UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

FELIPE SOUSA SIQUEIRA

Sistema nanotecnológico de liberação sustentada de drogas utilizando uma rede polimérica hidrofílica

Brasília
2023

FELIPE SOUSA SIQUEIRA

Sistema nanotecnológico de liberação sustentada de drogas utilizando uma rede polimérica hidrofílica

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências e Tecnologias em Saúde, PPGCTS, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Professor Orientadora: Claure Nain Lunardi Gomes

Brasília
2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Siqueira, Felipe Sousa
SS618s Sistema nanotecnológico de liberação sustentada de drogas utilizando uma rede polimérica hidrofílica / Felipe Sousa Siqueira; orientador Claure Nain Lunardi Gomes. -- Brasília, 2023.
73 p.

Dissertação(Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) - Universidade de Brasília, 2023.

1. Polieletrólitos. 2. Galocianina. 3. Acetilcolina. 4. Liberação Controlada de Fármacos. 5. Doenças Neurodegenerativas. I. Nain Lunardi Gomes, Claure, orient. II. Título.

FELIPE SOUSA SIQUEIRA

REDE DE POLÍMERO HIDROFÍLICO RETICULADO DE ESCALA NANOMÉTRICA COMO SISTEMA NANOTECNOLÓGICO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientador(a): Profa. Dra. Claure Nain Lunardi
Presidente da Banca
(Universidade de Brasília/FCE)

_____

Profa. Dr. Camila Alves Areda
Membro efetivo
(Universidade de Brasília/FCE)

_____

Prof. Dr. Odair Antonio Barziban
Membro Efetivo
(Instituto Federal de Rondônia)

_____

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
Membro suplente
(Universidade de Brasília/FCE)

Agradecimentos

Durante a minha jornada para terminar este ciclo, foram essenciais o apoio de várias pessoas e instituições. Desta forma, quero expressar a minha humilde gratidão.

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu maior suporte, inspiração e fonte de fé. Por estar ao meu lado me auxiliando em todos os momentos e me instruindo a confiar nele.

Agradeço aos meus pais, Manoel e Risoneide e a minha irmã Anna Karoline, de forma que sem eles, nada disso seria possível. Pois, são presentes enviados por Deus para me ajudar. Me orientam, me incentivam e estão ali por mim em qualquer situação. Ensinaram-me o poder da educação e que consigo realizar tudo o que eu quiser. Devo tudo a eles, são minha base.

A professora Claure e o professor Anderson, por serem mais que professores, mas sim uma segunda família. Família que orienta, apoia, nos impulsiona e nos ensinam que a vida é composta por equilíbrio, sendo fundamental estar em harmonia consigo mesmo.

A minha amiga Bruna Rodrigues, pelo apoio durante o meu processo de depressão e ansiedade. Agradeço imensamente por me ajudar durante este período, me incentivando com a minha família e estando comigo nos perrengues da faculdade e da vida.

Agradeço também aos meus familiares e amigos, que me ajudaram em oração durante este período para que eu continuasse caminhando.

A Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde (PGCTS) por me auxiliarem na jornada acadêmica com suporte e infraestrutura.

A minha psicóloga e amiga Isolda, a quem sempre chamo de Dona Isolda. Por me mostrar que somos capazes e que a vida deve ser levada de uma maneira mais leve e segura.

A todo aquele que de alguma maneira passou pela minha vida declarando palavras de ânimo, força e fé.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001, da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que forneceram assistência financeira e estrutural que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Posso todas as coisas naquele que me fortalece.
Filipenses 4:13

Resumo

A nanobiotecnologia é uma área que dispõe do encontro de diversos campos científicos como biologia, química, física, óptica, mecânica e tecnologia, de maneira que visa sua atuação e aplicação nas ciências da vida. Sua finalidade é sintetizar e estruturar sistemas em escala nanométrica (1 a 100 nanômetros) que consigam atuar na medicina, em diagnósticos, em terapias gênicas e em outros ramos que visam a saúde e o meio ambiente. Atualmente uma das classes de doenças em que há estudos que trabalham a ação de estruturas nanobiotecnológicas são as doenças neurodegenerativas, caracterizadas pela deterioração do sistema nervoso central, podendo apresentar-se de diversas maneiras a depender do local ou dos grupos neurais afetados. Dentro dessa variedade de doenças, há uma categoria denominada tauopatias que correspondem a transtornos neurodegenerativos ocasionados pelo acúmulo de uma proteína intitulada tau. Portanto, uma das formas de tratamento para essa classe de patologias, é realizado por meio de inibidores da acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina, um neurotransmissor responsável pela regulação da memória, raciocínio, sono e atenção, cujo acúmulo resulta em intoxicações e a manifestação da síndrome colinérgica a depender do receptor estimulado. Desta forma o objetivo deste trabalho é relatar o processo de síntese e caracterização de um sistema nanotecnológico constituído pela junção de dois polímeros considerados inertes ao organismo sendo a quitosana e a goma gelana em associação a galocianina, um corante comumente utilizado para corar corpúsculos de Nissl, que forma um complexo com a acetilcolina, em que recentemente descobriram a possibilidade de ligar-se a receptores LRP5/LRP6 na via WNT e inibir sua interação com uma proteína chamada DKK1 para impedir a fosforilação da proteína tau. Como metodologia de síntese, criamos um complexo de polieletrólito, que é a interação eletrostática entre dois polímeros de cargas opostas e biodegradáveis para ser a matriz do sistema formado, acoplando a galocianina, ligando-se a acetilcolina. Adicionalmente fizemos testes de diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta, espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier, calorimetria diferencial de varredura e perfil de liberação por espectroscopia UV/visível. Os resultados apresentaram que o sistema produzido possui diâmetro médio $>$ 400 nm e $<$ 1000 nm entumecidos, não apresenta carga eletrostática, exibe ponto isoelétrico, boa resistência térmica e em relação à liberação contínua apresenta uma melhor dispersão em pH 10,3 e 7,4 respectivamente. Demonstrando assim, características fundamentais para ser um sistema promissor a ser utilizado para um possível modelo de tratamento conforme os descritos na literatura.

Palavras-chave: Polieletrólitos; Galocianina; Acetilcolina; Liberação Controlada de Fármacos; Doenças Neurodegenerativas

Abstract

Nanobiotechnology is an area that brings together various scientific fields such as biology, chemistry, physics, optics, mechanics and technology, in a way that aims at its performance and application in the life sciences. Its purpose is to synthesize and structure systems on a nanometric scale (1 to 100 nanometers) that can act in medicine, diagnostics, gene therapies and other branches that target health and the environment. Currently, one of the classes of diseases in which there are studies that work on the action of nanobiotechnological structures are neurodegenerative diseases, characterized by the deterioration of the central nervous system, which can present in different ways depending on the location or neural groups affected. Within this variety of diseases, there is a category called tauopathies that correspond to neurodegenerative disorders caused by the accumulation of a protein called tau. Therefore, one of the forms of treatment for this class of pathologies is carried out using acetylcholinesterase inhibitors, an enzyme that degrades acetylcholine, a neurotransmitter responsible for regulating memory, reasoning, sleep and attention, whose accumulation results in intoxication and the manifestation of the cholinergic syndrome depending on the stimulated receptor. In this way, the objective of this work is to report the process of synthesis and characterization of a nanotechnological system constituted by the junction of two polymers considered inert to the organism, being chitosan and gellan gum in association with gallocyanine, a dye commonly used to stain Nissl corpuscles, which forms a complex with acetylcholine, in which they have recently discovered the possibility of binding to LRP5/LRP6 receptors in the WNT pathway and inhibiting their interaction with a protein called DKK1 to prevent tau protein phosphorylation. As a synthesis methodology, we created a polyelectrolyte complex, which is the electrostatic interaction between two polymers of opposite charges and biodegradable to be the matrix of the formed system, coupling gallocyanine, binding to acetylcholine. Additionally, we performed hydrodynamic mean diameter tests, zeta potential, fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and release profile by UV/visible spectroscopy. The results showed that the produced system has an average diameter $>$ 400 nm and $<$ 1000 nm swollen, does not have an electrostatic charge, exhibits an isoelectric point, good thermal resistance and in relation to the continuous release it presents a better dispersion at pH 10.3 and 7,4 respectively. Thus demonstrating fundamental characteristics to be a promising system to be used for a possible treatment model as described in the literature.

Keywords: Polyelectrolytes; Gallocyanine; Acetylcholine; Drug Liberation; Neurodegenerative Diseases

Lista de ilustrações

Figura 1 – Diferença entre liberação medicamentosa convencional e por liberação controlada. 19
Figura 2 – Algumas formações que os complexos eletrólitos podem gerar. 20
Figura 3 – Representação esquemática das etapas de formação de um complexo polieletrólito. 21
Figura 4 – Estrutura molecular do polissacarídeo quitosana. 23
Figura 5 – Esquema visual do equilíbrio químico da quitosana em estado neutro e em solução ligeiramente ácida e suas aplicabilidades a depender da sua forma solúvel ou insolúvel. 25
Figura 6 – Estrutura molecular do polissacarídeo aniônico goma gelana. 26
Figura 7 – Estrutura molecular do neurotransmissor acetilcolina. 30
Figura 8 – Estrutura molecular do corante galocianina. 33
Figura 9 – Processo de busca e seleção do artigo selecionado. 38
Figura 10 – Roteiro de síntese do GC-nanogel. 39
Figura 11 – Produto final da síntese - PECs esponja 40
Figura 12 – Espectro de absorção UV-Vis da solução estoque de galocianina. 44
Figura 13 – Curva analítica da absorbância em função da concentração da solução estoque de galocianina. 45
Figura 14 – Espectros de infravermelho de matérias-primas isoladas (GC (galocianina), CG-LA (Goma gelana), CS (quitosana) e esponja PECs (nanomaterial). 46
Figura 15 – Tamanho do nanomaterial em pH 1,6. 48
Figura 16 – Tamanho do nanomaterial em pH 7,4. 48
Figura 17 – Tamanho do nanomaterial em pH 10,3. 49
Figura 18 – Tamanho do nanomaterial vazio em água deionizada. 49
Figura 19 – Nanomaterial em diferentes pHs. 51
Figura 20 – ζ-potencial do nanomaterial em pH 1.6. 52
Figura 21 – ζ-potencial do nanomaterial em pH 7.4. 53
Figura 22 – ζ-potencial do nanomaterial em pH 10.3. 53
Figura 23 – ζ-potencial do nanomaterial vazio em água deionizada. 54
Figura 24 – Espectro do DSC do nanomaterial 55
Figura 25 – Perfil de liberação do nanomaterial em diferentes pHs. 56
Figura 26 – Modelo cinético para perfil de liberação em pH 1,6 57
Figura 27 – Modelo cinético para perfil de liberação em pH 7,4 57
Figura 28 – Modelo cinético para perfil de liberação em pH 10,3 58
Figura 29 – Espectro de acetilcolina pura. 58

Figura 30 – Espectros de absorbância evidenciando as alterações da galocianina e do nanomaterial na presença de acetilcolina. 59
Figura 31 – Esquema visual do nanomaterial finalizado e seu processo de liberação ao local alvo. 60

Lista de tabelas

Tabela 1 – Interpretação do gráfico obtido pela técnica de FTIR. 46
Tabela 2 – Respectivos valores obtidos pela análise de DLS. 47

Lista de abreviaturas e siglas

2D	Duas dimensões
3D	Três Dimensões
AND	Soma os resultados de buscas de dois termos diferentes
CD4	Grupamento de Diferenciação 4
CS	Quitosana
DKK1	Dickkopf 1
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EUA	United States of America
FDA	Food and Drug Adminstration
FTIR	Fourier Transform Infrared Radiation
IV	Intravenosa
NMDA	Receptor N-metil D-aspartato
OH	Hidroxila
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PD	Plasma Desorption (Dessorção por Plasma);
PDI	Índice de polidispersão
PEC	Complexo polieletrólito
nm	Nanomêtros

Sumário

1 **Introdução** 14

2 **Revisão da Literatura** 16
2.1 **Nanobiotecnologia** 16
2.2 **Sistema de entrega de fármacos** 18
2.3 **Complexos de polieletrólitos** 20
2.4 **Quitosana** 23
2.5 **Goma gelana** 26
2.6 **Doenças neurodegenerativas** 27
2.7 **Acetilcolina** 29
2.8 **Galocianina** 32

3 **Objetivos** 35
3.1 **Objetivos Gerais** 35
3.2 **Objetivos específicos** 35

4 **Materiais e Métodos** 36
4.1 **Reagentes e substratos utilizados** 36
4.2 **Equipamentos** 36
4.3 **Levantamento bibliográfico, organização e montagem de protocolo experimental.** 37
4.4 **Processo de Síntese e secagem do GC-nanogel** 38
4.5 **Curva de calibração de galocianina** 40
4.6 **Processo de caracterização para estabilidade física e química do nanomaterial** 40
4.6.1 **Diâmetro hidrodinâmico** 40
4.6.2 **Potencial Zeta** 41
4.6.3 **Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier** . . . 41
4.6.4 **Calorimetria diferencial de varredura (DSC)** 41
4.6.5 **Perfil de liberação por espectroscopia UV/visível** 42
4.6.6 **Análise cinética de liberação do nanomaterial** 42
4.6.7 **Acetilcolina acoplada ao nanomaterial** 43

5 **Resultados e discussão** 44
5.1 **Curva de calibração galocianina** 44
5.2 **Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)** 45
5.3 **Avaliação de característica físico-químicas como tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão** 47

5.3.1 **Análise de tamanho (diâmetro hidrodinâmico)** 47
5.4 **Zeta potencial** 50
5.5 **Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)** . . . 54
5.6 **Liberação *In vitro* da galocianina e análise cinética** 55
5.7 **Acetilcolina acoplado pelo nanomaterial** 58

6 **Conclusão** 62

Referências 63

1 Introdução

Associando nanotecnologia e biotecnologia, a nanobiotecnologia visa sua aplicação em ciências da vida. Sua concepção se baseia na projeção e fabricação de infraestruturas em escala atômica, nano e macromolecular para modificar e alterar as estruturas básicas dos materiais com a finalidade de modular suas propriedades. Este campo da ciência tem se mostrado como uma forma de aplicação bastante relevante para a área das ciências biológicas, surgindo com um vasto conceito de inovação por consequência da junção de métodos, técnicas e ramos como biologia, química, etc. [1] [2].

Um dos maiores problemas e desafios da saúde atual, são as doenças neurodegenerativas. Isso porque ela está relacionada ao estilo de vida e ao envelhecimento das pessoas. Impactando um grande número de indivíduos em que se manifesta por diversos distúrbios neurológicos e afetam não somente o paciente acometido, mas também seus familiares e a economia. Estima-se que mais de 50 milhões de pessoas são acometidas por esta classe de doenças, com uma prospecção de 152 milhões em 2050 caso não encontrem maneiras de prevenir ou extinguir essas doenças. Lamentavelmente os tratamentos atuais não conseguem prevenir ou parar a doença, apenas retarda-la [3].

Desta forma, pesquisadores têm se empenhado em criar sistemas, materiais e metodologias para a aplicação de drogas e outras terapias para atuar no tratamento destas doenças. Um dos exemplos deste sistema, é o complexo polieletrólito. É definido pela junção de dois polímeros classificados como polieletrólitos, os quais apresentam porções carregadas ionizáveis positivas ou negativas. Dentro desta classificação estão duas substâncias conhecidas como quitosana e goma gelana, catiônicas e aniônicas respectivamente que ao entrarem em contato em determinadas proporções, conseguem formar um complexo. É a partir daí que pesquisadores abordam estas estruturas inertes e não tóxicas, como promissores sistemas de liberação controlada de drogas [4].

Este sistema de entrega permite a liberação contínua da droga acoplada, para obter uma reposta farmacêutica almejada. Atualmente os sistemas que temos disponíveis no mercado como, cápsulas, comprimidos, pomadas, xaropes, etc., sofrem reação de primeira passagem no organismo, diminuindo a biodisponibilidade do princípio ativo e uma fraca liberação contínua. Sendo assim, estes novos sistemas de entrega controlada são altamente estudados por sua liberação ser responsiva ao pH do meio, necessitarem de uma pequena quantidade de fármacos, serem biodegradáveis, inertes e podem ser aplicados via endovenosa chegando ao local-alvo com especificidade [5].

Recentemente Mpousis et al. [6] descobriu que um corante chamado galocianina da classe de fenoxazinas, conseguia atuar na via Wnt inibindo a interação entre a proteína Dikkof-1 (DKK1) e os receptores LRP5/LRP6, realizando assim a diminuição da fotofosforilização da proteína tau. Sendo uma substância promissora para o tratamento de doenças que envolvam esta proteína.

Não somente, estudos anteriores informaram que a galocianina possui a capacidade de se ligar a molécula de acetilcolina, visto que consegue formar um complexo através da interação com os sítios ativos. Dados estas condições, é fundamental a criação de um sistema polimérico que consiga atuar no organismo e aprisionar estas substâncias. Para que futuramente possa ser utilizada como uma forma de tratamento que envolvam as funções neurológicas e colinérgicas [7].

2 **Revisão da Literatura**

2.1 **Nanobiotecnologia**

Definido como um sistema que envolve o uso de nanopartículas em sistemas biológicos, a nanobiotecnologia evidencia o encontro de diversos campos científicos, como a biologia, química, física, óptica, mecânica, ciência e tecnologia em escala nanométrica. Sua aplicação na área da biomedicina, ocasionou em novos materiais de estudo e aplicação como, biomateriais, bioterapias, biossensores, etc. Conferindo a nanobiotecnologia uma área que proporciona ferramentas e tecnologias para examinar e modular sistemas biológicos [8].

A nanotecnologia fundamenta-se na utilização de componentes e insumos, em que em seus processos de formação, ao menos um dos componentes se situem na dimensão da escala nanométrica entre um a cem nanômetros. De forma que o manejo deste material gera novos materiais em diversas áreas, como compostos menores, em menor custo, mas com eficácias maiores. Sendo considerado por muitos estudiosos a área e tecnologia, como componente da Quarta Evolução Industrial [9].

Provinda do ramo da biotecnologia, a nanotecnologia pode ser entendida como o manejo de átomo a átomo para a criação de estruturas como nanotubos, nanocristais, nanofios, nanofibras, nanobastões e nanofilmes, estruturas que não estão presentes na realidade diária seja de indústrias ou no mercado em geral. No ramo farmacêutico a nanobiotecnologia apesar de ser uma área relativamente nova, visa amparar as necessidades de produtos em diversos segmentos [10].

A indústria farmacêutica mira no desenvolvimento na área farmacológica de sistemas de transporte ou detecção de biomarcador, bem como na área da medicina, na elaboração de biochips, copolímeros ou nano sensores que ajudam na restauração de lesões trazendo avanços nas áreas preventivas e terapêuticas [10].

Estudos revelam que a nanotecnologia é presente na engenharia alimentar, de modo que esses nanomateriais agem como andaimes de DNA para superar as barreiras celulares das plantas e liberarem os sensores geneticamente codificados para pesquisas em culturas. Desse modo essa nanotecnologia foi capaz de entregar plasmídeos de DNA no interior das células vegetais, penetrando nas células *in vivo* sem adição de compostos químicos externos ou forças mecânicas [11].

