UNIVERSIDADE DE SOROCABA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cecilia Torqueti de Barros

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS COMO CARREADORES DE GRELINA PARA LIBERAÇÃO NASO-CEREBRAL

Cecilia Torqueti de Barros

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS COMO CARREADORES DE GRELINA PARA LIBERAÇÃO NASO-CEREBRAL

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.

Ficha Catalográfica

Barros, Cecilia Torqueti de

B275

Desenvolvimento e avaliação de lipossomas como carreadores de grelina para liberação naso-cerebral / Cecilia Torqueti de Barros. – 2020.

118 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Caquexia. 2. Química farmacêutica. 3. Medicamentos – Formas de dosagem. 4. Medicamentos – Administração. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Cecilia Torqueti de Barros

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS COMO CARREADORES DE GRELINA PARÁ LIBERAÇÃO NASO-CEREBRAL

Dissertação apresentada Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud Universidade de Sorocaba (Uniso)

Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Komatsu Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP)

> Prof^a Dr^a Marta Maria Duarte Carvalho Vila Universidade de Sorocaba (Uniso)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Renata e ao meu Pai Vanderlei. Obrigada por sempre me apoiar e me dar o suporte necessário para realizar meus sonhos. Amo vocês infinitamente.

Ao Felipe, obrigada por compartilhar comigo mais essa etapa da minha vida, foi muito importante para mim ter você do meu lado.

Aos meus familiares queridos. Vocês são meu porto seguro. A certeza de que eu tenho vocês torcendo pela minha felicidade é o que me move.

Agradeço ao orientador professor Chaud por sempre acreditar no meu trabalho e ser a sustentação para construção dos meus conhecimentos.

Sou grata a todos os professores que foram muito importantes na minha vida acadêmica e tornaram o processo de ensino e aprendizagem tão encantador e realizador.

À toda equipe do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Uniso (LaBNUS) pela força e companheirismo. Agradeço muito por vocês serem sempre apoio nas dificuldades. Trabalhar com vocês tornou todo processo mais leve e enriquecedor.

Agradeço também, às professoras Dr^a Mariana Battaglin Villas Boas Alvaro, Dr^a Marta Maria Duarte Carvalho Vila e Dr^a Thais Francine Ribeiro Alves de Almeida pelo apoio e colaboração no processo de qualificação, fundamentais para a melhoria e desenvolvimento da nossa pesquisa.

À Uniso por ter me acolhido durante a graduação e por possibilitar a realização do mestrado.

Ao Laboratório de Pesquisa Toxicológica da Uniso (LAPETOX), pela estrutura oferecida, em especial à técnica Thaisa Pickler, pelo acolhimento, disposição e ajuda.

Ao Laboratórios Nacionais de Nanotecnologia (LNNano), uma instalação nacional aberta do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) operada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Agradecemos a equipe do LNNano, especialmente ao Alexandre Cassago, pela assistência durante os experimentos.

À Capes pelo incentivo financeiro.

Obrigada a todos que possibilitaram que nesse projeto o caminho fosse tão gratificante quanto a chegada. Me senti muito realizada desenvolvendo esse trabalho.

"Quem, de três milênios, Não é capaz de se dar conta. Vive na ignorância, na sombra, À mercê dos dias, do tempo." Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

Introdução: A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada pela perda contínua de massa muscular esquelética que leva ao comprometimento funcional progressivo. Até o momento, nenhuma intervenção medicamentosa efetiva e aprovada reverte completamente os achados da síndrome caquética. Estudos demonstraram efeitos positivos e encorajadores da grelina (ghrelin - ghrl). No organismo, a ghrl exógena está sujeita a uma degradação muito rápida e as formulações atuais são planejadas para administração parenteral. Como estratégia para superar essas limitações, nosso estudo apresenta a liberação intranasal da ghrl carreada por lipossomas. Objetivos: Desenvolver um sistema lipossomal nanoestruturado para veiculação da ghrl, visando características necessárias para liberação naso-cerebral. Métodos: Os lipossomas foram obtidos pela técnica de hidratação de filmes de fosfolipídios, seguido por extrusão ou homogeneização de alta pressão, e revestidos com quitosana. O tamanho, o potencial elétrico de superfície, a polidispersidade e a eficiência de encapsulação foram parâmetros utilizados para caracterizar os lipossomas. A caracterização morfológica foi realizada por m (Cryo-TEM). A otimização da formulação foi realizada usando conceitos da abordagem de Qualidade Baseada em Projeto (Quality by Design – QbD). As formulações selecionadas otimizadas foram submetidas a análises ex vivo de permeação e mucoadesão. O tamanho, o índice de polidispersão e a eficiência de encapsulação das formulações otimizadas selecionadas foram estudadas para avaliar a estabilidade durante o período de 60 dias sob refrigeração a 5-8°C. **Resultados:** A formulação otimizada de lipossomas carreadores de ghrl e revestido com quitosana foi identificada através de otimização numérica, estabelecendo os critérios alvo de: tamanho (mínimo), índice de polidispersão (IPD) (mínimo), potencial zeta (máximo) e eficiência de encapsulação (EE) (máximo). Os parâmetros selecionados pela otimização foram 70µg/mL de concentração de grelina, 0,3% (m/m) de quitosana e tempo de revestimento de 24 horas. Foram selecionadas a formulação otimizada produzida por homogeneização (Lhomo) e a formulação otimizada produzida por extrusão (Lextru). A formulação L_{homo} resultou em lipossomas com 72,25±1,46nm, IPD de 0,300±0,027, potencial zeta de 50,3±1,46 e EE de 53,2%. Enquanto a formulação Lextru resultou em 152,43±0,24nm, IPD de 0,159±0,018, potencial zeta de 60,81±6,61 e EE de 53,6%. As análises dos resultados mostraram que os parâmetros avaliados permaneceram

estáveis (p<0,5) durante 60 dias. O revestimento de quitosana melhorou o desempenho das formulações nas análises *ex vivo* de permeação e mucoadesão, quando comparada às formulações sem revestimento. Apesar da homogeneização de alta pressão resultar em lipossomas menores do que a obtida por extrusão, esse parâmetro não foi significativo nas análises de permeação. **Conclusão:** Com o método de reidratação do filme fosfolipídico, seguido de pós-processamento, foi possível formar estrutura nanolipossomal, confirmado por cryo-TEM. Com a abordagem QbD foi possível estabelecer os fatores do processo que influenciam nos parâmetros de interesse. Dentre os fatores de formulação que mais influenciaram o tamanho de partícula e a carga de superfície, a concentração de quitosana foi a mais relevante. A concentração de ghrl influência de forma inversa a EE. O revestimento de quitosana foi importante para o desempenho das formulações nas análises *ex vivo* de permeação e mucoadesão.

Palavras-chave: Caquexia. Grelina. Transporte naso-cerebral. Lipossomas.

ABSTRACT

Introduction: Cachexia is a multifactorial syndrome characterized by the continuous loss of skeletal muscle mass that leads to progressive functional impairment. To date, no effective and approved drug intervention completely reverses the findings of cachectic syndrome. Studies have shown positive and encouraging effects of ghrelin (ghrelin - ghrl). In the body, exogenous ghrl is subject to very rapid degradation and current formulations are designed for parenteral administration. As a strategy to overcome these limitations, our study presents the intranasal release of ghrl carried by liposomes. **Objectives:** To develop a nanostructured liposomal system for the delivery of ghrl, designed with the necessary characteristics for naso-cerebral release. Methods: The liposomes were obtained by the hydration technique of phospholipid films, followed by extrusion or high-pressure homogenization, and coated with chitosan. Size, surface electrical potential, polydispersity and encapsulation efficiency were parameters used to characterize liposomes. Morphological characterization was performed by m (Cryo-TEM). The optimization of the formulation was performed using concepts from the Quality by Design (QbD) approach. The optimized selected formulations were subjected to ex vivo permeation and mucoadhesion analyzes. The size, polydispersity index and encapsulation efficiency of the selected optimized formulations were studied to evaluate the stability during the period of sixty days under refrigeration at 8 ± 1 °C. **Results:** The optimized formulation of ghrl-carrying liposomes and coated with chitosan was identified through numerical optimization, establishing the target criteria of: size (minimum), polydispersion index (IPD) (minimum), zeta potential (maximum) and efficiency of encapsulation (EE) (maximum). The parameters selected for the optimization were 70 µg / mL of ghrelin concentration, 0.3% (m / m) of chitosan and coating time of 24 hours. The optimized formulation produced by homogenization (Lhomo) and the optimized formulation produced by extrusion (Lextru) were selected. The Lhomo formulation resulted in liposomes with 72.25 ± 1.46nm, IPD of 0.300 \pm 0.027, zeta potential of 50.3 \pm 1.46 and EE of 53.2%. While the Lextru formulation resulted in 152.43 \pm 0.24nm, IPD of 0.159 \pm 0.018, zeta potential of 60.81 ± 6.61 and EE of 53.6%. The analysis of the results showed that the evaluated parameters remained stable (p <0.5) for sixty days. The chitosan coating improved the performance of the formulations in ex vivo permeation and mucoadhesion analyzes, when compared to the uncoated formulations. Although high pressure homogenization results in lower liposomes than that obtained by extrusion, this parameter was not significant in permeation analyzes. **Conclusion:** With the phospholipid film rehydration method, followed by post-processing, it was possible to form a nanoliposome structure, confirmed by cryo-TEM. With the QbD approach it was possible to establish the process factors that influence the parameters of interest. Among the formulation factors that most influenced the particle size and surface charge, the concentration of chitosan was the most relevant. The concentration of ghrl inversely influences EE. The chitosan coating was important for the performance of the formulations in the *ex vivo* analysis of permeation and mucoadhesion.

