronic on Liposome. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 100-108, 2014. DOI:<https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1788>
- KRAUSE, B.; MENDE, M.; POTSCHEKE, P.; PETZOLD, G. Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. **Carbon**, v. 48, p. 2746-2754, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.04.002>
- LARA, H. H.; GARZA-TREVIÑO, E. N.; IXTEPAN-TURRENT, L.; SINGH, D. K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 30, 2011. DOI: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/9/1/30>
- LEE, S. H.; JUN, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, p. 865, 2019. DOI:<https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, C.; HUANG, Z.; LUO, X.; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 10, p. 81-91, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- LI, Z.; VANCE, D. E. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. **Journal of Lipid Research**, v. 49, P. 1187-1194, 2008.
- LI, Z.; HUANG, Y.; PENG, S.; CHEN, X.; ZOU, L.; LIU, W.; LIU, C. Liposomes consisting of pluronic F127 and phospholipid: Effect of matrix on morphology, stability and curcumin delivery. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 207-213, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/01932691.2018.1562353>
- LI, Z.; PENG, S.; CHEN, X.; ZHU, Y.; ZOU, L.; LIU, W.; LIU, C. Pluronics modified liposomes for curcumin encapsulation: sustained release, stability and

- bioaccessibility. **Food Research International**, v. 108, p. 246-253, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.048>
- LIU, J.; GONG, T.; WANG, C.; ZHONG, Z.; ZHANG, Z. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 153-162, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.009>
- LOCKMAN, P. R.; MUMPER, R. J.; KHAN, M. A.; ALLEN, D. D. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood brain barrier. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28:1, p. 1-13, 2002. DOI: [10.1081/DDC-120001481](https://doi.org/10.1081/DDC-120001481)
- LOUREIRO, J. A.; ANDRADE, S.; DUARTE, A.; NEVES, A. R.; QUEIROZ, J. F.; NUNES, C.; SEVIN, E.; FENART, L.; GOSSELET, F.; COELHO, M. A. N.; PEREIRA, M. C. Resveratrol and grape extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 22, n. 277, 2017.
- LU, Y.; ZHANG, E.; YANG, J.; CAO, Z. Strategies to improve micelle stability for drug delivery. **Nano Research**, v. 11, n. 10, p. 1-14, 2018. Review Article. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2152-3> >.
- MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; MOZAFARI, M. R.; GAIANI, C.; LINDER, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, p. 436-452, 2011.
- MARESOVA, P.; KLIMOVA, B.; NOVOTNY, M.; KUCA, K. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe - A Call for a Uniform European Strategy. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 54, n. 3, p. 1123-1133, 2016.
- MATERÓN, E. M.; MIYAZAKI, C.M.; CARR, O.; JOSHI, N.; PICCIANI, P. H. S.; DALMASCHIO, C. J.; DAVIS, F. SHIMIZU, F. M. Magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review. **Applied Surface Science Advances**, v. 6, 100163, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100163> >.
- MEER, S.; KAUSAR, A.; IQBAL, T. Attributes of Polymer and Silica Nanoparticle Composites: A Review. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1103267> >.

- MIGUEL, C. A.; NOYA-RIOBÃ, M. V.; MAZZONE, G. L.; VILLAR, M. J.; CORONEL, M. F. Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions of resveratrol after experimental nervous system insults. Special focus on the molecular mechanisms involved. **Neurochemistry International**, v. 150, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105188>
- MINGKWAN, T.; SUKSIRIWORAPONG, J.; CHANTASART, D. Pluronic® P123/TPGS and Pluronic® F127/TPGS Mixed Micelles for the Entrapment of Itraconazole. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n.4, p. 946-956, 2015.
- MIRANDA, A. A. de A. **Aplicações da Nanotecnologia em Doenças do Foro Neurológico: Vantagens e Desafios**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2014. Monografia de Mestrado.
- MISRA, S.; CHOPRA, K.; SINHA, V. R.; MEDHI, B. M. Galantamine-loaded solid-lipid nanoparticles for enhanced brain delivery: preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluations. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1434-1443, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1089956>
- MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282-289, 2010.
- MOHANTY, R. K.; THENNARASU, S.; MANDAL, A. B. Resveratrol stabilized gold nanoparticles enable surface loading of doxorubicin and anticancer activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, n. 1, p. 138-143, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.057>
- MOURYA, V. K.; INAMDAR, N.; NAWALE, R. B.; KULTHE, S. S. Polymeric Micelles: General Considerations and their Applications. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 2, p. 128-138, 2011.
- NARAYAN, R.; NAYAK, U. Y.; RAICHUR, A. M.; GARG, S. Mesoporous sílica nanoparticles: a comprehensive review on synthesis and recente advances. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, 118, 2018. DOI: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/3/118#>
- NEJATI, K.; DADASHPOUR, M.; GHARIBI, T.; MELLATYAR, Hassan; AKBARZADEH, Abolfazl. Biomedical Applications of Functionalized Gold