A atuação deste sistema visa o cuidado com as plantas e os vegetais através da monitorização da condição de saúde das mesmas e o controle da atuação dos aparelhos eletrônicos visando melhorar a fenotipagem e a produtividade das culturas. Com isso, acrescentar nas lacunas de conhecimento da área da biologia e nanobiotecnologia vegetal, ferramentas para auxiliar no acompanhamento de biomoléculas vegetais [11].

Com um efeito crescente cada vez mais presente em países e regiões de primeiro mundo, onde se preocupam com esse novo tipo de tecnologia, grupos de estudos em

regiões da Europa lideram as subdisciplinas de nanobiotecnologia voltadas a sistemas de distribuição e desenvolvimentos de nano drogas. No Brasil, mesmo sendo um campo na área da ciência que seja muito novo, há diversas tentativas por parte das universidades e de centros de pesquisa a avançarem neste setor para competirem internacionalmente. Com isso, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação elaborou medidas que beneficiasse o desenvolvimento do país, criando em 2003 a Coordenação Geral de Nanotecnologia e um grupo de trabalho com uma equipe multidisciplinar para criar um programa nacional de Pesquisa e Desenvolvimento em Nanociências e Nanotecnologias [10].

Um dos atributos principais de uma nanopartícula ou um nano sistema é que possuem uma camada protetora que protege uma substância de diagnóstico ou o núcleo interno de uma molécula terapêutica. Essa estrutura externa e interna pode ser constituída de metais e/ou polímeros, tendo como característica estrutural um tamanho pequeno e uma extensa área de superfície. Gerando uma gama de vantagens e habilidades únicas para entrar no interior da célula, como liberação controlada, a mudança em relação a efeitos tóxicos e amplificação dependo do contato de uma superfície de um determinado sinal. Observando assim, que a nanotecnologia está presente e afeta três áreas da medicina, que são: Terapêutica, diagnóstica e imagem [12].

Por mais que não nos atentemos, a nanotecnologia está presente naturalmente em nosso meio. Temos como exemplo a criação de nanopartículas formadas após relâmpagos e encontradas em meteoritos relatando uma conexão universal. Outras fontes são biológicas, como a transferência de lipídeos, proteínas entre as células que ocorrem em escala nano e as transmissões neurais relacionadas a memória fundamentado no armazenamento e degradação de material ao nível de partícula nanoescala [13].

Com o passar dos anos e a evolução da nanotecnologia, desenvolveram-se vários métodos promissores de tratamento para uma série de doenças, como, por exemplo, o câncer. Alguns dos métodos que surgiram foram a terapia fototérmica, terapia quimiodinâmica, terapia fotodinâmica e hipertermia por micro-ondas. Por conta desse desenvolvimento e da melhora das técnicas de fototerapia e das técnicas ópticas com associação de nanomateriais, houve um aumento da exploração destas terapias para a viabilização como tratamento de câncer [14].

Embora haja tratamentos convencionais, a fototerapia se destaca principalmente pelo fato de os protocolos de aplicação serem mais simples, possuírem especificidade no local de tratamento e os efeitos colaterais serem mínimos. Ocasionando na diminuição dos efeitos secundários e aumentando as chances de recuperação [14].

A nanotecnologia não se resume apenas a uso de compostos químicos, Ahmad et al. [15] em suas pesquisas disserta sobre a popularidade crescente de uma síntese verde, processo biocompatível e ecologicamente correto, que usa como fontes plantas, bactérias, fungos e algas usando um agente estabilizante e nivelador para evitar aglomeração e controlar o tamanho.

2.2 **Sistema de entrega de fármacos**

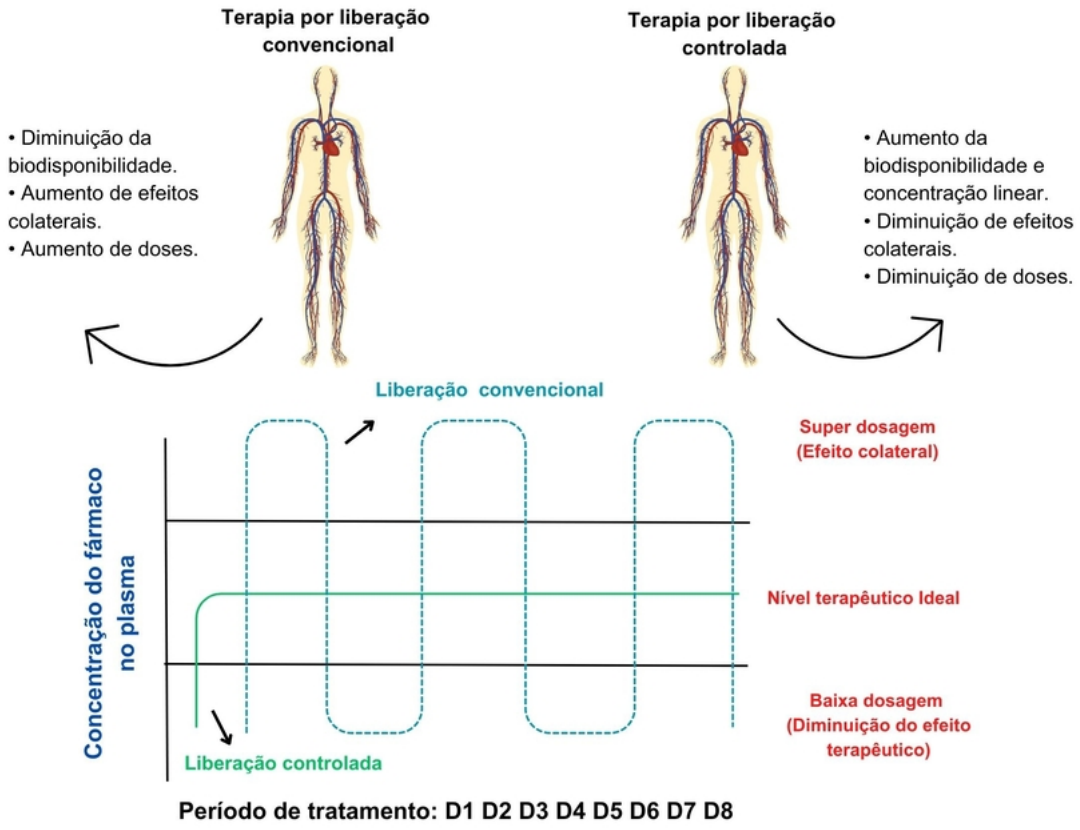
Nas últimas seis décadas a tecnologia para a entrega controlada de fármacos evoluiu com grande maestria. Essa evolução iniciou em 1952, em que houve a inserção da primeira formulação de liberação controlada. Desta forma que no período entre 1950 - 1980, ocorreu o desenvolvimento e a síntese de sistemas de liberação controlada de forma oral e transdérmica e na instauração destes mecanismos, denominando esse período como 1ª geração. Com isso, a 2ª geração (1980 - 2010) destacou-se na formulação de sistemas de administração de fármacos autorregulados, de ordem zero, de depósito de longo prazo e por fim, sistemas de administração baseados em nanotecnologia, principalmente as nanopartículas [16].

A entrega de drogas nada mais é do que uma estrutura com a função de ser um veículo para moléculas terapêuticas, permitindo a administração de medicamentos no organismo, tal qual, melhora a eficácia, reduz riscos de intoxicação e permite a liberação segura e controlada destes compostos terapêuticos. Estes sistemas além de drogas, são utilizados para entregar genes, células, moléculas bioativas ou área alvo via transplante, ou injeção. São sistemas que em um modo geral, são divididos em entrega de drogas e entrega de células, mas com a grande inovação e a pesquisa contínua. Abordagens recentes atuam na formulação de entrega de moléculas bioativas, como fatores de crescimento, proteínas e peptídeos [8].

Diante dos mais diversos tipos de sistemas de liberação controlada de fármacos, temos as nanopartículas, estruturas que vêm crescendo com grande potencial de ação durante os últimos anos. Os fármacos encapsulados nestes sistemas nanométricos, que incluem lipossomas, nanocápsulas, micelas, dendrímeros, nanocápsulas, nanoesferas dentre outras, possuem a capacidade de melhorar o índice terapêutico, a eficácia, diminuir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade [17].

De modo geral, sabemos que o ideal para o organismo é que os fármacos sejam liberados de maneira controlada e em locais-alvo para haver um aumento do efeito terapêutico e redução dos efeitos colaterais (figura 1). Com o surgimento da nanotecnologia, as nanoplataformas de liberação controlada dão a opção dos medicamentos carregados agirem de uma forma inteligente, além de poderem ser associados à diferentes tipos de nanopartículas [18].

Figura 1 – Diferença entre liberação medicamentosa convencional e por liberação controlada.



Próprio autor, 2023.

A entrada de nanopartículas dentro do organismo humano pode acontecer por três vias principais, ingestão oral, inalação, mas principalmente injeção direta. Ao entrar na circulação sistêmica, no primeiro momento, ocorre a interação partícula-proteína evento que antecede a distribuição em diversos órgãos. Desta forma a distribuição e a eliminação se torna facilitada pelo sistema linfático por meio da absorção dos capilares sanguíneos [19].

De forma geral, este sistema apresenta três funções principais das quais duas estão relacionadas a administração de fármacos, em que a primeira abrange a filtragem dos fluidos dos capilares sanguíneos pelo sistema linfático. Já a segunda função se manifesta pela ação do sistema linfático em que a partir do momento em que ocorre a recuperação do líquido, há também a captação das células desconhecidas [19].

Uma das formas principais de se utilizar como estímulo ou gatilho para a liberação controlada de fármacos é o pH, isso ocorre porque os sistemas nanométricos são sintetizados com base na variação do pH em diferentes órgãos, tecidos tumorais, inflamatórios e isquêmicos, de modo que estes sistemas conseguem diferenciar mudanças delicadas de pH em locais específicos de uma patologia [18].

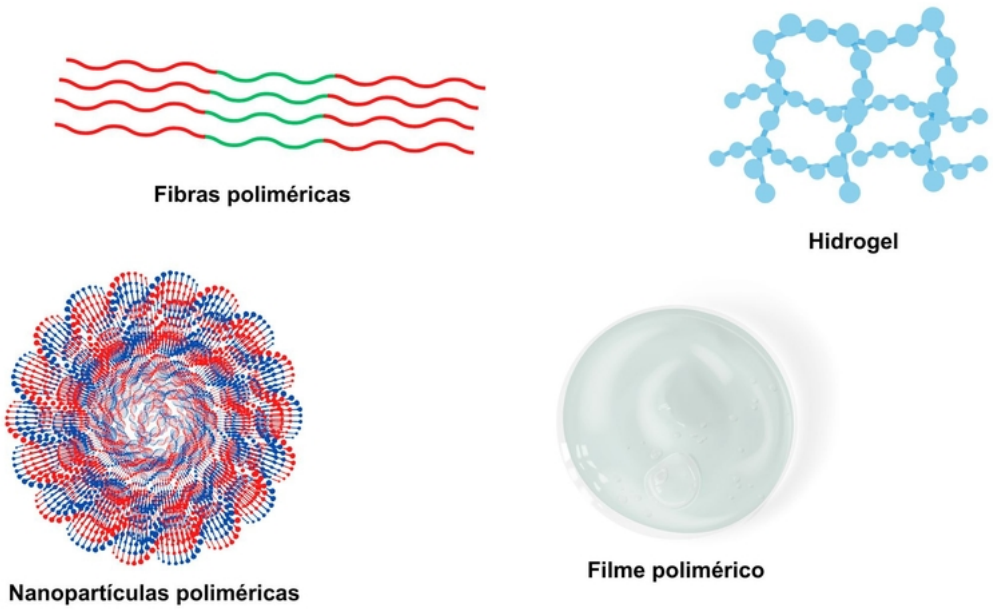
Com isso e com base na literatura, podemos inferir que o melhor tamanho de um nanomaterial para sistemas utilizados com o intuito de atravessar a barreira hematoencefálica

são de aproximadamente 100 nm. Isso porque, sistemas com esta dimensão conseguem acoplar quantidades suficientes de drogas com base em sua associação entre superfície e volume. Apresentando uma maior vantagem no quesito absorção, tendo os sistemas de 100 nm, uma absorção 2,5 vezes maior que os de 1 μm e de 6 vezes maior aos sistemas de 10 μm. Porém, isso depende muito do tipo de nanomaterial e das características da formulação apresentada [19].

2.3 Complexos de polieletrólitos

Redes de estruturas tridimensionais conectadas por ligações não covalentes são denominados como complexos de polieletrólitos. Isso porque, suas ligações podem ocorrer por forças eletrostáticas, hidrogênio e/ou hidrofóbicas entre os polímeros de cargas opostas. Essas interações dependem extremamente das propriedades dos polieletrólitos reagentes, sendo que as interligações ocorrentes entre os grupos aniônicos e os catiônicos são reversíveis por esse fator. Desta maneira, estes complexos (figura 2) são amplamente empregados em sistemas de separação de proteínas, membranas e próteses médicas com a preparação voltada para o uso de polímeros naturais, em razão de serem absorvíveis pelo organismo, atóxicos e poderem formar complexos binários ou ternários [20] [21].

Figura 2 – Algumas formações que os complexos eletrólitos podem gerar.

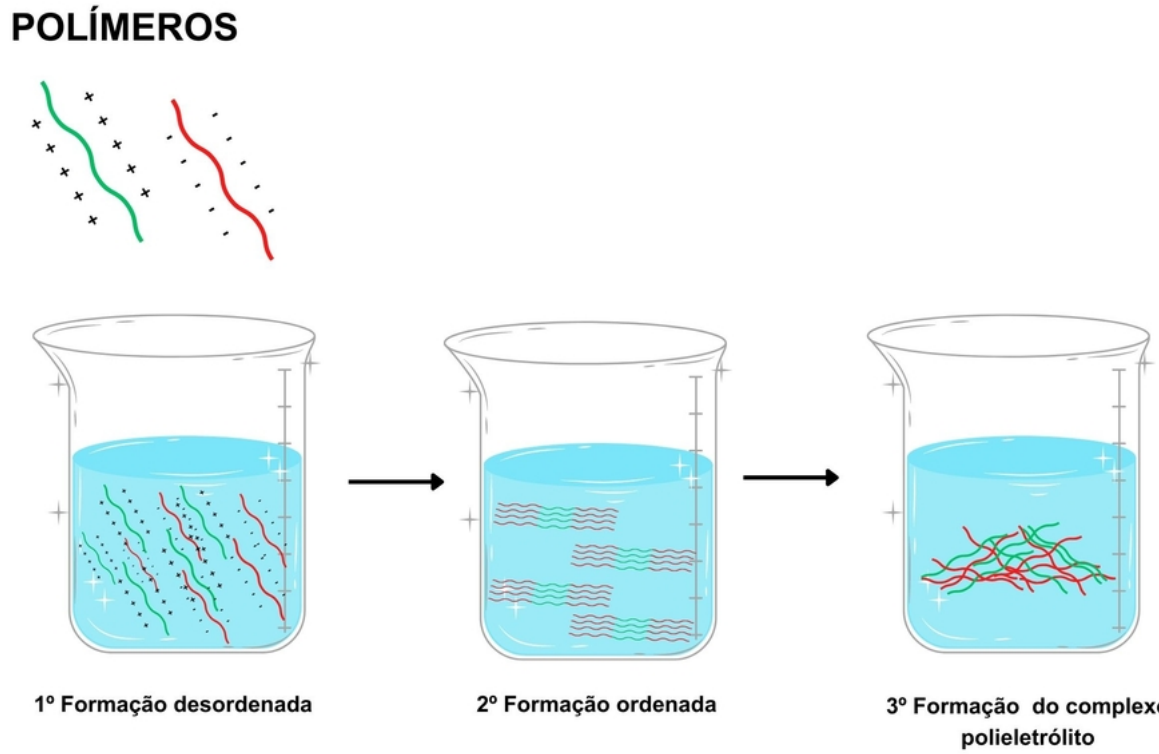


Próprio autor, 2023.

Com uma construção ecológica e segura, os complexos polieletrólitos estão inseridos no processo de síntese de materiais empregados para a entrega de medicamentos. O processo de fabricação é relativamente simples de ser introduzido, visto que a formação dessa união de polímeros acontece em água sem solventes orgânicos, surfactantes ou reticulados químicos, dispondo apenas da condensação iônica entre os polímeros. Apresenta em suas características baixa taxa de deformação estrutural ocasionada por temperatura, bem como ser efetivamente estável [22].

Wu et al. [23] descreve que a formação destes complexos compreende três etapas (figura 3). A primeira ocorre de forma instantânea e aleatória com a formação de um complexo primário com distorções relevantes das cadeias poliméricas. Logo após, acontece o rearranjo das ligações presentes dos intracomplexos e formam o complexo secundário, cuja ligação pode ser eletrostática, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas. Por último, os complexos primários e secundários se agregam sob determinadas condições, seguida de floculação irreversível e expressa as estruturas estáveis e variadas, como redes ordenadas, fibrilas, emaranhados, etc. [24].

Figura 3 – Representação esquemática das etapas de formação de um complexo polieletrólito.



Próprio autor, 2023.

Comparáveis aos nanogéis em razão das redes 3D de polieletrólitos fisicamente ligados em suas estruturas, estes complexos foram mencionados na literatura com vários outros termos dependendo da compreensão particular de cada pesquisador, os quais

são nanopartículas, nanocompósitos, nanocomplexos, nanomontagens entre outros. Dito assim, a grande vantagem que este sistema apresenta e que faz com que aumente as investigações de aplicação em campos biomédicos, são o envolvimento de biomateriais, da nanomedicina e principalmente a química verde [25].

Os complexos polieletrólitos dependem de vários parâmetros para serem classificados, são eles: arquitetura molecular, grupos ionizáveis ácidos (grupos carboxílicos ou fosfato, etc.), básicos (grupos amino), de origem natural (ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, etc.) sintéticos (ácido poliacrílico) e a capacidade dos grupos se dissociarem parcial ou totalmente. Assim, a depender destes fatores e do tipo de dissociação é concedido a classificação de um complexo polieletrólito como fraco ou forte. Forte sendo insensível à alteração de pH do meio e fraco quando o pH afeta a dissociação, dado que o equilíbrio iônico é fundamental para a determinação dos grupos carregados [26].

Além disso, os complexos polieletrólitos formados por polissacarídeos como quitosana (carga positiva) e goma gelana (carga negativa, devido à presença de ácido galacturônico), podem ser aplicados de várias formas como nano, micropartículas, hidrogéis, filmes e carreadores para administração de drogas. [24]

Estudos demostram que estes complexos usados como carreadores podem apresentar características termoresponsivas, ou seja, polímeros que apresentem um equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico dependente da temperatura, devido à sujeição à diferença no estado de dissolução iônica entre os monômeros associados em diferentes temperaturas. [27] Portanto, os complexos formados por esse tipo de polímero apresentam encolhimento com maior hidrofobicidade ou maior liberação em locais com maior quantidade de água [28].