Keywords: Cachexia. Ghrelin. Liposome. Nose-to-brain delivery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma esquemático dos capítulos envolvidos na dissertação17
Figura 2 - Resumo gráfico das principais conclusões sobre mecanismo de ação da
ghrl e estratégia utilizando a liberação intranasal da ghrl carreada por lipossomas.
Erro! Indicador não definido.
Figura 3 - Uma representação da organização de um lipossoma e da bicamada
fosfolipídica37
Figura 4 - Representação esquemática da produção de lipossomas por reidratação de
filme lipídico57
Figura 5 - Extrusora com suporte/bloco de aquecimento58
Figura 6 - Homogeneizador de alta pressão com duplo estágio de homogeneização.
58
Figura 7 - Representação esquemática dos lipossomas revestidos com quitosana. 59
Figura 8 - Diagrama de Ishikawa com os Atributos Críticos do Material (CMA) e
Parâmetros Críticos do Processo (CPP) identificados e análise de riscos na produção
de lipossomas carreadores de peptídeos677
Figura 9 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do
Processo (CPP) no tamanho dos lipossomas71
Figura 10 - Efeito de combinações de dois fatores (concentração de quitosana e
grelina) no tamanho dos lipossomas (gráficos 3D)73
Figura 11 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do
Processo (CPP) no índice de polidispersão dos lipossomas74
Figura 12 - Efeito do processamento de pós formação no índice de polidispersão dos
lipossomas75
Figura 13 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do
Processo (CPP) no potencial zeta dos lipossomas77
Figura 14 - Efeito de combinações de dois fatores (concentração de quitosana e tempo
de revestimento) no potencial zeta dos lipossomas (gráficos 3D)79
Figura 15 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do
Processo (CPP) na eficiência de encapsulação da grelina nos lipossomas80
Figura 16 - Efeito da concentração de grelina e quitosana na eficiência de
encapsulação nos lipossomas (gráficos 3D)81

Figura 17 – Formulação obtida por homogeneização que apresentou o maior
desejabilidade estatística, estabelecendo os critérios alvo de tamanho (mínimo),índice
de polidispersão (mínimo), potencial zeta (máximo) e eficiência de encapsulação
(máximo)82
Figura 18 - Formulação obtida por extrusão que apresentou o maior desejabilidade
estatística, estabelecendo os critérios alvo de tamanho (mínimo),índice de
polidispersão (mínimo), potencial zeta (máximo) e eficiência de encapsulação
(máximo)844
Figura 19 - Procedimento de preparação das amostras para as análises por crio-
microscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM)95
Figura 20 - Microscópio eletrônico de transmissão TEM-1400 PLUS, JEOL966
Figura 21 - Esquema da seção transversal do nariz de porco adulto (a) e fotografia da
seção transversal do nariz de porco adulto (b)977
Figura 22 - Representação esquemática teste ex vivo de mucoadesão98
Figura 23 - Representação esquemática da difusão vertical de células Franz99
Figura 24 - Micrografias obtidas por crio-microscopia eletrônica de transmissão (cryo-
TEM) dos lipossomas de formulações preliminares101
Figura 25 - Micrografias obtidas por cryo-TEM dos lipossomas de formulações
preliminares.antes do processamento de pós formação (a) e depois do processamento
de pós formação (b)102
Figura 26 - Micrografias obtidas por cryo-TEM dos lipossomas bilamelares de
formulações preliminares1022
Figura 27 - Perfis de liberação da grelina, ex vivo, das formulações Lhomo, Lhomo sem
revestimento, Lextru, Lextru sem revestimento e ghrl livre

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil do Produto Alvo da Qualidade (QTPP) dos lipossomas carreadores
de grelina65
Tabela 2 - Análise de risco relacionado aos Atributos Críticos do Material (CMA) e
Parâmetros Críticos do Processo (CPP) com impacto estimado nos Atributos Críticos
de Qualidade (CQA)68
Tabela 3 - Variáveis independentes e dependentes do Delineamento experimental
(Design of Experiments – DoE) avaliadas para o desenvolvimento de lipossomas68
Tabela 4 – Delineamento experimental (Design of Experiments – DoE) e dados da
Análise de Resposta69
Tabela 5 - Resumos das respostas, com valores máximos e mínimos, média e
desvio padrão, além do modelo estatísticos selecionado70
Tabela 6 - Respostas previstas pela otimização numérica e respostas reais dos
lipossomas produzidos por homogeneização de alta pressão segundo os parâmetros
otimizados83
Tabela 7 - Respostas previstas pela otimização numérica e respostas reais dos
lipossomas produzidos por extrusão segundo os parâmetros otimizados85
Tabela 8 - Estabilidade da amostra L _{homo} nos tempos zero, 7,15, 30 e 60 dias 100
Tabela 9 - Estabilidade da amostra Lextru nos tempos zero, 7,15, 30 e 60 dias100
Tabela 11 - Resultado do trabalho de mucoadesão da mucosa suína sobre os
lipossomas

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC alfa acetil-CoA carboxilase alfa

AgRP peptídeo associado a agouti

AIDS Acquired Immunodeficiency Syndrome - Síndrome da

Imunodeficiência Adquirida

alfa-MSH Hormônio estimulante de melanócitos

ARC núcleo arqueado

BBB Blood-Brain Barrier - Barreira Hematoencefálica

CMA Critical Material Atributes - Atributos Críticos do Material

CPP Critical Process Parameters - Parâmetros Críticos do Processo

CQA Critical Quality Attributes - atributos críticos de qualidade

Cryo-TEM Transmission Electron Cryo-microscopy - Crio-microscópia eletrônica

de transmissão

DLS Dynamic Light Scattering - Espalhamento dinâmico de luz

DoE Design of Experiments - Delineamento experimental

DPOC Doença pulmonar obstrutiva crônica

DSPE-PEG2000 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi-

(polietilenoglicol)-2000 (sal de sódio)

EE eficiência de encapsulação

FAS fatty acid synthase - ácido graxo sintase

GH Growth Hormone - hormônio de crescimento

ghrl ghrelin - grelina

GHS-R1a Receptor secretagogo do hormônio do crescimento tipo 1a

Glut-4 Transportador de glicose do tipo 4

GOAT grelina-O-aciltransferase

ICC Insuficiência cardíaca crônica

IL Interleucina

IPD índice de polidispersão

LHA Hipotálamo lateral LPL lipoproteína lipase

LS100 fosfatidilcolina de soja

MC4R Receptores melanocortina tipo 4

MyoD proteína 1 para determinação de mioblastos

NPY neuropeptídeo Y

NTS núcleo do trato solitário

PALS Phase Analysis Light Scattering - Análise de fase de dispersão de

luz

PAT Process Analytical Techniques - Técnicas Analíticas de Processo

PBS tampão fosfato-salino

PEG polietilenoglicol

POMC Proopiomelanocortina

posf. Processamento de pós formação

QbD Quality by Design - Qualidade Baseada em Projeto
QTPP Quality target product profile - Perfil alvo do Produto