- Nanoparticles: A Review. **Journal of Cluster Science**, v. 33, p. 1-16, 2021  
<https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9>
- NEVES, A. R.; QUEIROZ, J. F.; REIS, S. Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 27, 2016.
- OLSON, F.; HUNT, C. A.; SZOKA, F. C.; VAIL, W. J.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 557, p. 9-23, 1979.
- OLUSANYA, T. O. B.; AHMAD, R. R. H.; IBEGBU, D. M.; SMITH, J. R.; ELKORDY, A. A. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. **Molecules**, v. 23, p. 907, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>
- ONG, S. G. M.; CHITNENI, M.; LEE, K.; MING, L. C.; YUEN, K. H. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 36, 2016. DOI: <https://doi.org/doi:10.3390/pharmaceutics8040036>
- PADILLA, F. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados para administração cutânea de fluconazol**. Araraquara, 2014. Dissertação de conclusão do curso Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP. Orientador: Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
- PANDITA, D.; KUMAR, S.; POONIA, N.; LATHER, V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. **Food Research International**, v. 62, p. 1165-1174, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.059>
- PASSERI, E.; ELKHOURY, K.; MORSINK, M.; BROERSEN, K.; LINDER, M.; TAMAYOL, A.; MALAPLATE, C.; YEN, F.T.; ARAB-TEHRANY, E. Alzheimer’s Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 13954. <https://doi.org/10.3390/ijms232213954>
- PARK, S.; CHA, S. H.; CHO, I.; PARK, S.; PARK, Y.; CHO, S.; PARK, Y. Antibacterial nanocarriers of resveratrol with gold and silver nanoparticles. **Materials**

**Science & Engineering C Materials for Biological Applications**, v. 58, p. 1160-1169, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.068>

PATEL, H. S.; SHAIKH, S. J.; RAY, D.; ASWAL, V. K.; VAIDYA, F.; PATHAK, C.; VARADE, D.; RAHDAR, A.; SHARMA, R. K. Structural transitions in mixed Phosphatidylcholine/Pluronic micellar systems and their in vitro therapeutic evaluation for poorly watersoluble drug. **Journal of Molecular Liquids**, v. 364, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120003>

PATEL, K. R.; SCOTT, E.; BROWN, V. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P.; BROWN, K. Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 161-169, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05853.x>

PHACHONPAI, W.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S.; TONG-UN, T.; PREECHAGOON, D. Neuroprotective Effect of Quercetin Encapsulated Liposomes: A Novel Therapeutic Strategy against Alzheimer's Disease. **American Journal of Applied Science**, v. 7, n. 4, p. 480-485, 2010.

PUSHKAR, S.; PHILIP, A.; PATHAK, K.; PATHAK, D. Dendrimers: Nanotechnology Derived Novel Polymers in Drug Delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 40, n. 3, p. 153-158, 2006.

RAHMAN, H. *et. al.* Resveratrol and Neuroprotection: Impact and Its Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.619024>

RAO, D. A.; COTE, B.; STAMMET, M.; FATEASE, A. M. A.; ALANI, A. W. G. Evaluation of the Stability of Resveratrol Pluronic Micelles Prepared by Solvent Casting and Simple Equilibrium Methods. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 4, p. 120-125, 2016.

RIGON, R. B.; FACHINETTI, N.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; CHORILLI, M. Skin Delivery and in Vitro Biological Evaluation of Trans-Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Skin Disorder Therapies. **Molecules**, v. 21, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21010116>

SALAMA, H. A.; MAHMOUD, A. A.; KAMEL, A. O.; HADY, M. A.; AWAD, G. A. S. Phospholipid based colloidal poloxamer-nanocubic vesicles for brain targeting

via the nasal route. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 146-154, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.05.010> .

SANTOS, A. C.; PEREIRA, I.; PEREIRA-SILVA, M.; FERREIRA, L.; CALDAS, M.; COLLADO-GONZÁLEZ, M.; MAGALHÃES, M.; FIGUEIRAS, A.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanotechnology-based formulations for resveratrol delivery: effects on resveratrol *in vivo* bioavailability and bioactivity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 127-140, 2019.

SANTOS, F. K. dos. **S237d Desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo praziquantel**. Araraquara, 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião.

SANTOS, L. J DOS; ROCHA, G. P.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. DE. Fullereno[C60]: química e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 680-693, 2010.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. **Lipossomas: a bala mágica acertou?** **São Paulo: Química Nova**, 2002. V. 25, n. 6B, p. 1181-1185.