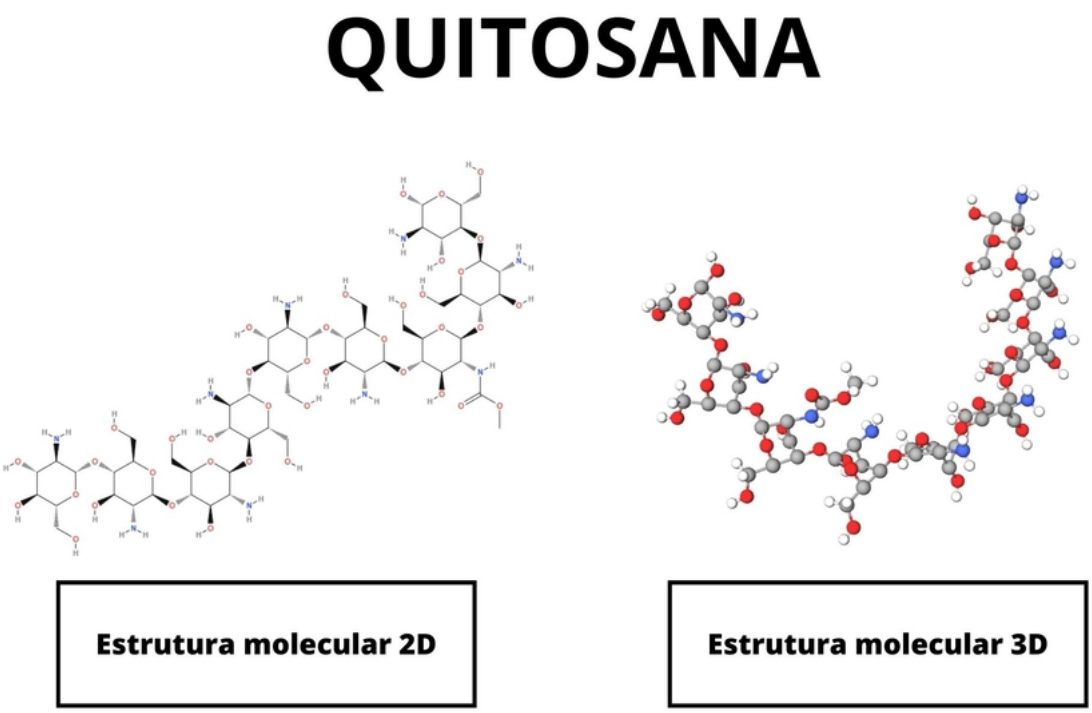
Durante o processo de síntese é fundamental realizar o processo de refinamento destas partículas, para evitar a interação relativamente fraca de polímeros livres na superfície dos complexos polieletrólitos já formados. Por isso, é extremamente necessário realizar o processo de centrifugação e o produto final ser ressuspenso com um volume mínimo de água deionizada para caracterização físico-química imediata, ou liofilizado para manter a estabilidade a longo prazo [29].

Por fim, quando se foca na aplicação deste nanomaterial na entrega de drogas, o procedimento de preparação de complexos polieletrólitos não deve utilizar nenhum componente químico tóxico ou solvente orgânico. Deve priorizar pela biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, esta técnica de complexação apresenta diversas vantagens como: processo simples de síntese, a possibilidade de combinar características favoráveis de pelo menos dois componentes, custo e eficiência energética, propriedades físico-químicas ajustáveis, dimensões em nanoescala e capacidade de associação com macromoléculas terapêuticas e liberação controlada por estímulos da carga útil do medicamento [30].

2.4 **Quitosana**

Um polissacarídeo de caraterística alcalina, natural e renovável, a quitosana (figura 4) é uma molécula que não apresenta toxicidade e nem efeitos colaterais, exibindo bons atributos relacionados a hidratação e adsorção. O órgão de inspeção Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, permitiu o uso da quitosana em alimentos e medicamentos, aprovando-o por ser um composto benéfico e seguro [31].

Figura 4 – Estrutura molecular do polissacarídeo quitosana.



Próprio autor - Criado e obtido através do website MolView, 2023.

O ambiente marinho apresenta um grupo principal de macro e micromoléculas os quais são os polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Dentre os vários polissacarídeos de origem marinha, a quitina é a mais abrangente e o segundo polímero com maior disponibilidade na natureza, perdendo apenas para a celulose. Com características físico-químicas excepcionais, a quitina apresenta bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e alta resistência mecânica. Embora possua estas propriedades, possui uma grande desvantagem que é a aplicação limitada ocasionada pela baixa solubilidade, tornando-se uma substância pouco útil. [32] Desta forma, a quitosana acaba tornando-se a principal substância para indústrias e pesquisadores, visto que é um produto derivado da desacetilação da quitina e apresenta características físico-químicas superiores, como maior solubilidade em água e alterações químicas ocorrentes da presença do grupo amino livre em sua estrutura [33].

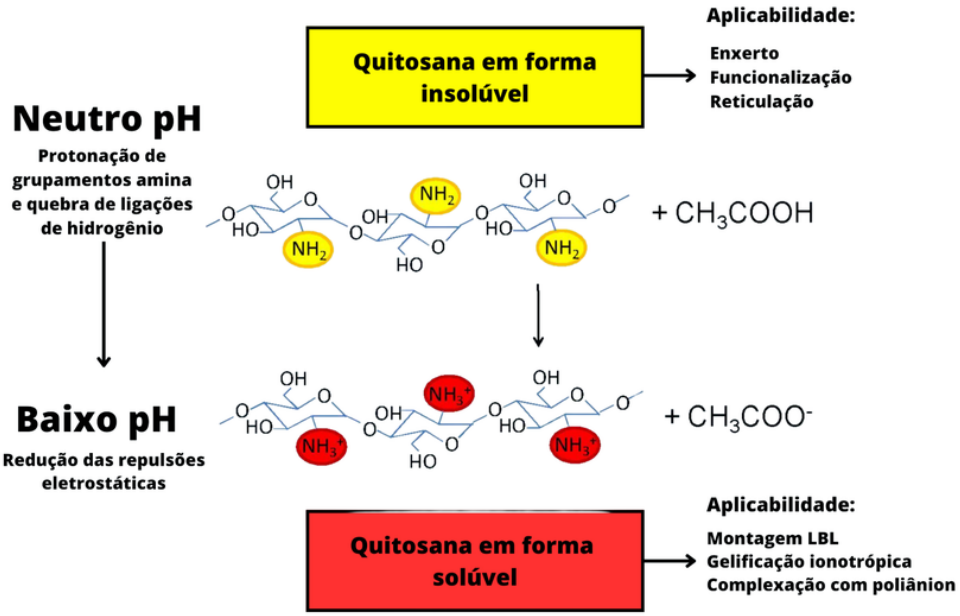
A desacetilação pode ser de origem enzimática ou química, porém a química é a mais utilizada por ser rápida e de baixo custo. Na quitosana o que irá conferir suas características físico-químicas será a massa molecular e a taxa de *N* -desacetilação conferindo também, sua característica positiva para participar de interações eletrostáticas como, ligação em ácidos nucleicos e outros polímeros com cargas opostas. Abrangendo características de bioadesividade, baixa toxicidade, permeabilização e propriedades farmacêuticas, a quitosana é um veículo com habilidade para ser utilizado em diversas formas e áreas do campo da entrega de genes e drogas [33] [34].

Com atividade antifúngica, a quitosana possui um enorme potencial para atuar no tratamento de doenças ocasionadas por fungos e bactérias patogênicas em humanos. Ensaios já demostram que tanto fungos, quanto bactérias que possuem sensibilidade a quitosana exibem permeabilização de membrana relacionado a energia por quitosana. Recentemente pesquisas sugerem que a quitosana seja utilizada como um antimicrobiano para uso clínico, já que este polímero consegue exterminar *Fusarium proliferatum* e *Hamigera avellanea,* patógenos oportunistas em organismos humanos e possui melhores ações contra bactérias Gram-positivas [35] [36].

Com métodos básicos de preparação, a quitosana é uma escolha chamativa para estudos e formulações. Na grande maioria dos casos de síntese, as partículas de quitosana são preparadas por gelificação ionotrópica o que resulta em partículas de 10 - 1000 nm. Além disso, este biomaterial é capaz de encapsular diversas moléculas e drogas hidrofílicas e hidrofóbicas [37] [38].

Em relação ao pH, descobriu-se que o pH ambiental é um dos fatores mais críticos que afetam a atividade antimicrobiana da quitosana, visto que esta ação exibe funcionalidade apenas em meio ácido em razão da maioria dos grupos amino ficarem sem carga próximo ao pH 7. Em valores de pH abaixo do pk_a,a quitosana associa-se naturalmente com poliíons de cargas negativas em solução para formar complexos polieletrólitos (figura 5) [39] [40].

Figura 5 – Esquema visual do equilíbrio químico da quitosana em estado neutro e em solução ligeiramente ácida e suas aplicabilidades a depender da sua forma solúvel ou insolúvel.



Adaptado de Sacco P, Pedroso-Santana S, Kumar Y, Joly N, Martin P, Bocchetta P. [44], 2023

Recentemente pesquisadores criaram filmes funcionais com atividade significativa para aumentar a validade de produtos alimentícios, onde a carga catiônica da quitosana e a massa molecular são atributos que controlam a atividade antimicrobiana da quitosana. Com isso, cientistas estão buscando criar conjuntos de embalagens inteligentes, capazes de fornecer informações sobre a vida útil de produtos alimentícios embrulhados ou embalados, onde por alteração do pH as embalagens se manifestam por mudança de coloração. Além da quitosana poder ser consumida e já ser utilizada como fibras dietéticas [41].

Estas propriedades presentes na quitosana revelam que sua utilização se divide em três grandes áreas, que são: biomedicina, bioencapsulação (entrega controlada de drogas, genes, curativos, etc.) e ciência alimentar [42]. Microcápsulas de quitosana tendem a apresentar estruturas inteligentes e multifuncionais, as macrocápsulas voltam-se para o armazenamento de probióticos e alimentos e nanocápsulas são focadas em tratamentos específicos de doenças [43] [42].

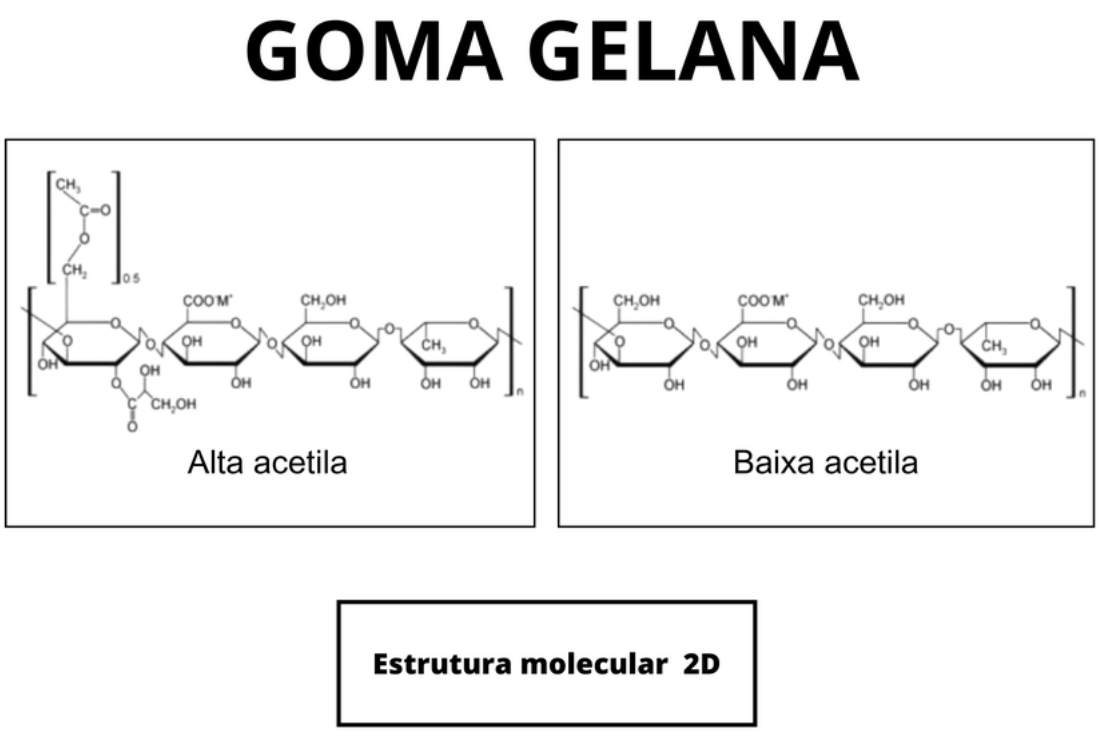
Em suma, a aplicabilidade da quitosana em várias áreas da vida humana se deve ao fato de ser um composto multifuncional, visto que, principalmente pela necessidade de melhorias no setor médico e de saúde, formam géis de baixo custo onde suas propriedades físico-químicas promovem interações moleculares com outros materiais e a síntese de novos compostos [44].

2.5 **Goma gelana**

Sendo considerado um dos biopolímeros mais chamativos para aplicações biomédicas, a goma gelana é um exopolissacarídeo aniônico com solubilidade em água sintetizado por uma bactéria denominada *Sphingomonas elodea.* Devido a sua estrutura molecular, a goma gelana em determinados fatores consegue alterar sua forma entre solução e gel formando um gel forte e firme. Este processo ocorre quando a goma sofre um resfriamento de temperatura saindo de $>$ 80 ºC para temperatura ambiente ou em interações com cátions mono e bivalentes [45] [46].

Atualmente encontram-se dois tipos de goma gelana, a goma gelana de alta acetila denominada goma gelana nativa e a goma desacetilada que possui baixa acetila (figura 6). De maneira geral, os géis provenientes da goma gelana são sensíveis ao processo de cisalhamento onde alteram sua estrutura e viscosidade. Porém, a goma gelana nativa promove a síntese de géis mais rígidos, com ótima gelificação, com maior estabilidade térmica, visto que apresentam o grupo anil [47].

Figura 6 – Estrutura molecular do polissacarídeo aniônico goma gelana.



Próprio autor, 2023.

Assim como a quitosana a goma gelana apresenta características físico-químicas relevantes para área da saúde e alimentar. Possui boa biocompatibilidade, não toxicidade,

biodegradabilidade, natureza estável e é renovável [48]. As maiores características apresentadas pela goma gelana são sua maleabilidade, texturas e alta eficiência. Em que em pH aumentado sua forma granular incha, e em pH baixo apresenta-se estável [49].

Com uma série de estudos evidentes, os hidrogéis e aerogéis a base de goma gelana apresentam uma alta habilidade de formar um entrecruzamento de rede com alta capacidade de retenção de água, tornando-o uma substância ideal para a síntese de hidrogel. É importante ressaltar que a difusão da goma gelana proporciona estruturas espirais que se agregam de maneira espontânea e estruturas helicoidais ocasionadas pela transição de temperatura de alta para baixa [50].

2.6 **Doenças neurodegenerativas**

Desordens cerebrais, como tumores e doenças neurodegenerativas, são um caso sério de problemas de saúde que causam disfunções nas atividades normais do funcionamento humano, trazendo grandes impactos econômicos. O maior problema para o tratamento desta classe de doenças é a barreira hematoencefálica, que limita a passagem de fármacos e drogas afetando e reduzindo a eficácia terapêutica, principalmente pelos efeitos colaterais ocasionados pela má dispersão das drogas que falham ao entrar no sistema nervoso central [51][52].

Caracterizadas por serem doenças de caráter incomplacente de grupos neurais específicos, doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Lou Gehrig ou esclerose lateral amiotrófica apresentam um sério desafio clínico, pois instaurado o processo de neurodegeneração, a doença não pode ser interrompida, apenas retardada. Isso ocorre, devido ao avanço da deterioração neuronal nas regiões subcorticais e se propaga para regiões corticais conforme a evolução da doença [53]. Sendo assim, um fator crescente da morbidade e mortalidade ao redor do mundo, principalmente em idosos [54].

As disfunções neuronais individuais são diversificadas em suas manifestações clínicas e fisiologia latente, podendo apresentar características sobrepostas. Por esses fatores, a necessidade de um diagnóstico preciso, possibilita um prognóstico mais seguro com uma orientação de um tratamento específico para a condição clínica [54]. A prevalência dessa classe de doenças vária muito do país estudado, porém a patologia com maior ocorrência é a demência com 9,33% de incidência em todo mundo, acarretada sobretudo pelo envelhecimento da população [55].

Doenças neurodegenerativas estão associadas especialmente à agregação de proteínas amiloides fora ou no interior das células. Estas proteínas são definidas como fibrilas de proteínas longas e não ramificadas que apresentam difração da fibra β (beta) cruzada ao serem examinadas por meio de raios-X [56] [52].

O envelhecimento do cérebro é caracterizado como um dos marcadores biológicos mais significativos da neurodegeneração. Isso porque demonstra uma variação de altera-

ções homeostáticas como danos ao DNA, agregação de proteínas, disfunção lisossômica, mitocondrial e por mutações na regulação epigenética. As intermissões que ocorrem no processo homeostático são capazes de ocasionar diversas doenças, visto que o tecido cerebral é vulnerável ao processo de envelhecimento, dado à sua composição por células pós-mitóticas sensíveis a mudanças dependentes da idade como metilação ou deterioração do DNA [57].

Fundamentos convincentes provindos de Investigações de estudos genéticos, neuropatológicos, bioquímicos, celulares e experimentos com camundongos transgênicos, revelam que a oligomerização (dobramento incorreto) e o acúmulo de proteínas no cérebro, são sobretudo os episódios que provocam as anormalidades patológicas dessas doenças. Infelizmente estas proteínas relacionadas a essas doenças não apresentam semelhanças perceptíveis correlacionadas a sequência, estrutura, nível de expressão ou função. Todavia, sabe-se que todas sofrem o desdobramento incorreto dos seus estados originários para criar as estruturas ricas em folhas β intermoleculares, sejam elas alteração de grandes agregados fibrilares ou de pequenos oligômeros presentes no cérebro enfermo [52].

Das doenças mais comuns causadas pela neurodegeneração, temos a doenças de Alzheimer ocasionada pela redução do processo cognitivo resultante da formação difundida de placas amiloides extracelulares ou emaranhados intracelulares constituídos de proteínas tau, que hiperfosforiladas acarretam perda neuronal e sináptica. Dispomos também do Mal de Parkinson, caracterizado pela perda de neurônios do seguimento compacto da substância negra com o agrupamento de alfa-sinucleína ubiquitinada e inclusões proteicas denominadas corpos de Lewy e neurite de lewy. Por fim, a Esclerose Múltipla, patologia propagada pelo sistema inflamatório definida pela perda neuronal, axonal, desmielinização inflamatória envolvendo o cérebro e a medula espinhal, porém de etiologia ainda complexa, com indícios de que sejam fatores genéticos e ambientais sua origem desencadeadora [58] [59].

Não obstante, o conhecimento de que o acúmulo destas proteínas específicas apresenta indícios fidedignos, está cada vez mais claro, que inúmeras interferências de proteínas estão correlacionadas as informações necessárias nessas doenças. Visto que, há co-patologias mistas de proteínas cerebrais vistas não exclusivamente em doenças neurodegenerativas, mas em cérebros com envelhecimento natural, mas que desenvolvem o risco de demência por uma simples patologia proteica adicional de baixo grau [59].