SCD1 Stearoil-CoA desaturase-1

TNF-alfa Fator de necrose tumoral alfa

vHP Sub-região temporal ventral do hipocampo

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	17			
2	OBJETIVOS	19			
2.1	Geral	19			
2.2	Específicos	19			
CAF	CAPÍTULO I20				
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	21			
3.1	Introdução	21			
3.2	Caquexia	23			
3.3	Grelina	28			
3.4	Via intranasal	34			
3.5	Lipossomas	37			
3.6	Conclusão	40			
REF	FÊRENCIAS	42			
CAF	PÍTULO II	52			
	ABORDAGEM QUALIDADE BASEADA EM PROJETO PARA				
	SENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CARREADORES DE PEPTIDEOS				
4.1	Introdução				
4.2	Material e Métodos				
4.2.					
4.2.	3 1				
	3 Qualidade Baseada em Projeto: Otimização da formulação				
4.2.					
4.2.	, ,				
4.2.	6 Seleção da formulação otimizada	63			
4.3	Resultados e discussão				
4.3.	3.1				
	2 Qualidade Baseada em Projeto: otimização da formulação				
	3 Análise de resposta para otimização				
	4 Seleção da formulação otimizada				
	Conclusão				
	REFERÊNCIAS87				
CAPÍTULO III91					
5	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES OTIMIZADAS SELECIONADA	S 92			
5.1	Introdução				
5.2	Procedimentos experimentais	94			

5.2.1	Estudos de estabilidade	94
5.2.2	Crio-microscopia eletrônica de transmissão	94
5.2.3	Preparação da mucosa	96
5.2.4	Propriedade mucoadesiva	97
5.2.5	Estudo de permeação transmucosa	98
5.3 I	Resultados e discussão	100
5.3.1	Estudo de estabilidade	100
5.3.2	Crio-microscopia eletrônica de transmissão	101
5.3.3	Propriedade mucoadesiva	102
5.3.4	103	
5.3.5	Estudo de permeação transmucosa	103
5.4	Conclusão	105
REFE	RÊNCIAS	106
6 C	ONSIDERAÇÕES FINAIS	116

1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação descreve a minha visão geral do assunto abordado neste esforço de pesquisa, considerando meu aprendizado técnico e científico e o lugar em que me encontro como uma cientista em formação e profissional da área de saúde.

Sob esta perspectiva será expressada minha opinião sobre o estado atual do conhecimento sobre a caquexia como uma doença multifatorial, debilitante e muitas vezes fatal, bem como os motivos que levam a deficiências no diagnóstico e as falhas de tratamento medicamentoso quando este é realizado em tempo hábil.

Paralelamente, será exposto a minha perspectiva e discutido o motivo pelo qual formas farmacêuticas projetadas para alcançar um alvo específico apresentam melhores resultados para tratamento dessa patologia.

O presente trabalho foi redigido na forma de capítulos estruturados conforme demonstrado na Figura 1.

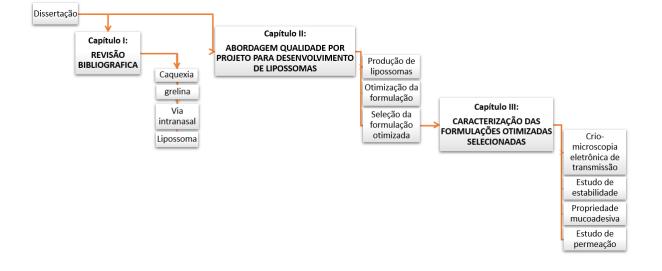


Figura 1 - Fluxograma esquemático dos capítulos envolvidos na dissertação.

Fonte: elaboração própria.

O Capítulo I é a revisão bibliográfica, onde serão abordados os aspectos gerais fundamentados nas publicações científicas. Nesta abordagem foi relacionada a fisiopatologia da caquexia, a associação a outras doenças graves, as formas de diagnóstico e os tratamentos paliativos. Destacando a relevância da forma

farmacêutica e da via de administração. A revisão bibliográfica, espelha o estado atual de conhecimento científico sobre a caquexia, a grelina, a via intranasal e os lipossomas.

Os capítulos de II e III foram estruturados de forma semelhante e constam de introdução devidamente referenciada, descrição de procedimento experimentais, resultados com a respectiva análise e a discussão, considerações preliminares e referência bibliográfica específica a cada capítulo.

No Capítulo II, uma abordagem do desenvolvimento de projetos usando conceitos de Qualidade Baseada em Projeto (Quality by Design – QbD) foi apresentada. Uma vez que foi adotada a seguinte premissa "para alcançar avanços em novos produtos, serviços e processos é necessário planejamento que otimize procedimentos de produção e controle".

No Capítulo III, os resultados de caracterização morfológica e estabilidade das formulações selecionadas pelo QbD serão apresentados. Associado com análise dos estudos *ex vivo* de permeação e mucoadesão.

Assim, após os processos de caracterização os lipossomas carreadores de ghlr poderão ser submetidos a estudos *in vitro* e *in vivo*, como possível desdobramentos futuro para esse estudo. Podendo confirmar a transferência teórica naso-cerebral da ghrl carreada por lipossoma para o tratamento da caquexia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um sistema lipossomal nanoestruturado para veiculação da grelina, visando características necessárias para liberação naso-cerebral.

2.2 Específicos

- Apresentar o estado atual do conhecimento científico sobre a fisiopatologia da caquexia, o mecanismo de ação da grelina, perspectivas para utilização da via naso-cerebral e estratégias utilizando lipossomas como sistemas de liberação de fármacos,
- Projetar e preparar vesículas lipossomais com propriedades mucoadesivas para veiculação da grelina;
- Aplicar abordagem de Qualidade Baseada em Projeto (Quality by Design –
 QbD) para desenvolver formulações lipossomais otimizadas;
- Identificar perfil alvo do produto, atributos críticos de qualidade, atributos críticos do material e parâmetros críticos do processo.
- Avaliar a influência da concentração de grelina, concentração de quitosana, tempo de revestimento e processamento de pós formação no tamanho lipossomal, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação dos lipossomas.
- Selecionar as formulações otimizadas, visando menor tamanho, menor índice de polidispersão, maior carga de superfície e maior eficiência de encapsulação.
- Caracterizar os aspectos morfológicos das vesículas lipossomais via microscopia eletrônica de transmissão.
- Caracterizar a estabilidade das vesículas lipossomais das formulações selecionadas, segundo tamanho lipossomal, dispersão do tamanho, carga de superfície e eficiência de encapsulação;
- Determinar o perfil de permeação e o perfil mucoadesivo em mucosa nasal de suíno (modelo ex vivo) das formulações selecionadas;

CAPÍTULO I

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Introdução

A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada pela perda contínua de massa muscular esquelética (com ou sem perda de massa gorda) que não pode ser totalmente revertida pelo suporte nutricional convencional e leva ao comprometimento funcional progressivo (FEARON et al., 2011; MUSCARITOLI et al., 2010). A caquexia é descrita em associação com muitas condições crônicas, doenças infeciosas e observada em pacientes após lesões traumáticas extensas ou sepse (FARKAS et al., 2013; GRAUL; STRINGER; SORBERA, 2016).

Até o momento, nenhuma intervenção medicamentosa efetiva e aprovada reverte completamente os achados da síndrome caquética (BARACOS et al., 2018). Várias abordagens promissoras para o tratamento falharam em atender ao desafio dos ensaios clínicos de fase III. Avanços adicionais são urgentemente necessários (VON HAEHLING; ANKER, 2014).

Estudos demonstraram efeitos positivos e encorajadores da grelina (*ghrelin* – ghrl) no tratamento de pacientes caquéticos (CHEN et al., 2015; ESPOSITO et al., 2015; MOLFINO et al., 2014). Embora os dados sejam promissores para apoiar o uso terapêutico da ghrl na caquexia, os inconvenientes do tratamento que limitam o uso clínico incluem uma meia-vida curta e a necessidade de administração parenteral (BRIMIJOIN et al., 2016; MALIK; YENNURAJALINGAM, 2019). Nesse contexto, a liberação intranasal da ghrl carreada por lipossomas para transpor a barreira hematoencefálica (*Blood–Brain Barrier* - BBB) e possibilitar sua ação central pode ser uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade desse fármaco (SALADE et al., 2017).

A desvantagem para o uso terapêutico dos peptídeos é sua suscetibilidade a clivagem por enzimas (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Consequentemente, estratégias utilizando sistemas de liberação de fármacos, como lipossomas, podem ser desenvolvidas para proteger os peptídeos contra ataque enzimático e melhorar sua permeação (WONG; MARTINEZ; DASS, 2016).

A via nasal tem sido utilizada com vantagens para liberação cerebral e administração crônica de macromoléculas (PAVAN et al., 2008). A região olfativa da mucosa nasal fornece uma conexão entre o nariz e o cérebro, que pode ser usada

para distribuir com maior facilidade fármacos que atuam no sistema nervoso central (MITTAL et al., 2014).