SHAH, V. M.; NGUYEN, D. X.; PATEL, P.; COTE, B.; AL-FATEASE, A.; PHAM, Y.; HUYNH, M. G.; WOO, Y.; ALANI, A. W. G. Liposomes produced by microfluidics and extrusion: A comparison for scale-up purposes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 18, p. 146-156, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.019>

SHAITO, A. *et. al.* Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 2084, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21062084>

SHAMMA, R. N.; SAYED, R. H.; MADRY, H.; SAYED, N. S. EL; CUCCHIARINI, M. Triblock Copolymer Bioinks in Hydrogel Three-Dimensional Printing for Regenerative Medicine: A Focus on Pluronic F127. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 28, n. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0026>

- SHARIFI-RAD, J. *et. al.* Resveratrol-Based Nanoformulations as an Emerging Therapeutic Strategy for Cancer. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.649395>
- SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 15, 2013. <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/10/1/15>
- SHU, X. H.; WANG, L. L.; LI, H.; SONG, X.; SHI, S.; GU, J. Y.; WU, M. L.; CHEN, Xi. Y.; KONG, Q. Y.; LIU, J. Diffusion Efficiency and Bioavailability of Resveratrol Administered to Rat Brain by Different Routes: Therapeutic Implications. **Neurotherapeutics**, v. 12, p. 491-501, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0334-6>
- SOUSA, J. C.; SANTANA, A. C. F.; MAGALHÃES, G. J. P. Resveratrol in Alzheimer's disease: a review of pathophysiology and therapeutic potential. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 78, n. 8, p. 501-511, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-282X20200010>
- SUKSIRIWORAPONG, J.; RUNGVIMOLSIN, T.; A-GOMOL, A.; JUNYAPRASERT, V. B.; CHANTASART, D. Development and Characterization of Lyophilized Diazepam-Loaded Polymeric Micelles. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1208/s12249-013-0032-4>
- SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. The "French Paradox" and beyond: Neuroprotective effects of Polyphenols. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 4, p. 314-318, 2002.
- TELEANU, D. M.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M.; VOLCEANOV, A.; TELEANU, R. I. Blood-brain delivery methods using nanotechnology. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 269, 2018.
- THOMAS, A. H.; CATALÁ, Á.; VIGNONI, M. Soybean phosphatidylcholine liposomes as model membranes to study lipid peroxidation photoinduced by pterin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 139-145, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.002>

- TIWARI, P. M.; VIG, K.; DENNIS, V. A.; SINGH, S. R. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 1, p. 31-63, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano1010031>
- TOMALIA, D. A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. **Polymer Journal**, v.17, n. 1, p. 117-132, 1985.
- TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 137-172, 2001.
- TSOU, Y. H.; ZHANG, X. Q.; ZHU, H.; SYED, S; XU, X. Drug delivery to the brain across the blood brain barrier using nanomaterials. *Small*, v. 14, n. 25, 2017. DOI: 10.1002/smll.201701921
- VARSHNEY, K. Carbon Nanotubes: A Review on Synthesis, Properties and Applications. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 1, n. 1, 2013.
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5381-5414, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S117210>
- VIJAYAKUMAR, M. R.; KUMARI, L.; PATEL, K. K.; VUDDANDA, P. R.; VAJANTHRI, K. Y.; MAHTOC, S. K.; SINGH, S. Intravenous administration of trans-resveratrol loaded TPGS-coated solid lipid nanoparticles for prolonged systemic circulation, passive brain targeting and improved in vitro cytotoxicity against C6 glioma cell lines. **RSC Advances**, v. 6, 2016. ID 50336. DOI: <http://doi.org/10.1039/c6ra10777j>
- WANG, J.; QIU, J. A review of carbon dots in biological applications. **Journal of Materials Science**, v. 54, p. 4728–4738, 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9797-7>
- WEIR, A; WESTERHOFF, P.; FABRICIUS, L.; VON GOETZ, N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 2242–2250, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/es204168d>

- XIANG, S.; ZHANG, K.; YANG, G.; GAO, D.; ZENG, C.; HE, M. Mitochondria-Targeted and Resveratrol-Loaded Dual-Function Titanium Disulfide Nanosheets for Photothermal-Triggered Tumor Chemotherapy. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, n. 211, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3044-5>
- YADAV, AYAZ A; NAGAVARMA, B. V. N.; HEMANT, K. S; VASUDHA L. S; SHIVAKUMAR H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles - a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 16-23, 2012.
- ZHANG, W.; WANG, G.; SEE, E.; SHAW, J. P.; BAGULEY, B. C.; LIU, J.; AMIRAPU, S.; WU, Z. Post-insertion of poloxamer 188 strengthened liposomal membrane and reduced drug irritancy and in vivo precipitation, superior to PEGylation. **Journal of Controlled Release**, v. 203, p. 161-169, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.026>
- ZOU, S.; HE, Q.; WANG, Q.; WANG, B.; LIU, G.; ZHANG, F.; CHENG, X.; WANG, B.; ZHANG, L. Injectable Nanosponge-Loaded Pluronic F127 Hydrogel for Pore-Forming Toxin Neutralization. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 4239-4250, 2021. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S315062>