Como foi relatado anteriormente, o grande desafio para o tratamento destas doenças são a série de barreiras existentes para proteger o sistema nervoso central. São elas, a barreira sangue-líquido cefalorraquidiana, a barreira hemato-retiniana, a barreira hemato-medular e por fim, a mais crítica de todos, a barreira hematoencefálica [60]. Isso ocorre, porque a barreira hematoencefálica é responsável por barrar as substâncias nocivas, sejam elas químicas ou oriundas da corrente sanguínea, sendo semipermeável, seletiva

e constituída de células endoteliais, junções apertadas, astrócitos, membrana basal e moléculas transportadoras de efluxo [60] [61].

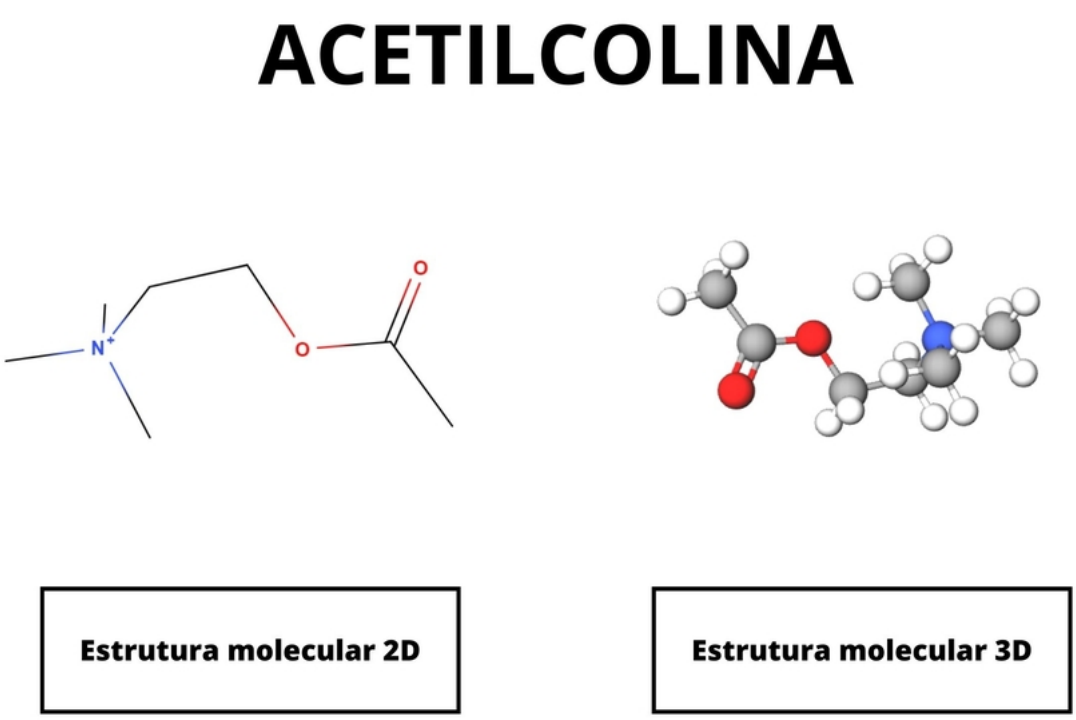
Os tratamentos dos distúrbios neurodegenerativos são específicos para cada doença manifestada e condições apresentadas, são vários os tipos de medicamentos usados para o tratamento, como donepezil, rivastigmina e galantamina que são inibidores da colinesterase e aumentam o aporte de acetilcolina e auxiliam na diminuição do declínio cognitivo. Temos também a memantina, um antagonista não competitivo do receptor NMDA que reduz a ação do glutamato e consequentemente evitam o dano neural e dispomos de Levodopa e carbidopa que aumentam o aporte de dopamina, bem como reduzem os efeitos da sua diminuição [62].

Infelizmente, embora existam esses tratamentos, eles são apenas para reduzir os sintomas e retardar a progressão das doenças neurodegenerativas, o que faz com que muitos pacientes, principalmente com a doença de Parkinson, busquem por terapias complementares como a acupuntura, cannabis, Tai Chi e Qi Gong para melhor a qualidade de vida [63]. Desta forma, atualmente, para vencer essas limitações existentes de tratamento, a nanotecnologia é fundamental, visto que suas estruturas são específicas, são menores, de grande superfície, de ação local e são inertes ao organismo. o que confere grande potencial para atravessar a barreira hemato encefálica [60].

2.7 **Acetilcolina**

Neurotransmissores são emissários químicos em nosso sistema que são encarregados de transportar uma gama de sinais entre neurônios por meio de sinapses. Um dos vários neurotransmissores presentes e um dos mais importantes é a acetilcolina (figura 7), identificado em seres vertebrados, invertebrados, bactérias e plantas, fazendo-se o principal transmissor do sistema colinérgico [64]. A produção de acetilcolina ocorre mediante a reação entre a acetil coenzima A e colina, catalisada pela enzima colina acetil transferase nos terminais nervosos, cuja expressão dos níveis mensuráveis de acetilcolina foram relatados em uma variedade de tecidos diferentes, bem como a expressão de receptores colinérgicos cognatos para acetilcolina, encontrados em muitos tipos de células e em órgãos dentro e fora do sistema nervoso [65].

Figura 7 – Estrutura molecular do neurotransmissor acetilcolina.



Próprio autor - Criado e obtido através do website MolView, 2023.

Identificado por Sir Henry Dale entre 1914 - 1915, porém revelado seu papel como mensageiro químico por Otto Loewi [66], a acetilcolina não atua apenas como um neurotransmissor, atua também como um neuromodulador no sistema nervoso central. Apresenta neurônios colinérgicos responsáveis pela sua síntese em diversas áreas do cérebro, como em particular no tronco encefálico, prosencéfalo basal, estrato e núcleo habenular medial. De forma que o sistema colinérgico é constituído por dois tipos de receptores, que são: os receptores nicotínicos, classificado como receptores ionotrópicos, e os receptores muscarínicos pertencentes ao grupo dos receptores metabotrópicos, regulando fatores no sistema nervoso simpático e parassimpático [67].

Estudos evidenciam que a acetilcolina possui um papel fundamental no desenvolvimento cérebro cortical e subcortical para promover a maturidade neuronal, aprimorar as conexões sinápticas e guiar a formação de circuitos. Tudo isso, baseado em pesquisas que avaliam e examinam a expressão do receptor, marcadores de síntese de acetilcolina e alterações do código genético [68].

No hipocampo dentre os neuromoduladores existentes como a dopamina, serotonina e a noradrenalina, a acetilcolina está relacionada sobretudo com a relação ao aprendizado e a memória, de modo que sua diminuição seja por depleção ou bloqueio dos receptores colinérgicos, acarreta deficiência cognitiva [69].

Com isso, infere-se que a neuromodulação é capaz de ajustar o aprendizado emocional por meio de circuitos disseminados pelo cérebro, em que estudos relacionados a lesões, farmacologia, gravações e rastreamentos fornecem informações significativas a respeito de vias de projeção, bem como a colaboração de neuromoduladores na mudança comportamental durante o aprendizado [70][71]. Como já sabemos, a acetilcolina é um neurotransmissor crítico para várias funções, e é ela quem estabelece as relações entre atenção, trabalho, memória, detecção de pistas, ritmos de sono-vigília a depender do tipo e do local onde os seus receptores estejam localizados [70].

Ocasionado pelo abuso de substâncias tóxicas como organofosforados, uma das denominações de manifestações clínicas a ocorrer pelo excesso de acetilcolina, ou pelo agonismo de seus receptores é a chamada síndrome colinérgica que pode ser de origem central, nicotínica ou muscarínica. Isso ocorre, porque estes pesticidas acabam inibindo a acetilcolinesterase irreversivelmente nas fendas sinápticas e super estimulando os receptores de acetilcolina [72][72]. Conforme a organização mundial de saúde, há sintomas agudos gerais que podem ser identificados em caso de envenenamento humano, sendo eles sudorese, rinorreia, lacrimejamento, salivação, miose e cólicas. Tendo como abordagem primária, a manutenção das funções vitais [73].

Com um papel fundamental na função dos processos cognitivos e no sistema colinérgico na totalidade, o papel da acetilcolina compreende um fator crucial em muitas formas de demência, abrangendo igualmente a doença de Alzheimer, como também outras doenças neurodegenerativas. Isso ocorre devido à perda sináptica e a perda de neurônios colinérgicos, que consequentemente reduz os níveis de acetilcolina contribuindo para déficits de memória e atenção [74] [75]. Embora existam tratamentos existentes que retardam a progressão destas doenças, como os inibidores da acetilcolinesterase e alguns agonistas de receptores aprovados pelos órgãos de saúde, estas drogas possuem efeitos significativos apenas no início da manifestação da doença o que pode variar entre 1 e 3 anos [74] [76].

Além disso, a acetilcolina está envolvida em outras funções no organismo humano, como a modulação da função das células imunológicas e na vasodilatação. Investigações recentes compreenderam que a estimulação do nervo vago foi capaz de produzir uma resposta protetora contra a sepse pela indução e síntese de acetilcolina no baço em camundongos. Sabendo-se que o baço não produz acetilcolina e se um neurônio colinérgico não estivesse próximo a um tipo de célula-alvo não haveria este reflexo inflamatório. Em 2011 o Dr. Kevin Tracey percebeu que a produção de acetilcolina esplênica era proveniente de linfócitos T $CD4^{+}$ em resposta ao nervo vago, de tal forma que vários pesquisadores desde então apontaram haver uma ampla variedade de células não neuronais que podem produzir acetilcolina [77] [78].

Acresce que, envolvendo este sistema, é ressaltado e evidenciado que há registros da presença de receptores nicotínicos denominados α7nAChRs gerados por macrófagos, monócitos, células dendríticas e outras do sistema imunológico que ao serem estimulados

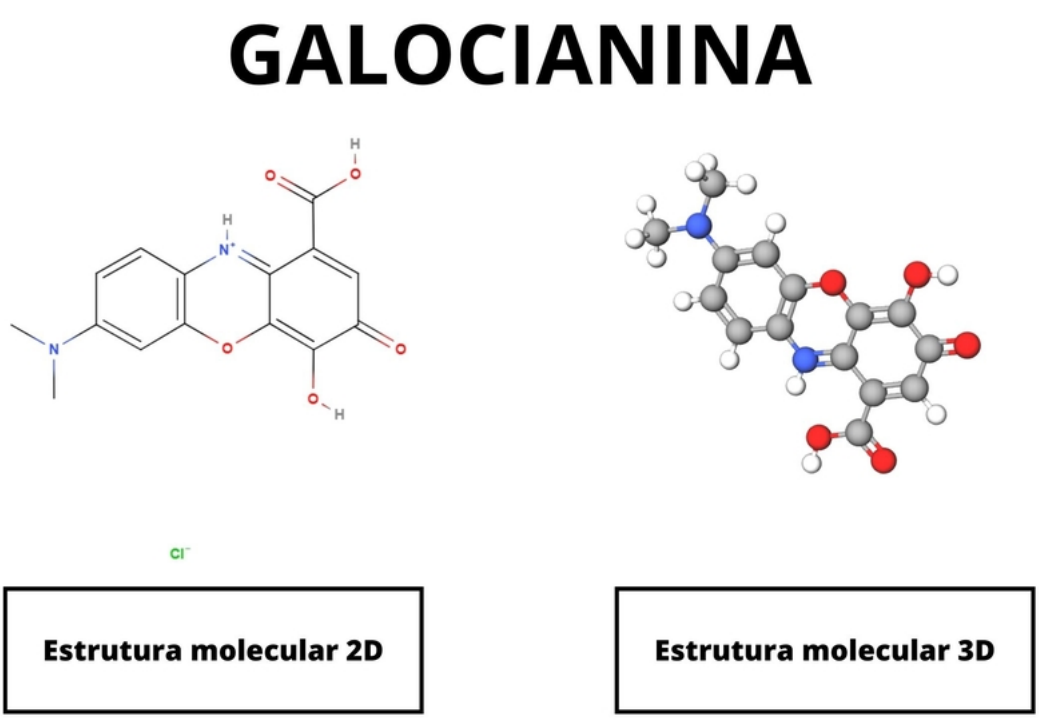
pela acetilcolina provocam respostas anti-inflamatórias primárias, tal qual esta interação promove a inibição da síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, estimulando uma série de vias de sinalização, embora a ligação real entre os receptores e as proteínas intracelulares não sejam completamente conhecidas [78] [79]. Nos seres humanos, também ocorre a produção de α7nAChRs, porém recentemente o gene que codifica o receptor, sofreu uma duplicação parcial para sintetizar um novo gene híbrido chamado CHRFAM7A01 que no processo de transdução de baixa eficiência produz um peptídeo intitulado dupα7. Apesar deste peptídeo interagir como o receptor α7nAChRs, ele não apresenta a porção que desempenha a função de agonista, o que faz com que ele não responda à acetilcolina, intitulado como um inibidor negativo dominante. É relatado que pacientes com alta produção deste peptídeo apresentam um estado inflamatório aumentado. Porém, já é visto que o tratamento com um modulador alostérico positivo, usado em processos inflamatórios, chamado PNU-120596, consegue superar o efeito do dupα7 [78] [77].

Vale destacar também que Steinhart [7] fez um estudo para determinar a concentração de acetilcolina através de um ensaio colorimétrico por meio do corante galocianina, visto que a acetilcolina é instável em água e acaba se decompondo em ácido acético e colina. Desta forma, a galocianina consegue se complexar com a acetilcolina nos seus principais sítios de ligação dando margem para diversos estudos na área bioquímica e biológica.

2.8 **Galocianina**

De fórmula molecular $C_{15}H_{13}ClN_2O_5$ a galocianina (figura 8) é um corante obtido por intermédio da nitrosodimetilanilina e do ácido gálico. É classificada como um sal de cloreto orgânico composto de 1-carboxi-7-(dimetilamino)-3,4-dihidroxifenoxazin-5-ium e íons cloreto em uma proporção de 1:1 com diversas aplicações no meio biológico. Categorizado como uma substância de caráter fluorocromo e com atividade de coloração histológica, a galocianina é usada para coloração em exame microscópico ou de microscopia eletrônica de células e tecidos para ocasionar uma dissemelhança e destacar características específicas de interesse, como núcleo e citoplasma [80] [81].

Figura 8 – Estrutura molecular do corante galocianina.



Próprio autor - Criado e obtido através do website MolView, 2023.

SHAH [82] em umas das citações mais antigas sobre a galocianina, descreve-a como um corante que em conjunto com alguns metais, possui a ação de corar o grupo oxazina de ácidos nucleicos totais, onde basófilos presentes em estruturas que os contenha adquirem uma cor azulada. Estudos relatam que a galocianina apresenta aplicações no meio ambiente para identificação de arsênio em conjunto com a quitosana, ocorrendo por intermédio de um gel de quitosana com galocianina imobilizada [83].

A galocianina também é classificada como uma fenoxazina, uma classe de compostos existentes em produtos naturais que exercem diversas atividades e encontram-se em moléculas bioativas. Recentemente, descobriu-se que a molécula de galocianina possui a capacidade de inibir a interação entre DKK1-LRP5/LRP6 na via wnt. Inibindo a fosforilação da proteína tau, cuja característica é presente na doença de Alzheimer, sendo possível assim, sua aplicação em tratamento de tauopatias, principalmente por ser o único composto, atualmente, capaz de inibir esta interação. Porém, um dos maiores problemas encontrados é a que a galocianina tem baixa associação com os receptores LRP5/LRP6, o que dificulta sua aplicação clinicamente [84].

Thysiadis et al. [85], projetou e sintetizou inibidores de galocianina que fossem capazes de intervir entre a interação de DKK1/LRP6 como um possível tratamento da doença de Alzheimer, com isso, puderam concluir que a molécula de galocianina alquilada com

grupo éster eram inibidores mais ativos, porém as derivadas de amino em C_2 apresentavam menor eficácia, ressaltando que essas moléculas até a concentração de 100 μM não eram citotóxicas.

Podemos observar que a nanobiotecnologia tem sido amplamente utilizada como uma abordagem promissora no tratamento de doenças neurodegenerativas, visto que a ligação de compostos bioativos, como a galocianina, acoplado a sistemas nanométricos formados por quitosana e goma gelana, podem proporcionar uma liberação controlada e direcionada de tal componente para o sistema nervoso central, proporcionando assim, uma redução de efeitos adversos e superdosagens, bem como o aumento na implementação de tratamentos mais eficazes [84] [4].

Com isso, está revisão bibliográfica destaca a importância da criação de um nanomaterial com o intuito de promover um sistema de liberação sustentada de substâncias terapêuticas, tal qual a relevância da nanobiotecnologia com ações inovadoras no tratamento de patologias.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral foi sintetizar e estruturar um sistema nanotecnológico de liberação controlada de drogas à base de componentes inertes ao organismo humano, sendo estes polímeros a quitosana e a goma gelana para serem utilizados como uma possível forma de tratamento de tauopatias ou que envolvam a interação responsiva da acetilcolina presente [redacted]co.

3.2 Objetivos específicos

• Avaliar a ligação entre a acetilcolina e a galocianina por meio de uma curva de concentração;

• Avaliar o tipo de ligação química entre o sistema e a galocianina;

• Medir a resposta de liberação do nanomaterial em diferentes pHs;

• Avaliar as alterações estruturais do sistema polimérico e suas formas separadas por FTIR;

• Avaliar o tamanho e a carga superficial do sistema através do ZetaSizer;

• Medir o fluxo de calor, bem como a temperatura relacionada ao comportamento do nanomaterial em função da condição de calor exposta, por meio da técnica DSC *(Differential Scanning Calorimetry)*;

4 **Materiais e Métodos**

O presente estudo foi realizado em laboratório e baseado nos artigos "Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potente anti-angiogenesis in tumor" [86] e no *"Curcumin-loaded polysaccharides-based complex particles obtained by polyelectrolyte complexation and ionic gelation. I-Particles obtaining and characterization"* [87].