A via naso-cerebral associada com o uso de lipossomas pode ser considerada para proteger a ghlr contra biodegradação e a melhor acessibilidade da ghrl aos seus alvos cerebrais. Portanto, os lipossomas podem ser capazes de proteger a ghrl das enzimas nasais, melhorar a permeação e consequentemente aumentando a biodisponibilidade da ghrl, o que pode ser promissor no tratamento da caquexia(SALADE et al., 2017)(SALADE et al., 2017).

3.2 Caquexia

Etimologicamente, a caquexia deriva do grego, kakos = ruim e hexis = condição. Na Grécia, no século IV a.C., Hipócrates já descreveu com precisão a patogenia central da caquexia, dizendo: "a carne é consumida e se torna água". Ele considerava a caquexia como um sinal de morte (KATZ; KATZ, 1962 apud NAITO, 2019).

A caquexia apresenta um caráter multifatorial e sistêmico que dificulta a elaboração de critérios que a definem (EVANS et al., 2008; FEARON et al., 2011). Um consenso indica que quase todas as definições compartilham dois fatores comuns: perda de peso e inflamação (MUSCARITOLI et al., 2010). Diferentes definições de caquexia concordam que a caquexia é uma síndrome multifatorial que envolve alterações em várias vias metabólicas em muitos tecidos e órgãos (ARGILÉS et al., 2014).

O paciente caquético, além do comprometimento funcional, apresenta diminuição da qualidade de vida, aumento da mortalidade e maior suscetibilidade às toxicidades relacionadas ao tratamento da doença associada, levando a um prognóstico reservado (FEARON et al., 2011).

Desta forma, a caquexia é caracterizada pela perda contínua de massa muscular esquelética, massa adiposa e massa óssea (KAYS et al., 2018). Porém, a perda de tecido muscular é considerada o principal mecanismo fisiopatológico para explicar a redução da capacidade física, aumento da fragilidade, suscetibilidade à progressão da doença, aumento da taxa de hospitalização e, consequentemente, aumento da mortalidade (SCHERBAKOV; DOEHNER, 2019).

Caquexia é um grande e crescente problema de saúde pública (SHEWAN, 2017). É uma condição séria, porém subestimada e não reconhecida nos pacientes. Médicos e pesquisadores concentraram sua atenção na doença primária, raramente reconhecendo a caquexia como uma condição distinta. Além da falta de terapia eficaz que justifique o reconhecimento e o registro da condição caquética (SHEWAN, 2017).

Caquexia é descrita em associação com muitas condições crônicas, como câncer, insuficiência cardíaca crônica (ICC), artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença renal crônica, cirrose hepática, fibrose cística, doença de Crohn, acidente vascular cerebral e alterações neurológicas degenerativas. Também foi observada em pacientes após lesões traumáticas e sepse extensas, além

de estar associada a pacientes com doenças infecciosas como HIV / AIDS, tuberculose e malária (GRAUL; STRINGER; SORBERA, 2016). Foi proposta uma hipótese de que, independente da doença crônica individual, o processo de perda segue um padrão metabólico final comum. Esse padrão metabólico geralmente se relaciona a um estágio avançado da doença subjacente e pode ser melhor resumido como um aumento da rotatividade catabólica e enfraquecimento anabólico (SCHERBAKOV; DOEHNER, 2019). Independentemente da doença subjacente, a caquexia está associada a má resposta ao tratamento medicamentoso, má qualidade de vida, mau prognóstico e aumento da mortalidade em comparação com pacientes não caquéticos (MÜLLER et al., 2010).

Dados de 2014 em países industrializados, como países da América do Norte, Europa e Japão, mostraram que a prevalência geral de caquexia está crescendo e atingiu cerca de nove milhões de pacientes (VON HAEHLING; ANKER, 2014). Os dados são escassos para os países da América do Sul e da África, é estimado que a caquexia também seja um grande problema nesses países.

Em minha visão geral do assunto, a caquexia atinge um número significante de pacientes e isso deveria aumentar a conscientização sobre a caquexia e ajudar a comunidade a compreender sua complexidade e magnitude. A ação para prevenir e controlar doenças crônicas requer uma abordagem abrangente que atinja uma população como um todo e inclua intervenções de prevenção e tratamento. As intervenções devem ser multissetorial, com esforços de colaboração do governo, organizações internacionais, instituições acadêmicas, sociedade civil e setor privado.

A caquexia pode ser qualificada como um problema de saúde pública global. Para um ser classificada como tal uma comorbidade deve: (i) possuir o ônus alto em termos de morbidade, mortalidade, qualidade de vida e custos; (ii) ser distribuído de maneira injusta, afetando grupos populacionais desfavorecidos em maior extensão; (iii) haver alguma evidência de que as estratégias de saúde pública podem reduzir substancialmente a carga da doença e, finalmente, que essas estratégias preventivas ainda não estarem totalmente instaladas (FARKAS et al., 2013).

Além dos pontos citados, há um aumento significativo na expectativa de vida em todo o mundo, resultando em uma porcentagem maior de idosos. Consequentemente, há evidências claras de uma transição epidemiológica, resultando em um aumento acentuado na incidência de doenças crônicas em todo o mundo (BERGMAN et al., 2013). Os países de baixa renda enfrentam ainda uma

carga dupla de doenças, à medida que continuam a abordar os problemas de doenças infecciosas. Deve haver um aumento na conscientização sobre a caquexia e ajudar a comunidade a entender sua complexidade e magnitude (FARKAS et al., 2013).

O suporte nutricional adequado continua sendo um dos pilares do tratamento da caquexia (BARACOS et al., 2018), no entanto, a perda de massa corporal associada à caquexia não é apenas mediada pela diminuição da ingestão de alimentos (STEINMAN; DEBOER, 2013). Assim, pacientes em nutrição parenteral total e, portanto, com uma ingestão energética perfeitamente controlada, ainda perdem peso e sofrem de sintomas de caquexia (ARGILÉS et al., 2014).

A perda de peso adicional é devida a processos relacionados a alterações metabólicas, mediados pelo excesso de liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Tanto as catecolaminas quanto as citocinas pró-inflamatórias promovem processos catabólicos (MÜLLER et al., 2010).

As citocinas pró-inflamatórias, além de diminuir a eficácia do hormônio do crescimento (Growth Hormone – GH), atuam no sistema nervoso central como mediadores da inflamação e como fatores catabólicos que estimulam as vias proteolíticas, levando à atrofia muscular e aumento da quebra do tecido adiposo (STEINMAN; DEBOER, 2013).

Citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6), IL-10 e IL-1β e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), estimulam a degradação das proteínas musculares, causam disfunção contrátil e inibem a miogênese. Além de promover o desperdício de tecido adiposo, inibição da diferenciação de adipócitos, estimulação da lipólise e aumento da apoptose nos adipócitos (MÜLLER et al., 2010).

O balanço energético negativo relacionado à caquexia está associado à sinalização inflamatória no sistema hipotalâmico da melanocortina, a regulação da sinalização inflamatória central do metabolismo está relacionada à sinalização da melanocortina. Neurônios que expressam peptídeo pró-opiomelanocortina (POMC), peptídeo orexigênico associado à agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) na presença de citocinas pró-inflamatórias geram uma diminuição na liberação de AgRP / NPY e aumentam a liberação de POMC (KWON et al., 2014).

O POMC é clivado para produzir Hormônio Estimulante de Melanócitos (alfa-MSH). O alfa-MSH, liberado nas sinapses, é ligado aos receptores da melanocortina 4 (MC4R), levando a um aumento na taxa metabólica basal, uma redução na massa

corporal magra e uma diminuição no comportamento de procura de alimentos. AgRP / NYP, agonista natural do MC4R, quando diminuído, aumenta os efeitos do POMC, levando à restrição do apetite. Resultando em restrição de apetite gerada pela diminuição da expressão de AgRP / NYP (um agonista natural do MC4R), associado a um aumento nos efeitos do POMC (STEINMAN; DEBOER, 2013).

O conteúdo de TNF-alfa também diminui as reservas de carboidratos, inibindo a atividade do receptor de insulina e uma diminuição na expressão do transportador de glut-4, que deve desempenhar um papel fundamental na homeostase glicêmica prejudicada (LEGUISAMO et al., 2012).

O aumento da atividade do sistema nervoso simpático resultante do aumento das concentrações plasmáticas de neurotransmissores também resulta em perda de massa corporal e aumento do gasto energético, estimulação da lipólise, diminuição das enzimas lipogênicas e estimulação da apoptose no músculo esquelético (MÜLLER et al., 2010). As catecolaminas têm sido associadas a uma resposta imune aprimorada, sugerindo que o sistema nervoso simpático é um mediador essencial da caquexia (STEINMAN; DEBOER, 2013).