4.1 **Reagentes e substratos utilizados**

Durante a condução do experimento, os reagentes utilizados foram aplicados em seu estado puro, já que não careciam de purificação. Desta forma no processo de síntese, caracterização e verificação da rede polimérica, utilizaram-se os seguintes reagentes:

Quitosana (Sigma Chem. Aldrich®);
Goma gelana (Tipo Kelcogel® CG-LA);
Galocianina (Sigma Chem. Aldrich®);
Cloridrato de acetilcolina ≥99% (TLC) (Sigma Chem. Aldrich®);
Ácido acético glacial, ReagentPlus®, ≥99% (Sigma Chem. Aldrich®);
Ácido cítrico Ph. Eur., BP, USP, E330, anidro, 99,5-100,5% (Sigma Chem. Aldrich®);
Tampão ácido clorídrico pH 1,6;
Tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4;
Tampão cloreto de amônio pH 10,3;

4.2 **Equipamentos**

Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco® modelos CFLV09 e CFLV12;
Banho de Aquecimento Redondo 4 Litros Temperatura 50 a 120ºC Fisatom®;
Centrífuga Alta Velocidade CR-22N Hitachi® Refrigerada;
Mini agitador magnético – TOPOLINO IKA®;
Espectrofotômetro UV-vis marca Hitachi Hight-Tecnologies Coporation®, modelo U-3900H;
Liofilizador de Piso K105 - Alfa Mare;
Micropipeta Monocanal Plus 100 - 1000 µl Kasvi®;
Micropipeta Monocanal Plus 10 - 100 µl Kasvi®;
pHmetro de bancada (Verificar marca);
Malvern® Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600;
Tubo Tipo Falcon Estéril 15 ml marca Kaja Vet®.
Balança analítica marca Martemodelo AY 220;

4.3 **Levantamento bibliográfico, organização e montagem de protocolo experimental.**

Com o intuito de sintetizar e aprimorar o sistema almejado desta pesquisa com enfoque no objetivo proposto do nanomaterial. Realizou-se um levantamento bibliográfico em instrumentos de pesquisas específicas como (Pubmed, SciElo, e biblioteca virtual em Saúde). Desta forma, por meio de estratégias de busca, utilizaram-se Descritores

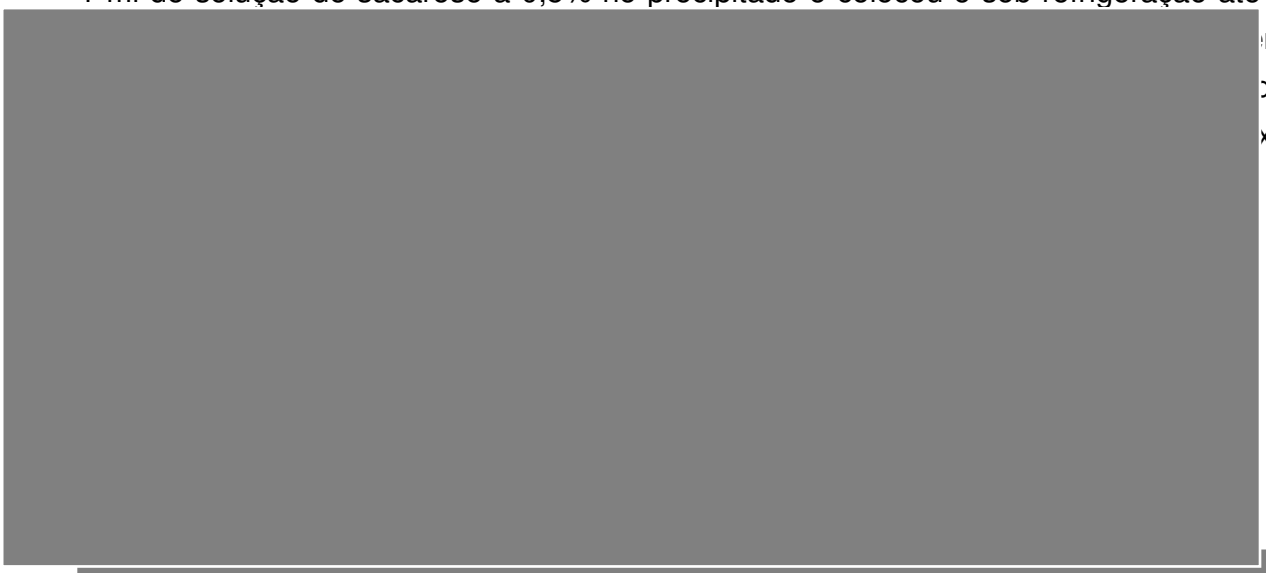
busca foram aplicados com o propósito de selecionar estudos que apresentassem textos completos publicados nos últimos 7 anos e dos quais contemplassem idiomas em português e inglês. Como parâmetros de inclusão e exclusão, os estudos elegidos foram os que apresentassem o tema proposto e que respondessem questões norteadoras como: Há possibilidade de criar um sistema nanotecnológico pela junção de dois polímeros? Apresenta viabilidade de ser inerte ao organismo? Sua síntese é de baixo custo? Sua estrutura é estável? Seu sistema de ligação pode se ligar ao composto escolhido?

Por fim, como critérios de exclusão, realizou-se uma avaliação crítica com os seguintes termos: Título, resumo, apresentação de artigos em duplicatas e que não se enquadrassem com o tema proposto. Assim, selecionamos um artigo que atendesse aos critérios e principalmente cuja metodologia fosse capaz de se unir a uma metodologia pré-estabelecida de um trabalho anterior desenvolvido. Todo o processo pode ser observado no fluxograma abaixo (figura 9).

4.4 **Processo de Síntese e secagem do GC-nanogel**

A síntese do nanomaterial teve início na diluição de 100 mg quitosana em 4 ml de

Com o fim do processo de centrifugação, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1 ml de solução de sacarose a 0,5% no precipitado e colocou-o sob refrigeração até a



Próprio autor, 2023.

4.5 Curva de calibração de galocianina

O processo de determinação da curva analítica foi realizado por meio da preparação de uma solução estoque de galocianina de concentração conhecida, com a determinação de 40 pontos em 620 nm configurada na faixa de 800 a 200 nm. Desta forma, 2000 µL de água deionizada foram inseridas em cubetas de quartzo no espectrofotômetro para a realização do branco. Após a medida, administraram-se quantidades pré-determinadas da solução estoque de galocianina para aumentar a concentração, mas mantendo o volume final dentro da cubeta. Assim, se 10 microlitros eram adicionados na cubeta, antes da administração de outra quantidade, a mesma quantidade era retirada para não interferir no volume final da solução.

4.6 Processo de caracterização para estabilidade física e química do nanomaterial

4.6.1 Diâmetro hidrodinâmico

A avaliação do nanomaterial foi mensurada pala técnica de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido), considerando a média de 5 medições. O equipamento foi configurando para equilíbrio igual a 0, à temperatura ambiente de 25 ºC, onde 1 mg de amostra foi diluída em 2000 µL de soluções com pH em 1,6, 7,4, e 10,3, em que 1000 µL foi inserido na cubeta para análise no ângulo fixo de espalhamento 173º e aquisições dos dados automaticamente.

4.6.2 **Potencial Zeta**

O potencial Zeta do nanomaterial, foi determinado com uma alíquota de (1mg) diluída em 2000 µL de soluções com pH em 1,6, 7,4, e 10,3. 1000 µL foi inserido na cubeta e introduzido no equipamento (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) e configurado para a opção zeta em temperatura ambiente à 25º C, considerando a média de 2 medições para a análise das cargas com pelo menos 10 execuções cada.

4.6.3 **Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier**

Com a capacidade de fornecer informações extremamente relevantes como o arranjo molecular de componentes orgânicos e inorgânicos, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tornou-se uma das técnicas analíticas mais multifuncionais para a definição química não destrutivas de amostras biológicas. O mecanismo implícito da técnica FTIR está relacionado a passagens entre estados de energia vibracional quantizada, em que há a absorção de radiação no espectro infravermelho quando um fóton se transfere para uma molécula e a excita até um grau de energia mais alto, resultando em vibrações de ligações moleculares em várias frequências ou números na região do Infravermelho. [88]

Além disso, o processo de espectroscopia por FTIR se mostra como uma técnica livre de reagentes, simples por ser conduzida e realizada em locais acessíveis, o processamento de dados é rápido e com baixa taxa de erros, as amostras requerem baixa ou nenhuma preparação e pequena quantidade, e é visto como uma técnica que apresenta um custo benefício, onde sua utilização pode ser ampliada ao diagnóstico e a investigação clínica. [89]

Para obter a avaliação da composição química da galocianina, goma gelana, quitosana e o nanomaterial, a medida dos espectros de infravermelho foi obtida através do espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR (Technologies Co., EUA) em que a abrangência do [redacted] ão Molecular (UV-Vis).

4.6.4 **Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Para a avaliação calorimétrica do nanomaterial estabeleceu-se duas etapas fundamentais, são elas:

1 — Análise termo gravimétrica (TGA/DTGA)

Simultaneamente a estabilidade térmica das amostras foram observadas previamente por TG e DTA. Portanto, 5 mg de amostra foram pesados em cadinhos de alumínio e

sela[redacted]

[redacted]o equipamento DSC [redacted]

[redacted]

[redacted]

4.6.5 Perfil de liberação por espectroscopia UV/visível

[redacted]

4.6.6 Análise cinética de liberação do nanomaterial

[redacted]

Modelo de ordem zero: Q t = Q 0 + k 0 × t (1)

Modelo de primeira ordem: l o g Q t = l o g Q 0 + k × t 2,303 (2)

Pseudo primeira ordem: ln (Q e Q t) = l n Q e k 1 × t (3)

Modelo de segunda ordem: 1 Q t = 1 Q 0 k 2 × t (4)

Modelo de pseudo segunda ordem (tipo I): t Q t = 1 k 2 Q e 2 + t Q e (5)

Modelo de pseudo segunda ordem (tipo II): t Q t = (1 k 2 Q e 2)1 t + t Q e (6)

Modelo de pseudo segunda ordem (tipo III): Q t = Q e (1 k 2 Q e) Q t t (7)

Modelo de pseudo segunda ordem (tipo IV): Q t t = k 2 Q e 2 k 2 Q e Q t (8)

Modelo de terceira ordem: 1 Q t = 1 Q 02 k 3 × t (9)

Modelo de Higuchi: Q t = k H × t (10)

Modelo Korsmeyer Peppas: Q t = k K P × t n (11)

Modelo Weibull: Q t = 1 exp((t T i) b a) (12)

Modelo de Hixson Crowell: Q 03 Q t 3 = k H C × t (13)

[92] [93]

4.6.7 **Acetilcolina acoplada ao nanomaterial**

O ensaio foi realizado por meio de uma solução de concentração fixa de acetilcolina e massa conhecida do nanomaterial inserido em uma cubeta. Em seguida, espectros foram obtidos por meio da realização de medidas de absorbância de tempos em tempos, com a finalidade de avaliar a interação da acetilcolina com o nanomaterial e se haveria mudanças na posição do espectro de absorção na questão do comportamento da acetilcolina em associação com o nanomaterial ou a liberação da galocianina.

5 **Resultados e discussão**

5.1 **Curva de calibração galocianina**

A preparação foi realizada com o registro de 40 pontos determinados a partir de uma solução estoque de galocianina de concentração conhecida. A determinação dos valores de absorbância foram avaliados por espectrofotômetro configurado entre 300 e 800 nm. A solução de galocianina foi inserida em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os resultados obtidos são mostrados na figura 12, onde os valores dos espectros obtidos auxiliaram na formação de uma curva de regressão linear mostrado na figura 13.

Figura 12 – Espectro de absorção UV-Vis da solução estoque de galocianina

Próprio autor, 2023.

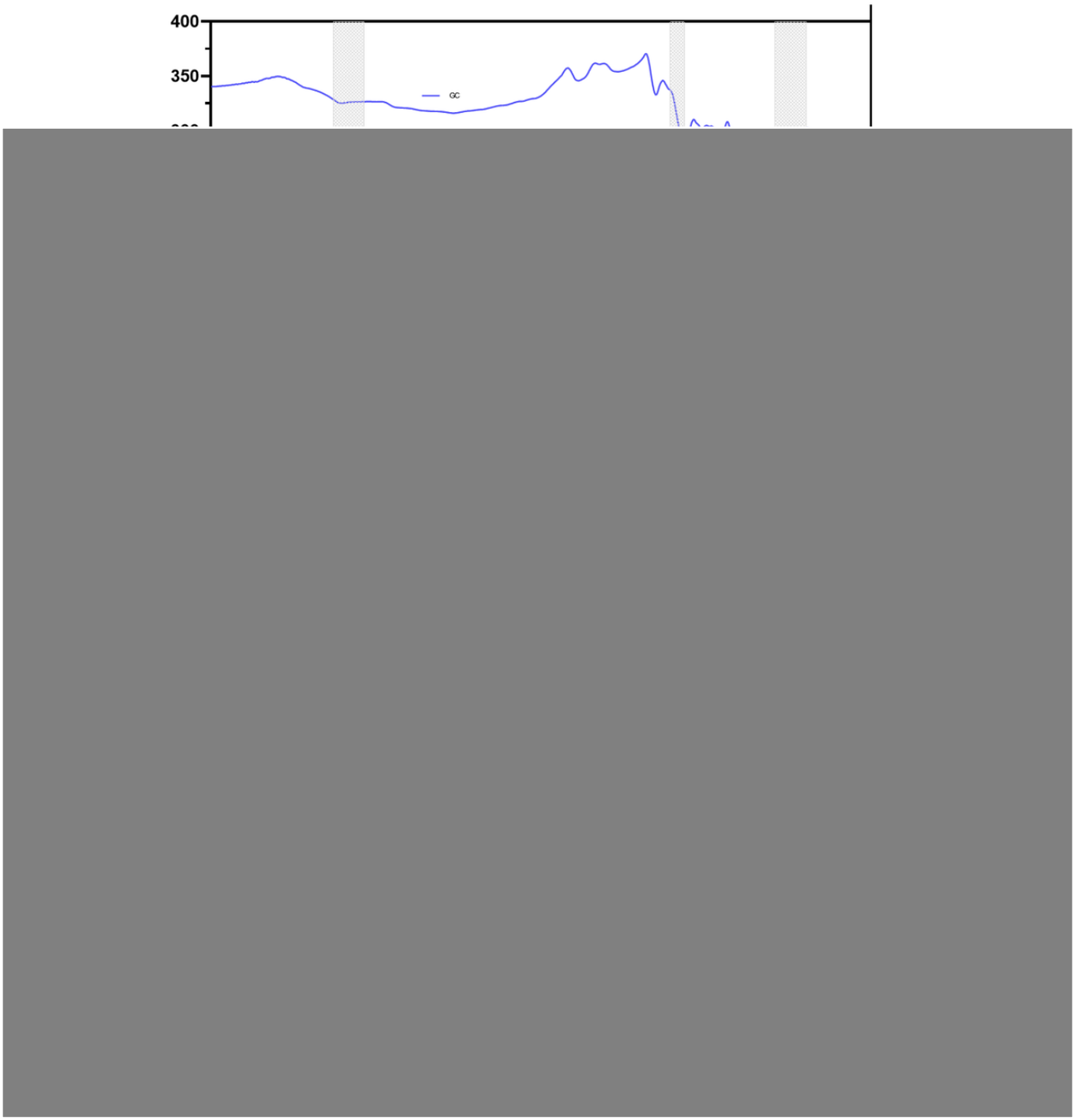
Com os dados obtidos, construímos a curva analítica de absorbância em função de da concentração (figura 13).

Com base nisso, foi possível o uso da equação de regressão linear em que y = ax +b. Os valores obtidos foram y = 6604*X - 0,002218 e R^2= 0,9999, visto que em R^2 valores acima de 0,95 revelam uma maior confiabilidade dos dados obtidos, onde 0,9999 representa uma intensa correlação entre as concentrações administradas.

5.2 **Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A composição química das substâncias presentes no nanomaterial foram avaliadas qualitativamente através dos espectros de absorbância obtidos. Desta forma, foram apuradas as matérias-primas galocianina, goma gelana, quitosana e o produto final o nanogel. Identificamos os principais picos/bandas das amostras observadas no gráfico em modo de transmitância (figura 14) e verificamos suas interações moleculares, bem como os grupos funcionais. A descrição das bandas e picos observados estão descritos na tabela 1.

Figura 14 – Espectros de infravermelho de matérias-primas isoladas (GC (galocianina), CG-LA (Goma gelana), CS (quitosana) e esponja PECs (nanomaterial).



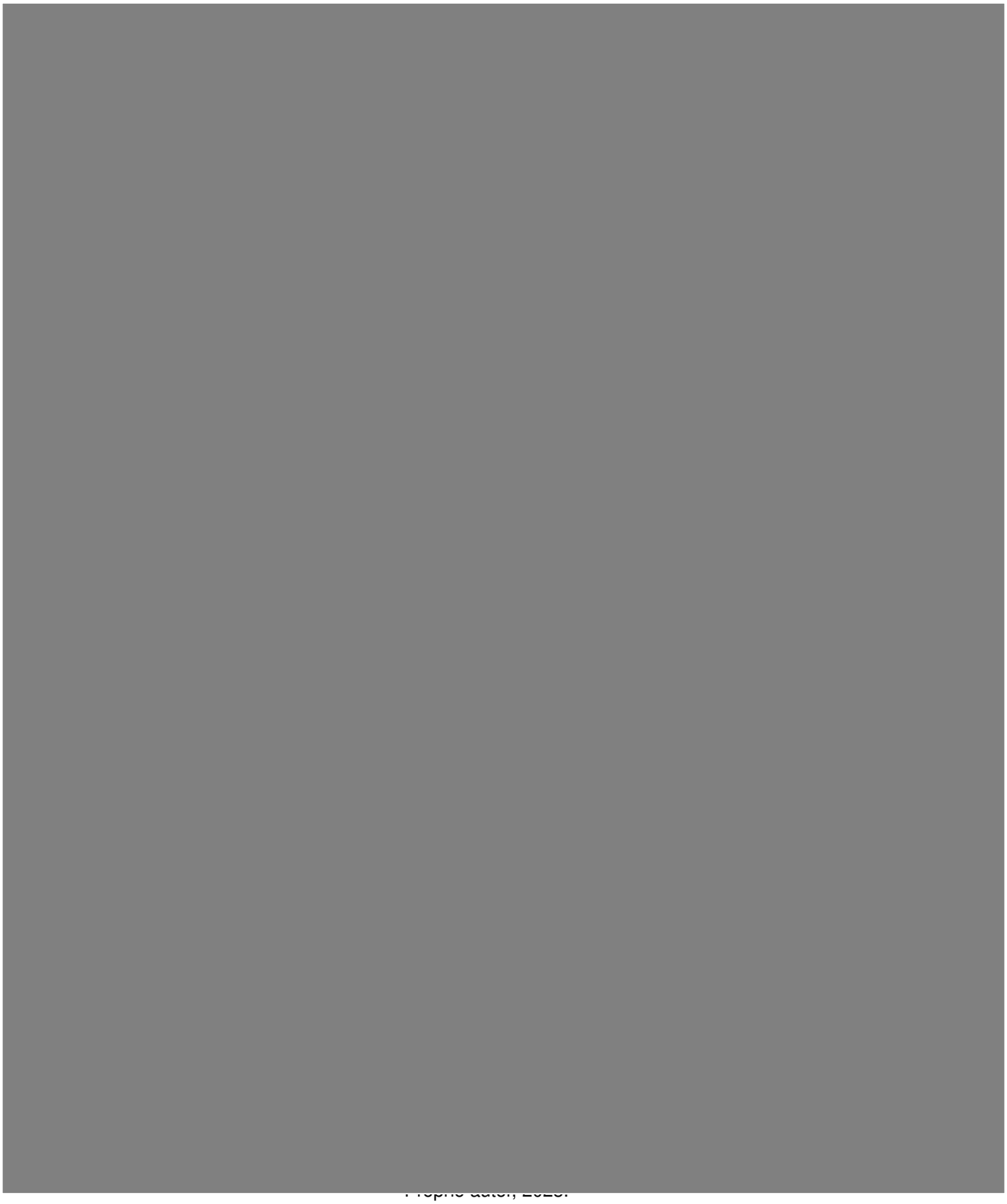
Componente	**Descrição**
Goma gelana	Traços revelaram uma banda de absorção larga ocasionado ao grupo OH livre em um intervalo de 3000 cm^{-1} e 3500 cm^{-1}; um ombro em torno de 2900 cm^{-1} que pode ser atribuído ao trecho C-H, onde os espectros mostram bandas em intervalo de 1600 cm^{-1} e 1400 cm^{-1}que pode ser atribuído ao alongamento C-O do íon. A banda em torno de 1000 cm^{-1} pode ser atribuída ao trecho C-O de ácido. Na região de 3450 - 2900 cm^{-1}, são observados os trechos OH, NH e C-H, sobrepostos.