Ao iniciar um processo inflamatório, o corpo adota um aumento da atividade sistêmica do sistema nervoso simpático. Um dos objetivos da inflamação é a estimulação de células dendríticas, que participam da resposta imune (PONGRATZ; STRAUB, 2014). As células imunes expressam receptores para neurotransmissores que são funcionais e traduzem sinais neuronais em sinais de células imunes (CARR; BLALOCK, 1991). No entanto, se essa configuração de aumento da atividade do sistema nervoso simpático persistir, os efeitos são prejudiciais devido ao estado catabólico crônico resultante, levando a caquexia, pressão alta, resistência à insulina e aumento da mortalidade cardiovascular (PONGRATZ; STRAUB, 2014).

Como a caquexia está associada a processos fisiopatológicos complexos, tratamentos farmacológicos, como: suplementação de cálcio ou estimulantes do apetite, como acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, ciproheptadina e corticosteróides, como prednisolona, metilprednisolona e dexametasona, são usados no tratamento atual e apresentam sucesso limitado (KHATIB et al., 2018a). Os tratamentos farmacológicos disponíveis não abordam de maneira abrangente os componentes relevantes da Síndrome de Caquexia (ESPOSITO et al., 2015).

Há um aumento na observação e discussão dos cientistas sobre a caquexia ser vista como uma via metabólica final comum, independentemente da doença

subjacente, sendo uma condição distinta e tratável (SCHERBAKOV; DOEHNER, 2019). As pesquisas sobre caquexia ainda estão subdesenvolvidas, mas já pode-se ver sinais que indicam um esforço científico básico que será evoluído para estudos clínicos, gerando a esperança de que terapias eficazes para essa síndrome sejam desenvolvidas nos próximos anos (SHEWAN, 2017).

3.3 Grelina

Dados promissores apoiam o uso terapêutico da ghlr na caquexia (CHEN et al., 2015; ESPOSITO et al., 2015; KHATIB et al., 2018b; MOLFINO et al., 2014).

Ghrl é um hormônio composto por 28 aminoácidos produzido principalmente na mucosa oxíntica do estômago (DEBOER, 2011). Esse hormônio se liga ao receptor secretagogo do hormônio de crescimento tipo 1a (GHS-R1a) no hipotálamo, estimulando a liberação do GH (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999). A acilação catalisada pela Ghrl-O-aciltransferase (GOAT) é essencial para a ligação da ghrl ao receptor GHS-R1a (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999).

A acilação pode não ser necessária para todas as ações da ghrl (DEBOER, 2011). Algumas evidências mostram que as funções biológicas da ghrl desacilada são independentes do GHS-R1a. Ghrl desacilada parece ter seu próprio receptor cognato. No entanto, este receptor permanece indeterminado (YANAGI et al., 2018).

Na acilação da ghrl, o GOAT usa triglicerídeos da dieta, incluindo ácidos graxos C6-C10, com forte preferência pelo C8 (NISHI et al., 2005). O sistema Ghrl-GOAT tem funções na regulação da homeostase energética, incluindo a capacidade de comunicar o estado nutricional periférico atual ao hipotálamo e realizar compensações de energia (MÜLLER et al., 2015).

O GOAT parece agir, além de detectar e se comunicar com o cérebro sobre a disponibilidade de nutrientes periféricos, também para armazenamento de energia (YANAGI et al., 2018). O GOAT é necessário para a prevenção da hipoglicemia sob condições de fome, mantendo os níveis de glicose no sangue mediados pelo GH (ZHAO et al., 2010).

A descoberta da ghrl representa um importante ponto de virada no estudo das interações estômago-cérebro e contribuiu enormemente para o entendimento da homeostase sistêmica (YANAGI et al., 2018).

A administração da ghrl em pacientes com caquexia resulta em diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduz a atividade do nervo simpático (KISHIMOTO et al., 2012). Possui potencial de estimular a atividade anabólica, promover a secreção do GH, regular o sistema nervoso autônomo e suprimir os efeitos da inflamação (YANAGI et al., 2018).

Um dos mecanismos de ação propostos para ghrl assume que esse hormônio regula o metabolismo pela ativação de circuitos neurais orexigênicos, como o sistema

central de melanocortina (MÜLLER et al., 2015). Além da secreção do GH, a estimulação da ghrl no hipotálamo resulta em uma diminuição na expressão dos efeitos do peptídeo anorexigênico de POMC e em um aumento na expressão e liberação dos peptídeos orexigênicos AgRP e NPY (Figura 2) (DEBOER, 2010; STEINMAN; DEBOER, 2013).

A ghlr diminuir a expressão da expressão de POMC e a sinalização inflamatória da IL-1 beta no sistema melanocortina está fortemente associada ao balanço energético negativo relacionado à caquexia. Ghrl diminuiu a expressão de POMC e inibe citocinas pró-inflamatórias, como IL-1alfa, IL-1beta, TNF-alfa (KWON et al., 2014; PEREIRA; DA SILVA; DE MORAES-VIEIRA, 2017; SELIM et al., 2015).

A maioria dos animais, incluindo humanos, possui padrões alimentares padronizados nos quais as refeições são feitas com base em fatores aprendidos e / ou ambientais. A sinalização da ghrl com neurônios do hipocampo ventral (vHP) é fisiologicamente relevante para o comportamento alimentar condicionado. A ativação dos neurônios pela ghrl-vHP ainda se comunica diretamente com os neurônios no hipotálamo lateral (LHA) que expressa o neuropeptídeo orexina (Figura 2) (HSU et al., 2015). Juntas, a sinalização central da ghrl-GHS-R1a induz a alimentação diretamente através da ativação dos neurônios NPY / AgRP e indiretamente pela via vHP-LHA (YANAGI et al., 2018).

A síntese da ghrl e rotas que transportam sinais da ghrl para o hipotálamo é ilustrada na Figura 2. Nas células do tipo X / A localizadas no estômago, é onde a progrelina é acilada. Duas rotas foram propostas para transmitir sinais da ghrl derivados do estômago para o hipotálamo: o nervo vago aferente e a circulação sanguínea. O nervo vago é o décimo nervo craniano, contém fibras eferentes e aferentes e transmite informações das vísceras para o cérebro. Ghrl se liga ao GHS-R1a e suprime a atividade elétrica do nervo aferente vagal. Esse sinal elétrico atinge o núcleo do trato solitário (NTS), que sinapse com os neurônios NPY no ARC. Ghrl circulante é transportada através do BBB e se liga aos neurônios nas proximidades dos capilares (YANAGI et al., 2018).

Cérebro

Cérebro

Circle, CH₂, CH₃ CH₃ CH₄ COOH

COOH

COOH

Circle, CH₂, CH₃ CH₄ COOH

Circle, COOH

Circle, CH₂, CH₃ COOH

Circle, CH₂, CH₃ COOH

Circle, CH₂, CH₃ COOH

Circle, CH₃ COOH

Circle, CH₂, CH₃ COOH

Circle, CH₃ CO

Figura 2 - Resumo gráfico das principais conclusões sobre mecanismo de ação da ghrl e estratégia utilizando a liberação intranasal da ghrl carreada por lipossomas.

Fonte: elaboração própria.

O GHS-R1a no hipotálamo é predominantemente expresso no ARC. O ARC contém neurônios orexigênicos que expressam NPY e AgRP, neurônios anorexigênicos que expressam POMC. Os neurônios NPY / AgRP e POMC projetam-se no vHP. A alta atividade dos neurônios POMC aumenta a liberação de alfa-MSH no vHP, que por sua vez atua nos neurônios que expressam o MC4R para suprimir a ingestão de alimentos. O NPY age estimulando a ingestão de alimentos, enquanto o AgRP antagoniza o MC4R. A ação da ghrl no vHP estimula a alimentação também com a ativação dos neurônios LHA e liberação de orexina. Ghrl induz a ingestão de alimentos ativando os neurônios NPY / AgRP. Ghrl estimula a liberação de GH ativando os somatotrópicos na hipófise anterior (YANAGI et al., 2018).

Ghrl também suprime a inflamação sistêmica por meio de suas funções simpático-inibitórias. Os receptores centrais de ghrl que envolvem uma via dependente do receptor NPY mediam a propriedade inibidora da ghrl na liberação de noradrenalina. A modulação da ativação nervosa simpática superestimulada pode resultar no efeito inibitório da ghrl na produção de TNF-alfa (WU et al., 2007). Nos simpatócitos, a liberação de noradrenalina pelos nervos simpáticos pós-ganglionares aumenta a produção de TNF-alfa (YANG et al., 2001) e a administração periférica de

ghrl diminui os níveis circulantes de TNF-alfa e noradrenalina (WU et al., 2007). Ghrl também diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias pela ativação do nervo vago (YANAGI et al., 2018).

O GHS-R1a também é expresso no nervo vago (LI, 2007), o nervo vago serve como um canal para a comunicação neuro entérica, onde o aumento da atividade do nervo vago, central e periférico, leva ao aumento da motilidade gastrointestinal, aumento da função pancreática exócrina e alterações nos perfis neuroendócrinos (WANG et al., 2010). O nervo vago também parece desempenhar um papel central na inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, e estudos sugerem que essa atividade anti-inflamatória da estimulação vagal é mediada por ghrl (BANSAL et al., 2012; CHEYUO et al., 2011; LIN; HSIAO, 2017; PRODAM; FILIGHEDDU, 2014).

Assim, algumas das ações da ghrl depende da acessibilidade do hormônio aos seus alvos cerebrais, (CABRAL et al., 2014) mas também executa ações relacionadas à caquexia que não se limitam a esses efeitos centrais. Além da atividade biológica central, a ghrl protege os órgãos críticos do metabolismo do estresse e da inflamação metabólica (YANAGI et al., 2018).

Na inflamação, GHS-R1a é expresso em linfócitos e a ghrl demonstrou diminuir a expressão de citocinas inflamatórias em monócitos e células T (PEREIRA; DA SILVA; DE MORAES-VIEIRA, 2017) e a ghrl pode desempenhar um papel nos estados inflamatórios agudos e crônicos, e essa hipótese é apoiada pela observação de que os níveis circulantes de ghrl geralmente são alterados nos estados inflamatórios (PRODAM; FILIGHEDDU, 2014).

No sistema cardiovascular, o GHS-R1a é expresso no coração e na aorta. Também é relatado que o gene GHS-R1a pode ser detectado na linha celular de cardiomiócitos em cultura e em células endoteliais vasculares humanas (KISHIMOTO et al., 2012). Ghrl apresenta ações no sistema cardiovascular, são identificadas a dilatação do calibre arterial independentemente do endotélio, a diminuição da pressão arterial média, a neutralização do sistema renina-angiotensina (TORSELLO et al., 2012). Quando a ghrl é administrada cronicamente em caso de insuficiência cardíaca, promove redução no remodelamento cardíaco após isquemia, melhora da função sistólica esquerda e diminuição da mortalidade por arritmias fatais (KISHIMOTO et al., 2012).

Ghrl exibe atividade gastroproquética (LIN; HSIAO, 2017) porque, além de aumentar a atividade do nervo vago, possui semelhança estrutural com a motilina e

acelera a taxa de esvaziamento gástrico, mesmo na presença de vagotomia (ASAKAWA et al., 2001; BINN et al., 2006). É capaz de estimular a secreção ácida em associação com gastrina; no entanto, somente quando o ghrl é administrado centralmente em ratos, ele estimula a motilidade colônica (SAKURADA et al., 2010).

Ghrl atua na regulação do metabolismo da glicose (ALAMRI et al., 2016). A ghrl acilada tem principalmente efeitos hiperglicêmicos e promove resistência à insulina (VESTERGAARD et al., 2017), agindo nas ilhotas pancreáticas para suprimir a secreção de insulina (SALEHI et al., 2004), e nos hepatócitos estimulando a produção de glicose (GAUNA et al., 2005) A ghrl desacilada pode neutralizar os efeitos hiperglicêmicos. Ghrl desacilada aumenta a sensibilidade à insulina.(GAUNA et al., 2005) Consequentemente, há interesse no potencial do antagonismo da ghrl para melhorar o diabetes e a hiperglicemia (COLLDÉN; TSCHÖP; MÜLLER, 2017; POHER; TSCHÖP; MÜLLER, 2018) A insulina está associada à inibição da liberação de ghrl; portanto, baixos níveis de insulina levam ao aumento da secreção de ghrl (NASS et al., 2010).

Foi demonstrado que a administração de ghrl em ratos evita a atrofia muscular, aumentando a fosforilação da proteína quinase B (uma proteína quinase que desempenha um papel fundamental na apoptose, proliferação celular e migração celular), diminui a via da miostatina (proteína envolvida na inibição do crescimento). e regeneração dos músculos esqueléticos), ativar a miogenina (um fator de transcrição envolvido na miogênese e no reparo) e ativar a proteína 1 para determinação de mioblastos (MyoD- uma proteína que desempenha um papel importante na regulação da diferenciação muscular) (CHEN et al., 2015).

No tecido adiposo, o ghrl estimula a expressão de genes que codificam enzimas promotoras de armazenamento de gordura, como lipoproteína lipase (LPL), ácidos graxos sintase (FAS), acetil-CoA carboxilase alfa (ACC-alfa) e estearoil-CoA dessaturase-1 (SCD1), que pode fornecer importantes reservas de energia para o organismo. Nos adipócitos marrons, a ghrl diminui a expressão de proteínas relacionadas a termogênicos, diminuindo o processo metabólico durante o qual o corpo queima calorias para produzir calor (MÜLLER et al., 2010).

Devido aos benefícios do ghrl, a abordagem farmacológica do sistema ghrl é considerada uma abordagem promissora e valiosa para o tratamento de uma variedade de complicações metabólicas, incluindo a caquexia (COLLDÉN; TSCHÖP; MÜLLER, 2017; HATANAKA et al., 2015).

O tratamento com ghlr possui inconvenientes, que incluem uma meia-vida curta e a necessidade de administração parenteral (BRIMIJOIN et al., 2016; MALIK; YENNURAJALINGAM, 2019)

As limitações do tratamento com ghrl exógena levaram investigação de alternativas como: a anamorelina, um agonista da ghrl, que é potente e altamente específica (BAI et al., 2017; CURROW; SKIPWORTH, 2017; GARCIA et al., 2015), administração oral de rikkunshito, um medicamento fitoterápico potenciador de ghrl, que aumenta os níveis plasmáticos de acil ghrl (FUJITSUKA; UEZONO, 2014) e a investigação de estratégias para evitar degradação e melhorar a acessibilidade do ghrl aos alvos, que é o foco desse trabalho.

3.4 Via intranasal

O cérebro é isolado e protegido por vários mecanismos do ambiente externo. A barreira fisiológica possui propriedades como controle dos transportadores de influxo e efluxo, expressão de junções estreitas ou ação de enzimas metabolizadoras presentes nas células endoteliais (DANEMAN; PRAT, 2015; LEE et al., 2010; MARIANECCI et al., 2017). A BBB e a barreira do líquido cefalorraquidiano representam os principais limites entre a circulação periférica e o sistema nervoso central (GRAFF; POLLACK, 2004).

A via naso-cerebral pode ser vantajosamente usada para administração crônica de macromoléculas sensíveis, como peptídeos bioterapêuticos (SALADE et al., 2017). Este sistema de liberação está emergindo como uma abordagem promissora para administração de medicamentos que requerem ação no sistema nervoso central (BOURGANIS et al., 2018)

A administração intranasal é uma alternativa às vias oral e intravenosa e é eficaz na administração sistêmica de medicamentos (PIRES et al., 2009) e também uma alternativa potencial para métodos injetáveis invasivos para superar a BBB e administrar medicamentos ao sistema nervoso central (MIYAKE; BLEIER, 2015).

Formulações contendo peptídeos terapêuticos atuais são planejadas para administrações injetáveis (GARIN et al., 2013). No entanto, quando é necessária uma administração crônica, as vias injetáveis invasivas podem levar à baixa adesão do paciente e subsequente falha do tratamento (SALADE et al., 2018).

Na via naso-cerebral, o fármaco pode permear para circulação sistêmica através da mucosa nasal que é altamente vascularizada e, como na administração intravenosa, pode ou não cruzar a BBB e entrar no cérebro, mas também pode ser direcionado diretamente ao sistema nervoso central pelo nervos olfativos ou trigêmeos do epitélio (PIRES et al., 2009).

A região olfativa da mucosa nasal fornece uma conexão entre o nariz e o cérebro, que pode ser usada para distribuir com maior facilidade fármacos que atuam no sistema nervoso central (MITTAL et al., 2014).

Os mecanismos de transporte de fármacos pela via naso-cerebral foram descritos em: (i) a via sistêmica, que é caracterizada pela absorção do fármaco através da mucosa nasal, distribuição sistêmica e possível passagem pelo BBB, semelhante à via intravenosa; (ii) a via olfativa, na qual o fármaco pode permear o epitélio olfativo

até o bulbo olfativo a partir do qual tem acesso ao sistema nervoso central; (iii) a via axônio neural, um transporte axonial dos nervos cranianos olfativos e trigeninal, a qual a permeação está associada aos axônios e o fármaco evita a BBB (KHAN et al., 2010).