Próprio autor

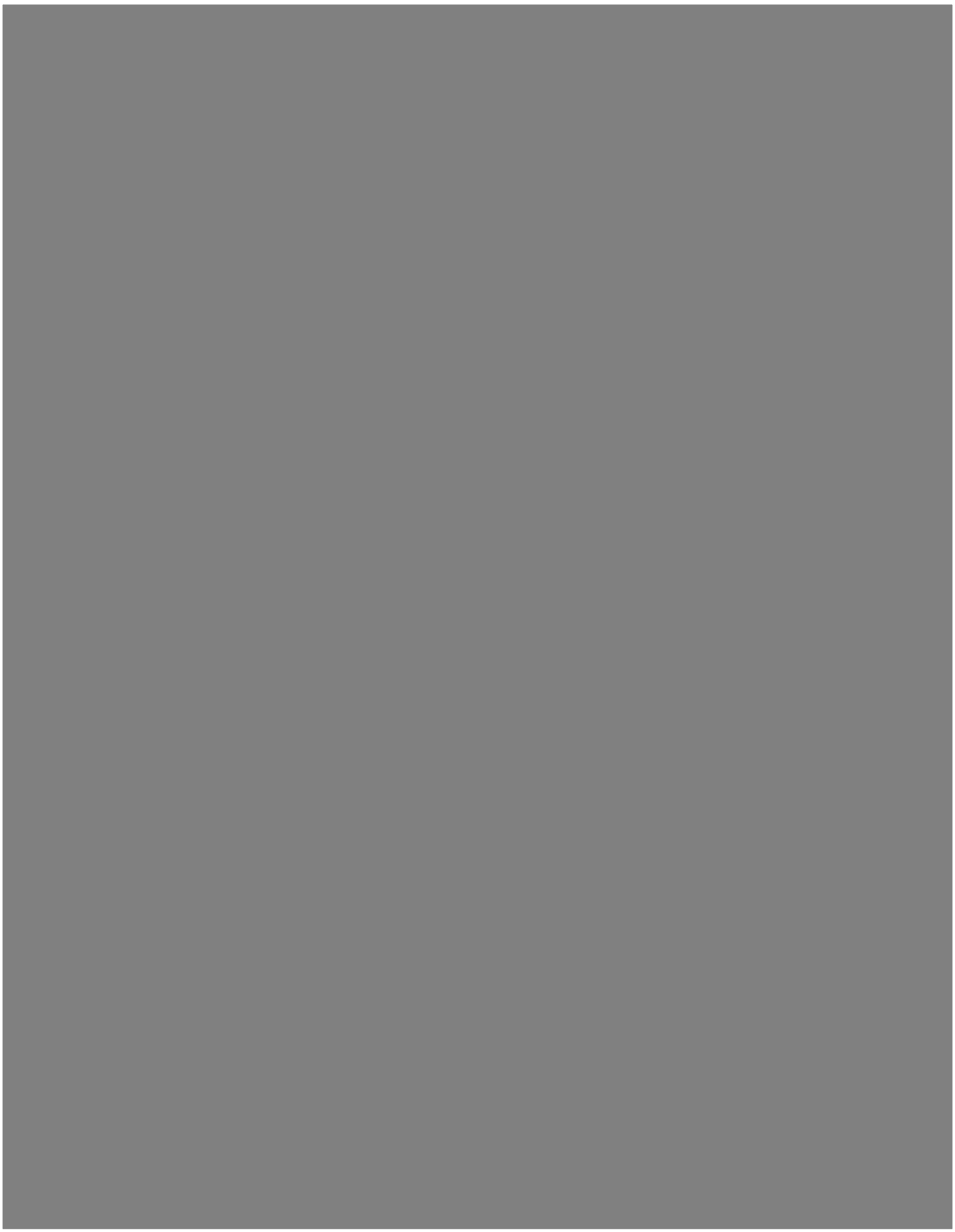
Com isso, verificamos também que o pico em 1342 cm-1 corresponde a parte de amina C-N mostrado na galocianina e na quitosana. Na região de 1012 cm-1 encontra-se um pico que corresponde à divisão C-H. Em relação ao nanomaterial, o espectro apresentado demonstra características encontradas nos espectros individuais de cada substância, dando indício de que houve o encapsulamento de galocianina sem influenciar a estrutura do polímero base.

Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão	pH

Próprio autor.



Próprio autor, 2023.



Podemos verificar que os diâmetros apresentados pela rede de polissacarídeo formado, apresentam tamanhos médios de 535 nm até 974,2 nm isso a depender do pH do

meio, diâmetros que poderiam não entrar na definição de nanoescala. Porém, Nakamichi and Kadokawa [94] em seu estudo, obtiveram hidrogéis de quitosana com tamanhos médios de 720,0 nm a 1366,8 por meio de DLS e tamanho entre 44 a 242 nm por microscopia eletrônica de varredura. O mesmo relata e isso demonstra que a atribuição de um material para ser considerado nanométrico ou não, devem ser atribuídos pelas condições da amostra, no caso úmidas ou secas. Da mesma forma Sabzini et al. [95] descreve em seu estudo a síntese de um nanoveículo de quitosana em associação para terapia de câncer, com tamanhos médios entre 454,65 nm e 330,22 nm por DLS, onde o tamanho real da amostra deve ser detectado por microscopia eletrônica de varredura [96].

Yan et al. [97] em seu estudo na síntese de um complexo polieletrólito de curdlan sulfato/quitosana, descreve sobre um efeito denominado “Efeito da razão de massa” o que explica os valores obtidos nesse tipo de nanomaterial. Ele afirma que na formação de um complexo polieletrólito, a proporção de massa dos polímeros aniônicos e catiônicos é um aspecto imprescindível a ser analisado, visto que não influência somente o tamanho das partículas e as cargas superficiais, mas também atua no controle da intensidade das interações eletrostáticas e no equilíbrio das cargas.

Desta forma, verificamos que o grau de intumescimento do nanomaterial e o índice de polidispersão estão também relacionados com o pH do meio (tabela 2), onde tivemos um grande aumento do nanomaterial em pH 7,4 (figura 16) e neutro (água deionizada) e um tamanho similar entre o pH 1,6 (figura 15) e 10,3 (figura 17). Isso acontece porque o aumento do diâmetro está relacionado há um aumento de protonação no revestimento da porção externa de quitosana, visto que em pH alcalino é relacionado à ionização de grupos carboxila da goma gelana presentes na parte interna dos grânulos. [98] Lembrando que o aumento do diâmetro em pH 7,4 (figura 15) pode estar relacionado com o fármaco integralizado.

Por fim, temos a avaliação do Índice de polidispersão. Índice de heterogeneidade onde valores menores que 0,05 são padrões de estruturas altamente monodispersos e valores de PDI maiores que 0,7 indicam que a amostra tem uma variedade de tamanho de partícula. Porém, é relatado em diretrizes que a aceitabilidade dos índices de polidispersão seja para aplicações em alimentos, cosméticos, medicamentos e outros, devem ser definidos pelas autoridades competentes [99].

Com isso, podemos inferir que as melhores características do nanomaterial foram as submetidas em pH 10,3 (Figura 16), lembrando que outros fatores podem influenciar esses parâmetros.

5.4 **Zeta potencial**

Como citado anteriormente, as interações entre polímeros para a formação de complexos polieletrólitos é ocasionado pelas interações iônicas entre cátions e íons, cuja a

aplicação e o desenvolvimento do que será formado, irão variar também pelo pH do meio [24]. Na figura 19 podemos constatar que o pH pode interferir completamente na coloração, densidade, agregação, rigidez, liberação ou precipitação.

Figura 19 – Nanomaterial em diferentes pHs.

Desta forma, foram expressos os valores do potencial zeta do nanomaterial em 3 diferentes pHs, revelando se a mudança de pH demonstra alteração entre as reações eletrostáticas presentes no nanomaterial.

Estudos definem que as melhores condições de potencial zeta são as superiores a +30 mV e -30 mV, visto que ocorre a inibição da flutuação e agregação das partículas em resposta as forças eletrostáticas repulsivas.

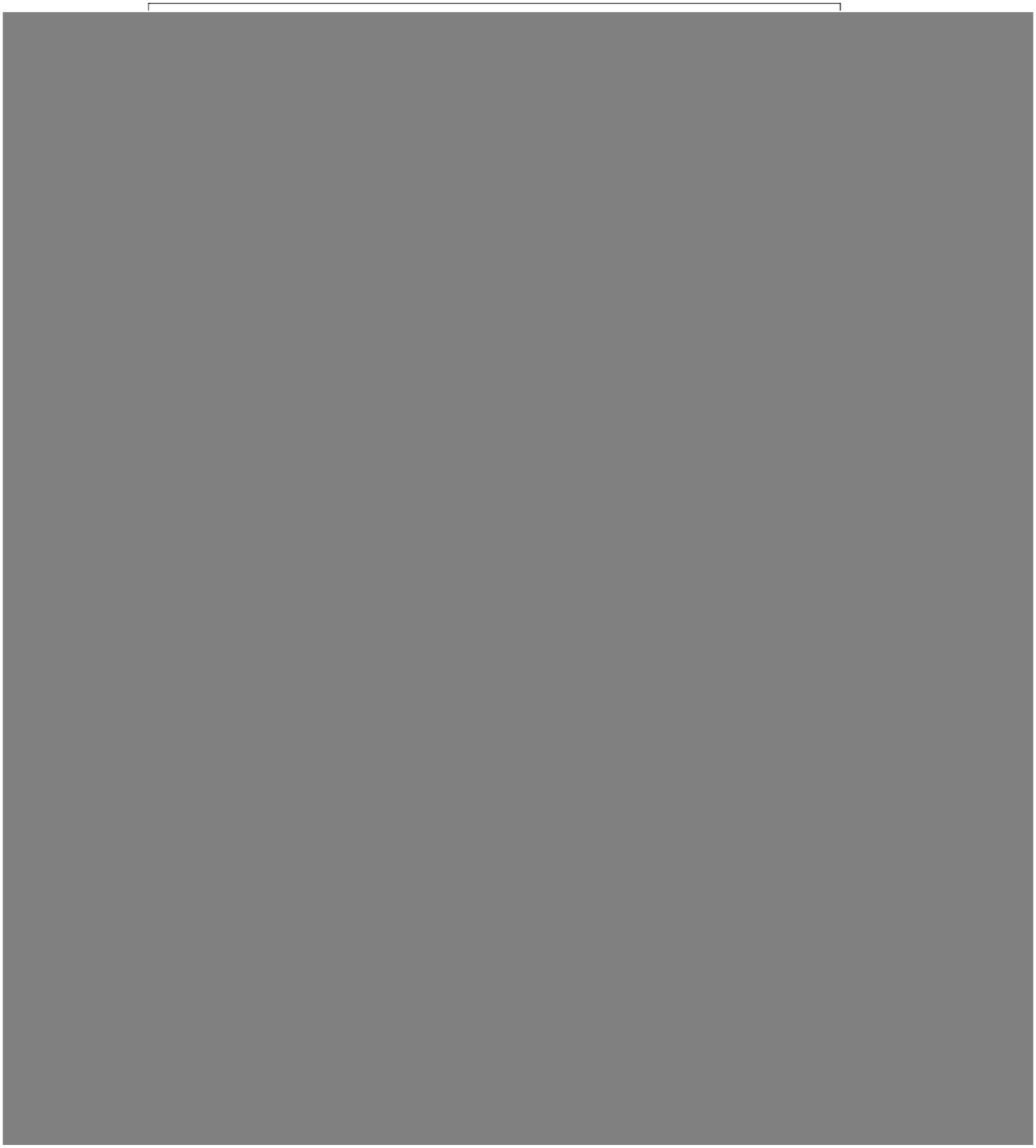
Em pH 1,6 (figura 20) o potencial ζ- da esponja de PECs mostra-se no máximo (-0,332 mV). Com o aumento de pH para pH 7,4 (com a adição de NaOH) (figura 21), o potencial ζ diminuiu gradativamente em direção à neutralidade (0,143 mV). Em pH 10,3 (figura 22) a adição adicional de NaOH ocasionou em uma mudança do potencial ζ para 0,0364. Isso nos mostra que o nanomaterial exibiu um potencial ζ quase neutro em toda a faixa de pHs testada.

Estudos relacionados a formação de complexos polieletrólitos, informaram que soluções de polieletrólitos catiônicos e aniônicos, podem estar associados a uma quantidade pequena de contra-íons. Isso acontece porque os polieletrólitos de maneira geral, possuem unidades repetitivas em sua estrutura e precisam destes contra-íons para manter a eletroneutralidade [100] [101].

Philipp et al. [102] realizaram um estudo inicial sobre complexos polieletrólitos cujas informações servem de base até os dias atuais e respondem muitas perguntas relacionados ao tema. Ele descreve que polieletrólitos com carga neutra podem estar relacionados ao grande número inacessíveis de sítios catiônicos ocasionados pela ramificação e na proporção de componentes utilizados. Além disso, o mesmo relata, comprovado com outros estudos, que a formação de um complexo formado por dois polieletrólitos fortes, sofre pouca

Figura 21 – ζ-potencial do nanomaterial em pH 7.4.

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	0,143	**Peak 1:**	0,143	100,0	4,02
Zeta Deviation (mV):	4,02	**Peak 2:**	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	0,00118	**Peak 3:**	0,00	0,0	0,00
Result quality	See result quality report				



Isso nos mostra que o nanomaterial exibiu um potencial ζ quase neutro em toda a faixa de pH testada e revela que a interação com a galocianina não traz mudanças significativas no campo eletrostático do material. Outro ponto importante, é que mesmo a literatura descrevendo que materiais sem carga é um indicativo de agregação e é indesejado porque dificulta a liberação de determinadas substâncias, os complexos polieletrólitos conferem a neutralidade em virtude da utilização de polímeros extremamente fortes em aspectos aniônicos e catiônicos.

Lembrando que a literatura descreve também que a carga é fundamental para a permeabilidade de um composto ou sistema, visto que formas não carregadas conseguem atravessar a membrana, enquanto formas carregadas ficam de fora das células. [104]

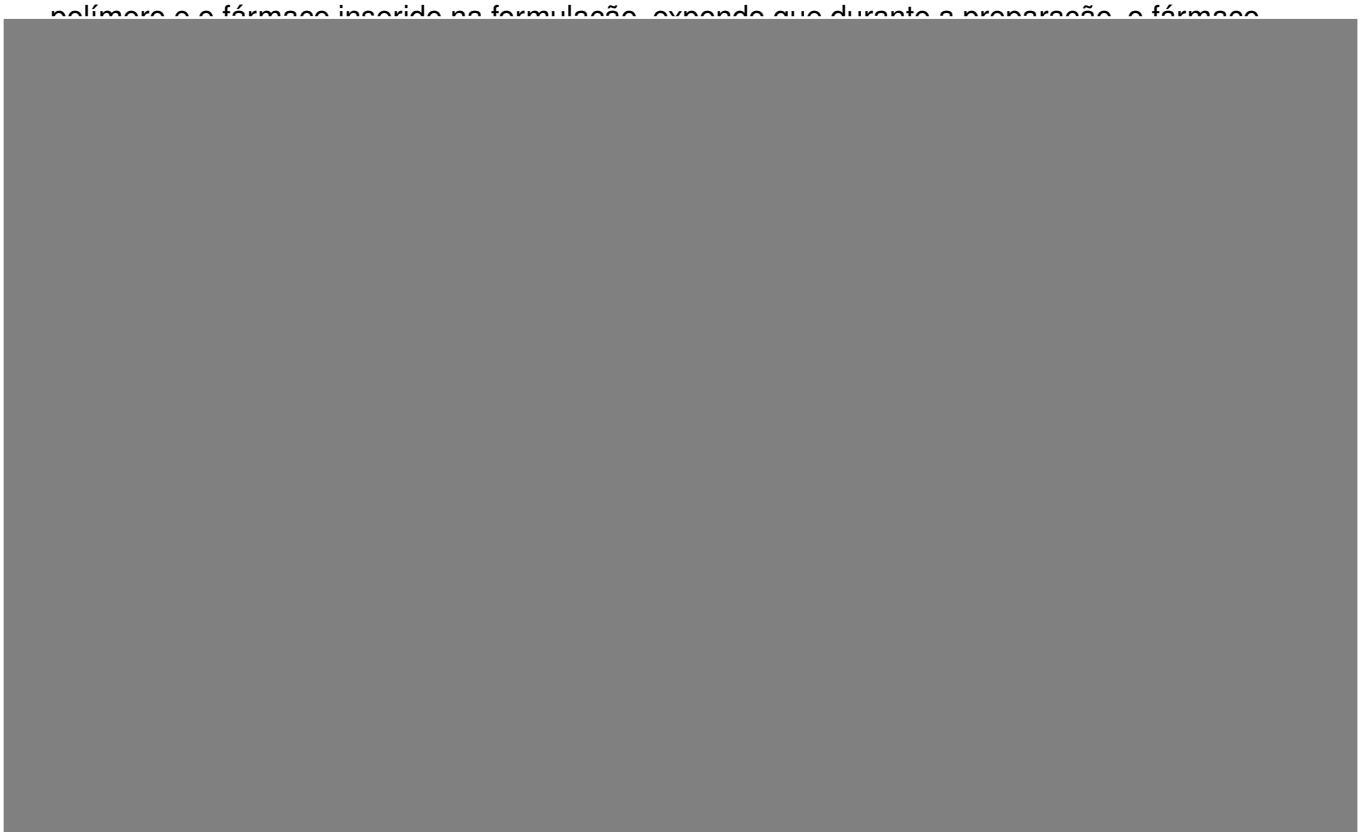
5.5 **Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

A goma gelana apresenta em estado puro um amplo pico endotérmico à 110 ○C, o que condiz com a perda de água, e indica degradação com pico em 280 ºC. Já com a quitosana a variação entre ponto de fusão e temperatura acontecem entre 230 ºC e 67 ºC, na devida ordem.

Ao avaliarmos o DSC do nanomaterial, verificamos que o mesmo apresentou um amplo pico endotérmico em torno de 69 ºC correspondente à temperatura de transição vítrea (figura 24), visto que entre 176 e 184 ○C houve dois picos agudos endotérmicos, indicando o derretimento da estrutura cristalina da galocianina e que o complexo de inclusão com a matriz pode reduzir a galocianina.

Todavia, apesar desta hipótese, aparentemente a galocianina ainda deve conter domínios cristalinos nas estruturas esponjosas, além de exibir outro amplo pico exotérmico a 219 ºC e indica degradação do polímero. Em 235 ºC o complexo apresenta um pico endotérmico que aponta para a formação do complexo.

Por fim, as análises DCS sugerem não haver ocorrência de interação física entre o polímero e o fármaco inserido na formulação, expondo que durante a preparação, o fármaco



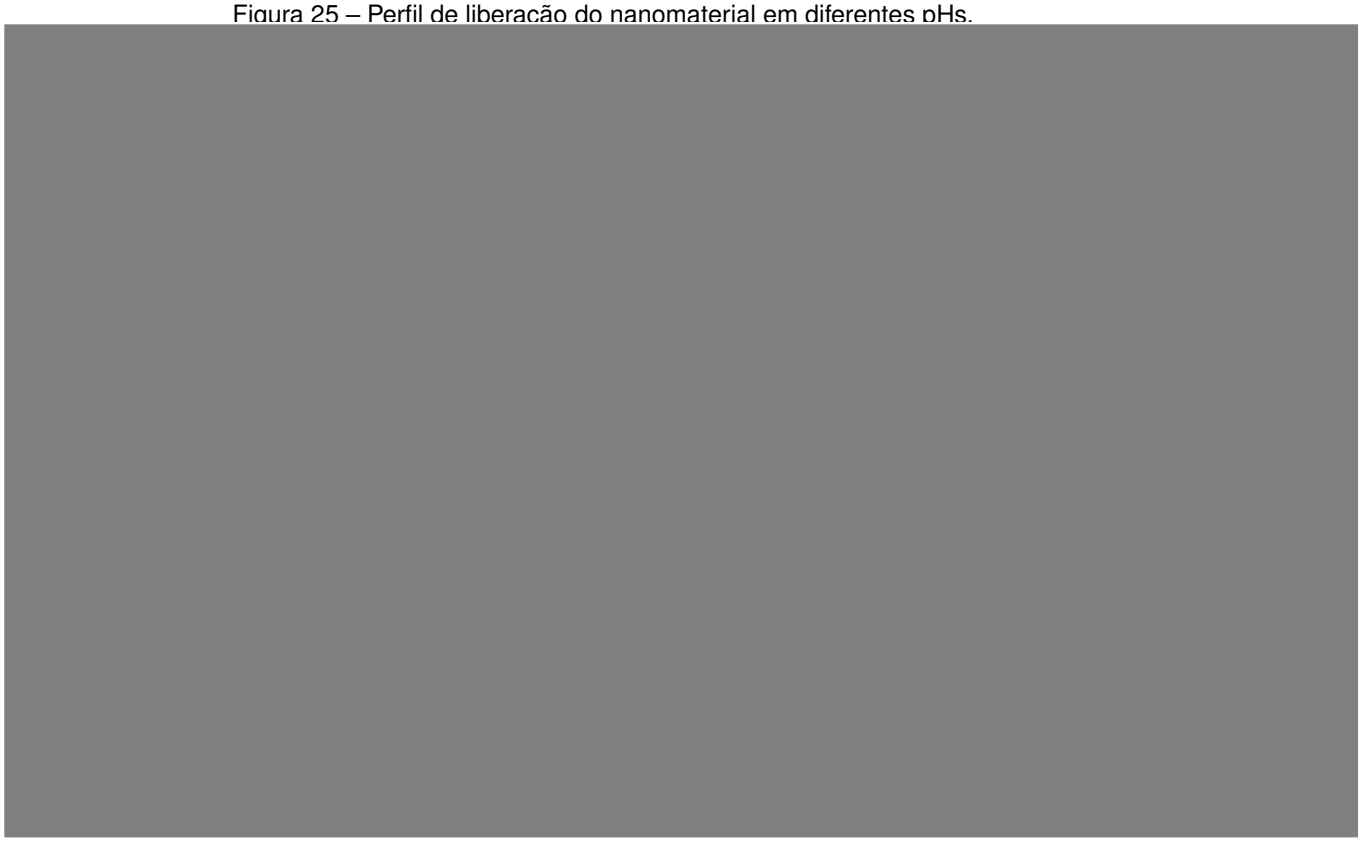
Próprio autor, 2023.

5.6 **Liberação *In vitro* da galocianina e análise cinética**

A avaliação do estudo de liberação *in vitro* ocorreu utilizando aproximadamente 3 mg de nanomaterial em 3 pHs diferentes pH 1,6 (ácido); pH 7,4 (pH fisiológico normal); e pH 10,3 (básico) analisados no UV-Vis por um período de 250 minutos, onde o nanomaterial apresentou um pico de comprimento em 616 nm.

Com os resultados obtidos, construímos um gráfico de linha temporal relacionado a concentração liberada. O tempo escolhido foi até que a galocianina liberada pelo nanomaterial atingisse seu pico de saturação (figura 25).

Figura 25 – Perfil de liberação do nanomaterial em diferentes pHs.



concentração maior de galocianina sendo liberada ao decorrer do tempo, em comparação aos pHs 1,6 e 7,4. Isso ocorre possivelmente pela estrutura altamente porosa que permite o ligamento de drogas na matriz do nanomaterial e a consequente liberação dependente do coeficiente de difusão da molécula através do nanomaterial [105].

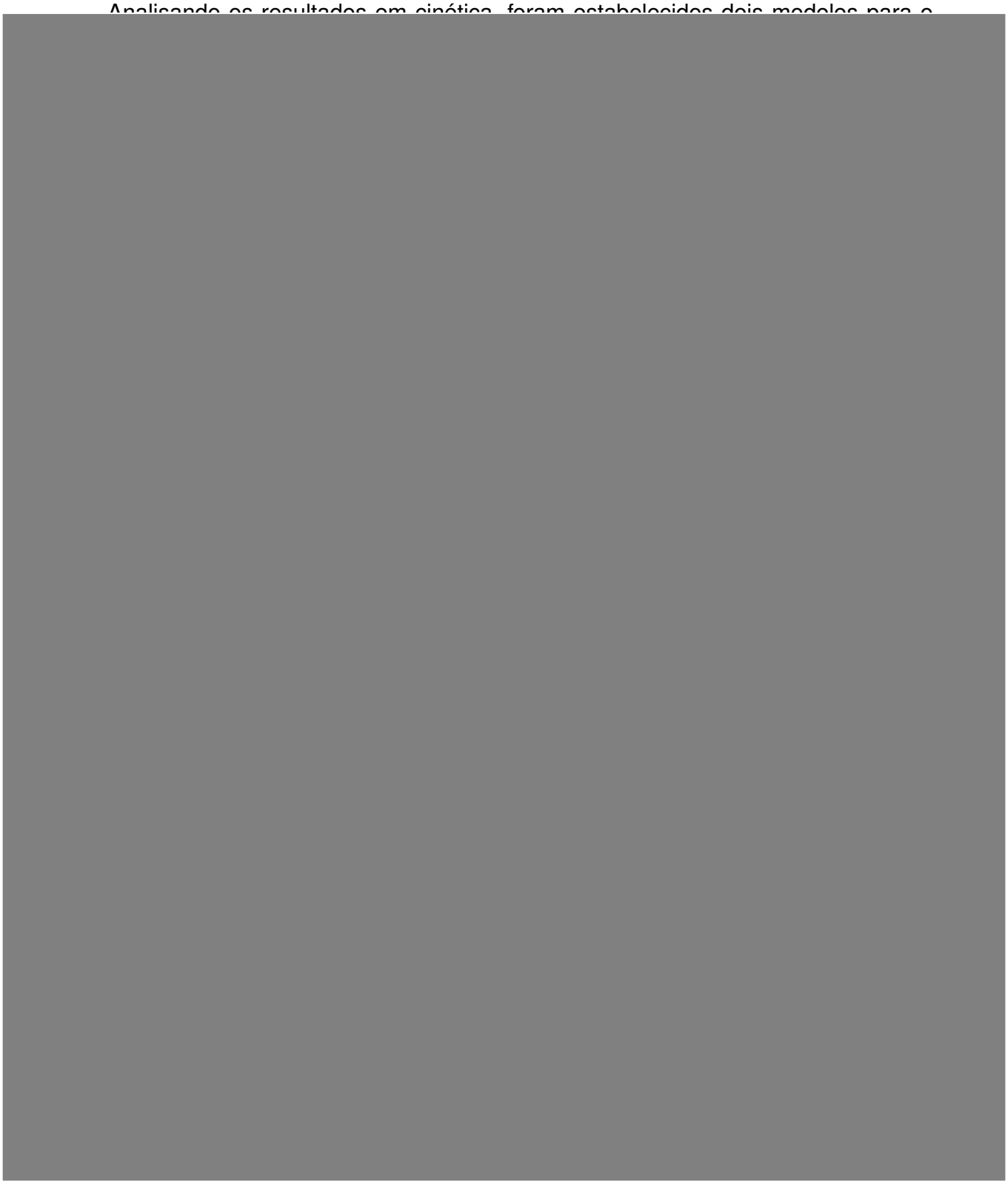
Porém, sabemos que a quistosa possui baixa solubilidade em pH neutro e alcalino, porque em pH $<$ 6,5 há a protonação dos grupamentos amina ocasionam a formação de carga positiva por grupamentos (RNH3+) e o polissacarídeo torna-se mais solúvel. [44]. Em contrapartida, a goma gelana de baixa acila tendo característica aniônica, é mais solúvel em água, conseguindo facilmente se dispersar em meio aquoso. Em baixas concentrações consegue fornecer alta força e estabilidade para polímeros catiônicos, como a quitosana [106].

Desta forma, a hipótese para a liberação da galocianina pelo complexo polieletrólito, é que a ligação entre a quitosana e a goma gelana em meio ácido (1,6) diminui a protonação para solubilização da quitosana, fazendo com que continuem agregadas. Já com o aumento do pH do meio 7,4 e 10,3 a porção não ligante da goma gelana se dissocia com maior facilidade favorecendo a liberação do composto. É importante ressaltar que adição e a proporção de polieletrólitos pode favorecer ou diminuir a solubilização/dissolução do complexo.

Com isso, podemos afirmar que o nanomaterial formado é capaz de ser utilizado em pH neutro (maior biocompatibilidade) e em locais mais básicos. Podendo assim, ter sua aplicação no âmbito fisiológico, ressaltando vias de administração como endovenosa ou tópica a depender do alvo de ação desejado.

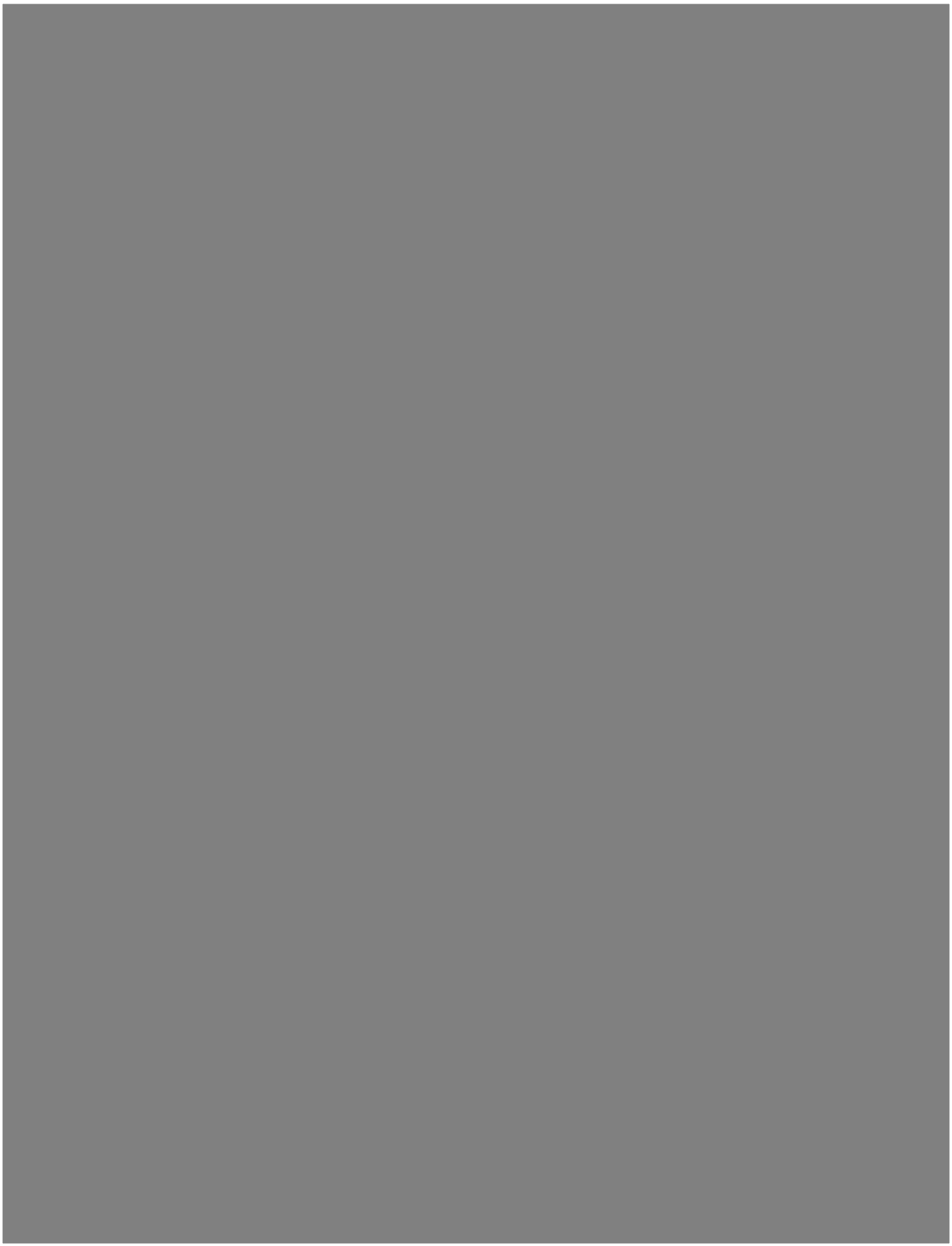
A fim de determinarmos o modelo cinético que melhor se aplique para investigar a maneira como a galocianina se difunde da esponja, os dados obtidos foram avaliados por meio dos seguintes modelos cinéticos de liberação de drogas, como: zero, primeiro, segunda e terceira ordem, e modelos cinéticos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull, Hixson-Crowell, Michaelis-Menten e a equação de Hill [107] [108].

Analisando os resultados em cinética, foram estabelecidos dois modelos para o



Próprio autor, 2023.

Figura 28 – Modelo cinético para perfil de liberação em pH 10,3



Próprio autor, 2023.

Com isso, através do mesmo método, realizamos algumas medidas por meio de uma solução de galocianina e adição cresceste de acetilcolina (Figura 30 - A) visando a análise do perfil espectral do núcleo de conexão entre as substâncias, conforme citado por Steinhart [7] .

Figura 30 – Espectros de absorbância evidenciando as alterações da galocianina e do nanomaterial na

Próprio autor, 2023.

Na figura 30-A podemos observar o deslocamento batocrômico e a mudança no perfil espectral da galocianina com a formação deste complexo, indicando a associação da galocianina e da acetilcolina.

Todavia, na figura 30-B, verificamos que quando o nanomaterial é inserido em solução de acetilcolina, presenciamos um aumento na absorção com o passar do tempo na região entre 400-600 nm. Constatamos também que no perfil espectral revelado, o final das medições é divergente para a formação do complexo galocianina-acetilcolina (figura 30-C). Desta forma, um deslocamento hipsocrômico na ação da captura de acetilcolina pelo nanomaterial é observado com um deslocamento da banda para a esquerda em 603 nm.

Cloete et al. [109] revelaram em sua pesquisa, que a galocianina teve um baixo desempenho como inibidor de acetilcolinesterase (AChE) e butilcolinesterase (BuChE), ou

que não apresentou algum efeito inibitório a concentração máxima utilizada de concentração de 80 μM. O que nos gera a hipótese de que a galocianina ligada ao nanomaterial pode favorecer o sistema, visto que não interfere na captura da acetilcolina do meio.

Figura 31 – Esquema visual do nanomaterial finalizado e seu processo de liberação ao local alvo.

Próprio autor, 2023.

Na figura 31, podemos visualizar como o nanomaterial formado por dois polímeros de cargas opostas, podem se configurar e realizar o processo de liberação mediante a fatores físico-químicos. Aqui no caso dependendo do pH, há o desprendimento das ramificações poliméricas, resultando na liberação dos compostos presentes como a galocianina e a acetilcolina. Ao analisarmos a estrutura, conseguimos observar que na liberação das substâncias presentes no complexo polieletrólito, teremos a liberação de acetilcolina ligada a galocianina e a galocianina somente. Ocorre que, pela conformação do complexo formado, algumas moléculas de galocianina conseguirão se conectar na parte ligante da quitosana, mas ficarão indisponíveis para ligar-se com a acetilcolina. Já em outros pontos do complexo, teremos a ligação integral das substâncias. Sendo a galocianina ligando-se a quitosana e a acetilcolina ligando-se na galocianina. Podendo assim, dependendo da proporção de substâncias ativas, a utilização no futuro como forma terapêutica para vários tipos de patologias ligadas as doenças neurodegenerativas e o sistema colinérgico.

Ressaltamos também, que as vantagens do complexo formado são diversas. São estruturas altamente hidrofílicas, apresentaram uma ótima configuração estrutural, boa liberação em pH neutro, com ótima resistência térmica e ligação com as substâncias presentes.

6 **Conclusão**

Em virtude das informações citadas no decorrer do estudo e a partir da observação dos dados obtidos e dos aspectos analisados, concluiu-se que foi possível sintetizar o nanomaterial, o qual é promissor para uma futura atuação terapêutica visto a relação entre os polímeros e os compostos. O complexo polieletrólito criado é inerte e livre de substâncias tóxicas ao organismo e confirma as características presentes na literatura deste tipo de complexo, como neutralidade das cargas, liberação controlada responsiva ao pH do meio, condições térmicas, tamanho, etc. Além disso, conseguimos verificar a interação da galocianina e da acetilcolina, visto que existem poucos estudos que abordem essa ligação como algo terapêutico para doenças que afetem tanto o sistema nervoso, quanto as interações que envolvem a acetilcolina.

Embora o material seja promissor, algumas análises ainda devem ser realizadas para apoiar ainda mais o uso futuro deste nanomaterial. Principalmente relacionados a microscopia eletrônica de varredura, processo de esterilização, e a criação de um processo de quantificação de galocianina e acetilcolina, de forma que estas substâncias possuem limitações que dificultam sua quantificação.

Referências

[1] Rahman A, Kang S, Wang W, Garg A, Maile-Moskowitz A, Vikesland PJ. Nanobiotechnology enabled approaches for wastewater based epidemiology. Trends in analytical chemistry : TRAC. 2021 8;143:116400 –.

[2] Dutt Y, Pandey RP, Dutt M, Gupta A, Vibhuti A, Vidic J, et al. Therapeutic applications of nanobiotechnology. Journal of nanobiotechnology. 2023 5;21:148 –.

[3] Passeri E, Elkhoury K, Morsink M, Broersen K, Linder M, Tamayol A, et al. Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. International journal of molecular sciences. 2022 11;23.

[4] Bediako JK, Ouardi YE, Mouele ESM, Mensah B, Repo E. Polyelectrolyte and polyelectrolyte complex-incorporated adsorbents in water and wastewater remediation - A review of recent advances. Chemosphere. 2023 3;325:138418 –.