A via sistêmica está associada ao metabolismo hepático e renal de fármacos, por gerar a exposição sistêmica, sem especificidade para os tecidos cerebrais (DHURIA; HANSON; FREY, 2010).

Na via olfativa, o fármaco atravessa os espaços entre os neurônios olfativos no epitélio olfativo e são transportados para o bulbo olfativo. Após atingir o bulbo olfativo, o fármaco pode entrar em outras regiões do cérebro por difusão (YING, 2008). Essa via depende de características especificas do fármaco para ser efetiva.

Na via axônio neural, o fármaco atinge o bulbo olfativo por meio do transporte axonal de neurônios olfativos e trigeminal. Apenas substâncias de tamanho semelhante ou menor que o diâmetro dos axônios olfativos humanos (100-700nm) podem ser transferida por esta via (BOURGANIS et al., 2018; MORRISON; COSTANZO, 1992).

O nervo trigêmeo é o principal nervo craniano, embora suas terminações não sejam diretamente expostas na cavidade nasal, pressupõe-se que o ponto de entrada inicial seja provavelmente os ramos oftálmico e maxilar do nervo trigêmeo, que inervam a mucosa nasal dorsal com a parte anterior da cavidade nasal e as paredes laterais da mucosa nasal (DHURIA; HANSON; FREY, 2010; DJUPESLAND; MESSINA; MAHMOUD, 2014).

Vários fatores influenciam a administração de fármacos ao sistema nervoso central e podem determinar quais das vias acima podem predominar em termos da extensão da absorção do fármaco. É possível que as três vias contribuam de forma independente ou sinérgica para o transporte de fármacos. A afinidade de um tratamento terapêutico para uma via específica pode ser modulada por si só ou pelas propriedades da formulação (BOURGANIS et al., 2018).

A administração naso-cerebral sofre de limitações, como depuração mucociliar, metabolismo enzimático e permeação limitada pelo tamanho das partículas (SCHIPPER; VERHOEF; MERKUS, 1991). Os fármacos administrados pela via intranasal contornam o efeito gastrointestinal e o metabolismo hepático de primeira passagem. No entanto, eles podem ser metabolizados significativamente no lúmen da cavidade nasal ou durante a passagem pela barreira epitelial nasal, devido à presença de uma ampla gama de enzimas metabólicas nos tecidos nasais. Embora o

metabolismo nasal de primeira passagem seja mais fraco que o metabolismo hepático e intestinal, possui uma imposição significativa na biodisponibilidade do medicamento (PIRES et al., 2009).

O sistema de depuração mucociliar desempenha um papel importante na defesa do trato respiratório. O muco coleta partículas estranhas, os cílios fornecem a força motriz, impedindo a inalação de xenobióticos no ar. Os xenobióticos aderem ao muco e são transportados para a nasofaringe. Essa depuração mucociliar influencia significativamente a absorção nasal de medicamentos (MERKUS et al., 1998).

Para superar essas dificuldades do metabolismo nasal e da depuração mucociliar, estratégias utilizando lipossomas funcionalizados podem ser seguidas. O uso de lipossomas funcionalizados pode promover contato prolongado entre o fármaco e o local de absorção, facilitar a absorção direta pela mucosa nasal e proteger contra o metabolismo enzimático (PIRES et al., 2009).

3.5 Lipossomas

Lipossomas são vesículas auto organizadas nano ou micro estruturadas que consistem em bicamadas lipídicas concêntricas com uma fase aquosa interna (LAI; FADDA; SINICO, 2013). Na figura 3 é possível observar os aspectos estruturais dos lipossomas. Muitos lipossomas podem ser produzidos com características distintas, que dependem da natureza dos componentes lipídicos, da carga superficial e das possíveis modificações químicas (NISINI et al., 2018).

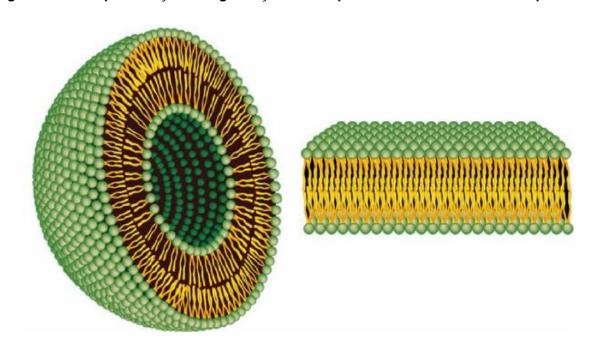


Figura 3 - Uma representação da organização de um lipossoma e da bicamada fosfolipídica.

Fonte: adaptado de BOZZUTO; MOLINARI (2015)

A principal composição dos lipossomos são os fosfolipídios, que são moléculas anfifílicas formadas por uma porção hidrofílica e cadeias hidrofóbicas. Por essas características, quando os fosfolipídios são dispersos em soluções aquosas, tendem a formar membranas (PAPAHADJOPOULOS; KIMELBERG, 1974). Suas porções polares preferem interagir com o ambiente aquoso e suas longas cadeias apolares promovem interação entre eles. As cadeias hidrofóbicas de cada camada enfrentam e formam um compartimento lipofílico em torno de um compartimento hidrofílico. As interações hidrofóbicas dessas bicamadas lipídicas são forças de van der Waals, que mantêm as porções apolares juntas. Enquanto isso, ligações de hidrogênio e

interações polares entre moléculas de água no ambiente aquoso e as porções lipídicas polares estabilizam essa organização (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Como transportadores de fármacos, os lipossomas são amplamente utilizados devido à sua capacidade de encapsular moléculas hidrofílicas, anfifílicas e lipofílicas. Além disto, metodologias de funcionalização da superfície, podem melhorar a farmacocinética e a capacidade de administrar fármacos nas áreas afetadas (VIEIRA; GAMARRA, 2016). Os lipossomas também têm a vantagem de apresentar boa biodegradabilidade e biocompatibilidade, liberação controlada de fármacos e baixa toxicidade (NISINI et al., 2018; NOBLE et al., 2014; VIEIRA; GAMARRA, 2016). Os lipossomas parecem ser um sistema quase perfeito de transportadores de fármacos, uma vez que sua morfologia é semelhante à das membranas celulares (biomiméticos) e devido à sua capacidade de incorporar várias substâncias (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

A camada fosfolipídica protetora é capaz de resistir frente a variações de pH, aos radicais livres do corpo e às ações enzimáticas protegendo o ghrl da degradação até que a liberação ocorra (NISINI et al., 2018). Formulações lipossômicas também podem transportar ghrl através da barreira mucosa, protegendo do metabolismo na cavidade nasal (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Os lipossomas têm ganhado atenção por serem potencialmente promissor para o tratamento de doenças neurológicas (LAI; FADDA; SINICO, 2013; RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013). O desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos para o sistema nervoso central é um dos tópicos de pesquisa mais desafiadores no campo farmacêutico. Lipossomas melhoram a permeação de fármacos e têm a possibilidade de funcionalização de sua superfície com diferentes ligantes, e suas características físico-químicas são promissores para a liberação no sistema nervoso central (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Lipossomas catiônicos são veículos mais eficientes para a liberação de fármacos no sistema nervoso central do que as neutras ou aniônicas. (JOSHI et al., 2014) A interação eletrostática entre as membranas celulares com carga negativa e lipossomas catiônicos aumenta a captação de lipossomos por adsorção de endocitose (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

A adição de polietilenoglicol (PEG) protege o lipossomo da ligação às proteínas plasmáticas, formando uma camada protetora na superfície e evitando o processo de opsonização e subsequente eliminação dos lipossomos. Então a PEGilação pode

prolongar o tempo de circulação no corpo (MILLA; DOSIO; CATTEL, 2012). Para melhorar a biodisponibilidade do fármaco no o sistema nervoso central, os lipossomas podem ser usado visando os receptores expressos nas células endoteliais do cérebro. A superfície dos lipossomas pode ser funcionalizada com agentes direcionadores que melhoram a afinidade e a seletividade dos lipossomas para administração do sistema nervoso central. Os ligantes alvo podem ser ligados covalentemente na superfície do lipossoma ou nas extremidades do PEG (LAI; FADDA; SINICO, 2013; LAJOIE; SHUSTA, 2015; NOBLE et al., 2014; SCHNYDER; HUWYLER, 2005). Outras propriedades podem ser incluídas nos lipossomas para o efeito específico do fármaco em resposta a estímulos como campo magnético, temperatura ou alterações no pH (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Os lipossomas são uma excelente ferramenta para tratamento distúrbios neurológicos, devido à sua capacidade de atravessar a BBB e fornecer eficientemente fármacos ao sistema nervoso central (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

3.6 Conclusão

A caquexia está associada a muitas condições crônicas, doenças infeciosas e observada em pacientes após lesões traumáticas extensas ou sepse. A caquexia resulta diminuição da qualidade de vida, aumento da mortalidade e maior suscetibilidade às toxicidades relacionadas ao tratamento da doença associada. Com um número crescente de indivíduos em estado caquético, associado a ausência de uma intervenção medicamentosa efetiva, conscientização sobre a caquexia e avanços no desenvolvimento de tratamentos são urgentemente necessários.