[5] Adepu S, Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. Molecules (Basel, Switzerland). 2021 10;26.

[6] Mpousis S, Thysiadis S, Avramidis N, Katsamakas S, Efthimiopoulos S, Sarli V. Synthesis and evaluation of gallocyanine dyes as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. European journal of medicinal chemistry. 2016;108:28 – 38.

[7] Steinhart JR. Colorimetric assay of acetylcholine by gallocyanine. Biochimica et biophysica acta. 1968 4;158:171 – 3.

[8] Jiang T, Li Q, Qiu J, Chen J, Du S, Wu Z, et al. Nanobiotechnology: Applications in Chronic Wound Healing. International Journal of Nanomedicine. 2022/20 jul;p. 3125 – 3145.

[9] Hupffer HM, Lazzaretti LL. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. Revista Gestão e Desenvolvimento. 2019;16(3):153 – 177.

[10] da Silva Florêncio MN, de Miranda DPSL, da Cruz Santos A, Dias CT, Russo SL, de Oliveira Júnior AM. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: UM ESTUDO SOBRE OS DEPÓSITOS DE PATENTES EM NANOBIOTECNOLOGIA. Cadernos De Prospecção. 2017 JUN;10(2):315 – 316.

[11] Giraldo JP, Wu H, Newkirk GM, Kruss S. Nanobiotechnology approaches for engineering smart plant sensors. Nature Nanotechnology. 2019 Jun;14:541 – 553.

[12] Robert Langer, Ralph Weissleder. Nanotechnology. JAMA. 2015 Jan;313(2):135 – 136.

[13] Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2008 Mar;5(1):19 – 28.

[14] He P, Yang G, Zhu D, Kong H, Corrales-Ureña YR, Zhu D, et al. Biomolecule-mimetic nanomaterials for photothermal and photodynamic therapy of cancers: Bridging nanobiotechnology and biomedicine. Journal of Nanobiotechnology. 2022 Nov;20(483).

[15] Ahmad S, Munir S, Ze N, Ullah A, Khan B, Ali J. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles–an ecofriendly approach. International Journal of Nanomedicine. 2019 Jul;p. 5087 – 5107.

[16] Park K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. Journal of Controlled Release. 2014 September;190:3 – 8.

[17] Lia C, Wang J, Wang Y, Gao H, Wei G, Huang Y, et al. Recent progress in drug delivery. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2019 Nov;9(6):1145 – 1162.

[18] Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. Theranostics. 2016 Jun;6(9):1306 – 1323.

[19] Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. Saudi Pharmaceutical Journal. 2018 Jan;26(7):64 – 70.

[20] Meng X, Lu Y, Gao Y, Cheng S, Tian F, Xiao Y, et al. Chitosan/alginate/hyaluronic acid polyelectrolyte composite sponges crosslinked with genipin for wound dressing application. International Journal of Biological Macromolecules. 2021;182:512 – 523.

[21] Lente JJV, Claessens MMAE, Lindhoud S. Charge-based separation of proteins using polyelectrolyte complexes as models for membraneless organelles. 2019;20(10):3696 – 3707.

[22] Wu D, Ensinas A, Verrier B, Cuvillier A, Champier G, Paul S, et al. Ternary polysaccharide complexes: Colloidal drug delivery systems stabilized in physiological media. Carbohydrate polymers. 2017 6;172:265 – 274.

[23] Wu D, Zhu L, Li Y, Zhang X, Xu S, Yang G, et al. Chitosan-based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review. Carbohydrate polymers. 2020 4;238:116126 –.

[24] Raik SV, Gasilova ER, Dubashynskaya NV, Dobrodumov AV, Skorik YA. Diethylaminoethyl chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complexes. International journal of biological macromolecules. 2019 11;146:1161 – 1168.

[25] Le HV, Cerf DL. Colloidal Polyelectrolyte Complexes from Hyaluronic Acid: Preparation and Biomedical Applications. Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). 2022 10;18:e2204283 –.

[26] Bourganis V, Karamanidou T, Kammona O, Kiparissides C. Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2016 11;111:44 – 60.

[27] Le HV, Dulong V, Picton L, Cerf DL. Thermoresponsive nanogels based on polyelectrolyte complexes between polycations and functionalized hyaluronic acid. Carbohydrate polymers. 2022 6;292:119711 –.

[28] Kim YK, Kim E, Lim JH, Cho HK, Hong WJ, Jeon HH, et al. Dual Stimuli-Triggered Nanogels in Response to Temperature and pH Changes for Controlled Drug Release. Nanoscale research letters. 2019 3;14:77 –.

[29] Kulkarni AD, Vanjari YH, Sancheti KH, Patel HM, Belgamwar VS, Surana SJ, et al. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2016 1;44:1615 – 25.

[30] Solomevich SO, Dmitruk EI, Bychkovsky PM, Salamevich DA, Kuchuk SV, Yurkshtovich TL. Biodegradable polyelectrolyte complexes of chitosan and partially crosslinked dextran phosphate with potential for biomedical applications. International journal of biological macromolecules. 2021 1;169:500 – 512.

[31] Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, et al. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. International journal of molecular sciences. 2020 1;21.

[32] Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. International journal of biological macromolecules. 2017 7;105:1358 – 1368.

[33] El-Hack MEA, El-Saadony MT, Shafi ME, Zabermawi NM, Arif M, Batiha GE, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. International journal of biological macromolecules. 2020 8;164:2726 – 2744.

[34] Dana PM, Hallajzadeh J, Asemi Z, Mansournia MA, Yousefi B. Chitosan applications in studying and managing osteosarcoma. International journal of biological macromolecules. 2020 12;169:321 – 329.

[35] Lopez-Moya F, Suarez-Fernandez M, Lopez-Llorca LV. Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants. International journal of molecular sciences. 2019 1;20.

[36] Patel SKS, Kim J, Kalia VC, Lee J. Antimicrobial Activity of Amino-Derivatized Cationic Polysaccharides. Indian journal of microbiology. 2019 2;59:96 – 99.

[37] Desai KG. Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems. 2016 9;33:107 – 58.

[38] Mushtaq A, Li L, A A, Grøndahl L. Chitosan Nanomedicine in Cancer Therapy: Targeted Delivery and Cellular Uptake. Macromolecular bioscience. 2021 3;21:e2100005 –.

[39] Kravanja G, Primožič M, Željko Knez, Leitgeb M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. Molecules (Basel, Switzerland). 2019 5;24.

[40] Wang X, Heuzey M. Chitosan-Based Conventional and Pickering Emulsions with Long-Term Stability. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2016 1;32:929 – 36.

[41] Pal K, Bharti D, Sarkar P, Anis A, Kim D, Chałas R, et al. Selected Applications of Chitosan Composites. International journal of molecular sciences. 2021 10;22.

[42] Meng Q, Zhong S, Wang J, Gao Y, Cui X. Advances in chitosan-based microcapsules and their applications. Carbohydrate polymers. 2022 11;300:120265 –.

[43] Teng X, Zhang M, Mujumdar AS, Wang H. Garlic essential oil microcapsules prepared using gallic acid grafted chitosan: Effect on nitrite control of prepared vegetable dishes during storage. Food chemistry. 2022 4;388:132945 –.

[44] Sacco P, Pedroso-Santana S, Kumar Y, Joly N, Martin P, Bocchetta P. Ionotropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications. Molecules (Basel, Switzerland). 2021 1;26.

[45] Mahdi MH, Conway BR, Mills T, Smith AM. Gellan gum fluid gels for topical administration of diclofenac. International journal of pharmaceutics. 2016 11;515:535 – 542.

[46] Khare P, Chogale MM, Kakade P, Patravale VB. Gellan gum-based in situ gelling ophthalmic nanosuspension of Posaconazole. Drug delivery and translational research. 2022 5;12:2920 – 2935.

[47] Gomes D, Batista-Silva JP, Sousa A, Passarinha LA. Progress and opportunities in Gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications. Carbohydrate polymers. 2023 4;311:120782 –.

[48] Feketshane Z, Alven S, Aderibigbe BA. Gellan Gum in Wound Dressing Scaffolds. Polymers. 2022 10;14.

[49] Zia KM, Tabasum S, Khan MF, Akram N, Akhter N, Noreen A, et al. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. International journal of biological macromolecules. 2017 11;109:1068 – 1087.

[50] Dev MJ, Warke RG, Warke GM, Mahajan GB, Patil TA, Singhal RS. Advances in fermentative production, purification, characterization and applications of gellan gum. Bioresource technology. 2022 6;359:127498 –.

[51] Picone P. Nanobiotechnology: A New Frontier for Brain Disorders. Int J Mol Sci. 2022 August;23(9603):23 –.

[52] Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. Nature neuroscience. 2018 9;21:1332 – 1340.

[53] Muddapu VR, Dharshini SAP, Chakravarthy VS, Gromiha MM. Neurodegenerative Diseases – Is Metabolic Deficiency the Root Cause? Frontiers in Neuroscience. 2020 Mar;14:2013 –.

[54] Erkkinen MG, Kim M, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2018;10(4):a033118 –.

[55] Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. Immunology. 2018 Mar;154:204 – 219.

[56] Vaquer-Alicea J, Diamond MI. Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. Annual review of biochemistry. 2019 3;88:785 – 810.

[57] Turana Y, Shen R, Nathaniel M, Chia Y, Li Y, Kario K. Neurodegenerative diseases and blood pressure variability: A comprehensive review from HOPE Asia. Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn). 2022 10;24(09):1204 – 1217.

[58] Kritsilis M, Rizou SV, Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. International journal of molecular sciences. 2018 9;19(10):2937 – 2937.

[59] Sengupta U, Kayed R. Amyloid β, Tau, and α-Synuclein aggregates in the pathogenesis, prognosis, and therapeutics for neurodegenerative diseases. Progress in neurobiology. 2022 Jul;214:102270 – 102270.

[60] Akhtar A, Andleeb A, Waris TS, Bazzar M, Moradi A, Awan NR, et al. Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2021;330:1152 – 1167.

[61] Kumar A, Zhou L, Zhi K, Raji B, Pernell S, Tadrous E, et al. Challenges in Biomaterial-Based Drug Delivery Approach for the Treatment of Neurodegenerative Diseases: Opportunities for Extracellular Vesicles. International journal of molecular sciences. 2020;22:138 – 138.

[62] Lamptey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. International journal of molecular sciences. 2022;23:1851 – 1851.

[63] Deuel LM, Seeberger LC. Complementary Therapies in Parkinson Disease: a Review of Acupuncture, Tai Chi, Qi Gong, Yoga, and Cannabis. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2020 8;17:1434 – 1455.

[64] Świt P, Pollap A, Orzeł J. Spectroscopic Determination of Acetylcholine (ACh): A Representative Review. Topics in current chemistry (Cham). 2023 5;381:16 –.

[65] Malin SG, Shavva VS, Tarnawski L, Olofsson PS. Functions of acetylcholine-producing lymphocytes in immunobiology. Current opinion in neurobiology. 2020 3;62:115 – 121.

[66] Prado MAM, Marchot P, Silman I. Preface: Cholinergic Mechanisms. Journal of neurochemistry. 2017 8;142 Suppl 2:3 – 6.

[67] Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. Journal of neurochemistry. 2017;142:111 – 121.

[68] Galvin VC, Arnsten AFT, Wang M. Evolution in Neuromodulation-The Differential Roles of Acetylcholine in Higher Order Association vs. Primary Visual Cortices. Frontiers in neural circuits. 2018;12:67 –.

[69] Palacios-Filardo J, Mellor JR. Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. Current opinion in neurobiology. 2019;54:37 – 43.

[70] Likhtik E, Johansen JP. Neuromodulation in circuits of aversive emotional learning. Nature neuroscience. 2019;22:1586 – 1597.

[71] Uematsu A, Tan BZ, Johansen JP. Projection specificity in heterogeneous locus coeruleus cell populations: implications for learning and memory. Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY). 2015;22:444 – 51.

[72] Petreski T, Kit B, Strnad M, Grenc D, Svenšek F. Cholinergic syndrome: a case report of acute organophosphate and carbamate poisoning. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. 2020 9;71:163 – 166.

[73] Jokanović M. Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. Toxicology. 2018 9;410:125 – 131.

[74] Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. Current neuropharmacology. 2016 1;14:101 – 15.

[75] Rizzi G, Tan KR. Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson's Disease. Frontiers in neural circuits. 2018 1;11:110 –.

[76] Li Q, He S, Chen Y, Feng F, Qu W, Sun H. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. European journal of medicinal chemistry. 2018 9;158:463 – 477.

[77] Cox MA, Bassi C, Saunders ME, Nechanitzky R, Morgado-Palacin I, Zheng C, et al. Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. Journal of internal medicine. 2020;287:120 – 133.

[78] Hoover DB. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. Pharmacology & therapeutics. 2017 5;179:1 – 16.

[79] Xie F, Min S, Liu L, Peng L, Hao X, Zhu X. Advanced age enhances the sepsis-induced up-regulation of the γ- and α7-nicotinic acetylcholine receptors in different parts of the skeletal muscles. Archives of gerontology and geriatrics. 2016 2;65:1 – 8.

[80] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 73801, Gallocyanine;; 2004. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallocyanine.

[81] Yadav H, Halabi NAA, Alsalloum GA. Nanogels as novel drug delivery systems-a review. J Pharm Pharm Res. 2017;1(5).

[82] SHAH CK. Modern Dictionary Cyto And Histo Chemistry. Discovery Publishing House; 1991. Available from: https://books.google.com.br/books?id=IUPGQva4TLMC&pg=PA33&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

[83] YUSOF NA, RASHID K. Development of Optical Test Strip for Rapid Determination of Trace Arsenic Using Immobilized Gallocyanine. Asian Journal of Chemistry. 2009;21(3):1747 – 1753.

[84] S M, S T, N A, S K, S E, V S. Synthesis and evaluation of gallocyanine dyes as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. European Journal of Medicinal Chemistry. 2016 Janeiro;p. 28 – 38.

[85] Thysiadis S, Katsamakas S, Mpousis S, Avramidis N, Efthimiopoulos S, Sarli V. Design and synthesis of gallocyanine inhibitors of DKK1/LRP6 interactions for treatment of Alzheimer's disease. Bioorganic Chemistry. 2018 junho;80:230 – 244.

[86] JIN, Hua et al. Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potent anti-angiogenesis in tumor. Applied microbiology and biotechnology. 2016 February;100(15):6643 – 6652.

[87] Iurciuc-Tincu C, Atanase LI, Ochiuz L, Jérôme C, Sol V, Martin P, et al. Curcumin-loaded polysaccharides-based complex particles obtained by polyelectrolyte complexation and ionic gelation. I-Particles obtaining and characterization. International Journal of Biological Macromolecules. 2020 March;147:629 – 642.

[88] Chen Y, Zou C, Mastalerz M, Hu S, Gasaway C, Tao X. Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences—A Review. International journal of molecular sciences. 2015;16(12):30223 – 30250.

[89] Vanessa Neto, Esteves-Ferreira S, Inácio I, Alves M, Dantas R, Almeida I, et al. Metabolic Profile Characterization of Different Thyroid Nodules Using FTIR Spectroscopy: A Review. Metabolites. 2022 1;12.

[90] Guerrero-Pérez MO, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR. The Canadian Journal of Chemical Engineering. 2020;98(1):25 – 33.

[91] Harvey J, Saadatkhah N, Dumont-Vandewinkel G, Ackermann SLG, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: differential scanning calorimetry—DSC. he Canadian Journal of Chemical Engineering. 2018;96(12):2518 – 2525.

[92] Dermawan D, Hiendrawan S, Tjandrawinata RR. A quality by design (QbD) case study on diclofenac sodium-loaded liposomes: Screening and optimizing of critical process variables using Plackett-Burman and Central Composite designs. 2021;.

[93] Nokhodchi A, Chavan S, Ghafourian T. In Vitro Dissolution and Permeability Testing of Inhalation Products: Challenges and Advances. Pharmaceutics. 2023 3;15:983 –.

[94] Nakamichi A, Kadokawa J. Fabrication of Chitosan-Based Network Polysaccharide Nanogels. Molecules (Basel, Switzerland). 2022 12;27.

[95] Sabzini M, Pourmadadi M, Yazdian F, Khadiv-Parsi P, Rashedi H. Development of chitosan/halloysite/graphitic-carbon nitride nanovehicle for targeted delivery of quercetin to enhance its limitation in cancer therapy: An in vitro cytotoxicity against MCF-7 cells. International journal of biological macromolecules. 2022 11;226:159 – 171.

[96] Zhang D, Jiang Y, Xiang M, Wu F, Sun M, Du X, et al. Biocompatible Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lycopene Encapsulation Attenuate Oxidative Stress-Induced Cell Damage. Frontiers in nutrition. 2022 6;9:902208 –.

[97] Yan J, Wang Y, Qiu W, Wu J. Construction and characterization of nanosized curdlan sulfate/chitosan polyelectrolyte complex toward drug release of zidovudine. Carbohydrate polymers. 2017 8;174:209 – 216.

[98] Patil JS, Kamalapur MV, Marapur SC, Shiralshetti SS. Ionotropically Gelled Novel Hydrogel Beads: Preparation, Characterization and In vitro Evaluation. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2012 8;73:504 – 9.

[99] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani FH, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics. 2018 5;10.

[100] Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. Drug discovery today. 2017 7;22:1697 – 1706.

[101] Amani S, Mohamadnia Z. Modulation of interfacial electrical charges in assembled nano-polyelectrolyte complex of alginate-based macromolecules. International journal of biological macromolecules. 2019 5;135:163 – 170.

[102] Philipp B, Dautzenberg H, Linow K, Kötz J, Dawydoff W. Polyelectrolyte complexes — recent developments and open problems. Progress in Polymer Science. 1989;14(1):91 – 172.

[103] Lankalapalli S, Kolapalli VRM. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2010 5;71:481 – 7.

[104] Suarato G, Li W, Meng Y. Role of pH-responsiveness in the design of chitosan-based cancer nanotherapeutics: A review. Biointerphases. 2016 3;11:04B201 –.

[105] Shukla R, Kashaw SK, Jain AP, Lodhi S. Fabrication of Apigenin loaded gellan gum-chitosan hydrogels (GGCH-HGs) for effective diabetic wound healing. International journal of biological macromolecules. 2016 6;91:1110 – 9.

[106] Nair AB, Shah J, Aljaeid BM, Al-Dhubiab BE, Jacob S. Gellan Gum-Based Hydrogel for the Transdermal Delivery of Nebivolol: Optimization and Evaluation. Polymers. 2019 10;11.

[107] Costa AO, Lunardi CN, Gomes AJ. Kinetic Evaluation of Anti-tumor Chlorambucil Release from O-stearoyl Mannose PLGA Nanoparticles. Current Nanomedicine (Formerly: Recent Patents on Nanomedicine). 2020;10(1):63 – 75.

[108] Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Caballero AH, et al. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. Polymers. 2021 10;13.

[109] Cloete SJ, Petzer A, Petzer JP. Interactions of dye compounds that are structurally related to methylene blue with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. CHEMICAL BIOLOGY & DRUG DESING. 2021;97(4):854 – 864.