Entendemos que destacar abordagens práticas para o tratamento multimodal da caquexia e suas comorbidades é uma das ações mais importantes. No entanto, novas alternativas para a administração alvo de medicamentos, terapeuticamente eficácia e com segurança biológica, podem ser projetadas para reverter completamente os achados da síndrome caquética.

Os estudos considerados nessa revisão relataram que medicamentos baseados em ghrl são promissores e podem desempenhar um papel na melhoria da carga sintomática da caquexia. São necessários mais estudos para superar as limitações da administração de ghrl exógena e para determinar a utilidade desses medicamentos na melhoria do paciente frente a síndrome caquética.

O emprego de lipossomos carreadores de fármacos para atingir o sistema nervoso central ainda está restrito ao trabalho experimental inicial em modelos celulares e animais, poucos seguem o desenvolvimento pré-clínico, ou são estudados em ensaios clínicos em humanos. Por tanto, necessitam de estudos adicionais.

Ainda não há evidências suficientes para apoiar ou refutar o uso de ghrl em pessoas com caquexia. São necessários mais estudos que considerem vias de administração adequadas com foco apropriado na avaliação da segurança, eficácia.

Um sistema inteligente de gerenciamento de medicamentos para melhorar a biodisponibilidade da ghrl exógena em pessoas com caquexia, podem ser uma boa alternativa para superar as limitações apresentadas pela atual administração parenteral.

Estratégias utilizando sistemas de liberação de fármacos, como lipossomas, podem ser desenvolvidas para proteger a ghrl da sua instabilidade fisiológica e melhorar a permeação.

A via naso-cerebral se apresenta como uma boa alternativa para administração da ghrl, utilizando uma conexão direta entre o nariz e o cérebro, que pode possibilitar sua ação no sistema nervoso central

O desenvolvimento do tratamento da caquexia baseada em ghrl pode oferecer a oportunidade de atender às necessidades dos pacientes caquéticos. A via nasocerebral pode ser uma via fácil de adesão. No entanto, são necessários desenvolvimentos pré-clínicos e ensaios clínicos para estabelecer critérios para o uso de ghrl carreado por lipossomas e administração naso-cerebral no tratamento de caquexia

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, M. et al. Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier (BBB) for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 260, p. 61–77, 28 ago. 2017.
- ALAMRI, B. N. et al. The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 26, n. 1, p. 3–11, 2016.
- ALMGREN, M.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 174, n. 1–2, p. 3–21, 2000.
- ALVES, T. F. R.; CHAUD, M. V. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL E VEICULAÇÃO DE CURCUMINA**. [s.l: s.n.].
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.
- ASAKAWA, A. et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 337–345, 2001.
- ASHIZAWA, K. [Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS)]. **Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 139, n. 2, p. 237–248, 2019.
- BAI, Y. et al. Anamorelin for cancer anorexia-cachexia syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 5, p. 1651–1659, 10 maio 2017.
- BANG, S. H. et al. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 595–604, nov. 2011.
- BANGHAM, A. D. Properties and uses of lipid vesicles: an overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 308, n. 1, p. 2–7, 1978.
- BANSAL, V. et al. Vagal stimulation modulates inflammation through a ghrelin mediated mechanism in traumatic brain injury. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 214–220, 2012.
- BARACOS, V. E. et al. Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 2018.
- BARNADAS-RODRÍGUEZ, R.; SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1–2, p. 175–186, 1 fev. 2001.
- BAXA, U. Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. In: **Methods** in molecular biology (Clifton, N.J.). [s.l: s.n.]. v. 1682p. 73–88.

BERGMAN, H. et al. Understanding and meeting the needs of the older population: a global challenge. **Canadian geriatrics journal: CGJ**, v. 16, n. 2, p. 61–5, 2013.

BEZERRA, M. P.; RODRIGUES, L. N. C. Quality By Design (Qbd) Como Ferramenta Para Otimização Dos Processos Farmacêuticos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 1, p. 5, 2017.

BINN, M. et al. Ghrelin gastrokinetic action in patients with neurogenic gastroparesis. **Peptides**, v. 27, n. 7, p. 1603–1606, 2006.

BOURGANIS, V. et al. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, p. 337–362, 2018.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRIMIJOIN, S. et al. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. **Chemico-biological interactions**, v. 259, n. Pt B, p. 271–275, 25 nov. 2016.

BUSTAMANTE-MARIN, X. M.; OSTROWSKI, L. E. Cilia and Mucociliary Clearance. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 4, 3 abr. 2017.

CABRAL, A. et al. Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central Ghrelin: Critical role of brain accessibility. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 8, p. 542–554, 2014.

ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014.

CARR, D. J. J.; BLALOCK, J. E. Neuropeptide Hormones and Receptors Common to the Immune and Neuroendocrine Systems: Bidirectional Pathway of Intersystem Communication. **Psychoneuroimmunology**, p. 573–588, 1 jan. 1991.

CASETTARI, L.; ILLUM, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 189–200, 28 set. 2014.

CHATURVEDI, M.; KUMAR, M.; PATHAK, K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 215–22, out. 2011.

CHEN, J. A. et al. Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 6, n. 2, p. 132–43, 2015.

CHEYUO, C. et al. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. **Shock**, v. 35, n. 3, p. 258–

265, 2011.

COLLDÉN, G.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Therapeutic potential of targeting the ghrelin pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–29, 2017.

CROWE, T. P. et al. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sciences**, 2017.

CURROW, D. C.; SKIPWORTH, R. J. The emerging role of anamorelin hydrochloride in the management of patients with cancer anorexia-cachexia. **Future Oncology**, v. 13, n. 20, p. 1767–1783, 16 ago. 2017.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 18 maio 2018.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.

DEBOER, M. D. Update on melanocortin interventions for cachexia: Progress toward clinical application. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 146–151, 2010.

DEBOER, M. D. Ghrelin and cachexia: will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? **Molecular and cellular endocrinology**, v. 340, n. 1, p. 97–105, 20 jun. 2011.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1654–1673, abr. 2010.

DJUPESLAND, P. G.; MESSINA, J. C.; MAHMOUD, R. A. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 6, p. 709–733, 2014.

ERDŐ, F. et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 155–170, 1 out. 2018.

ESPOSITO, A. et al. Mechanisms of anorexia—cachexia syndrome and rational for treatment with selective ghrelin receptor agonist. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 9, p. 793–797, nov. 2015.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, dez. 2008.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 3, p. 173–8, set. 2013.

FDA. Liposome Drug Products. Chemistry, Manufacturing, and Controls. Human Pharmacokinetics and Bioavailability. Labeling Documentation. Guidance for Industry. **Chinese Journal of New Drugs**, v. 27, n. 16, p. 1835–1840, 2018.

- FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.
- FUJITSUKA, N.; UEZONO, Y. Rikkunshito, a ghrelin potentiator, ameliorates anorexia-cachexia syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 271, 10 dez. 2014.
- GARCIA, J. M. et al. Anamorelin for patients with cancer cachexia: an integrated analysis of two phase 2, randomised, placebo-controlled, double-blind trials. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 1, p. 108–16, 1 jan. 2015.
- GARIN, M. C. et al. The human experience with ghrelin administration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 5, p. 1826–1837, 2013.
- GAUNA, C. et al. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 1055–1060, 2005.
- GRAFF, C. L.; POLLACK, G. M. Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus. **Current drug metabolism**, v. 5, n. 1, p. 95–108, 2004.
- GRAUL, A. I.; STRINGER, M.; SORBERA, L. Cachexia. **Drugs of Today**, v. 52, n. 9, p. 519–529, 1 set. 2016.
- GUINDALINI, C. I.; CRUZ CDTS, O.; DE JANEIRO, R. Qualidade por concepção: uma nova abordagem para acelerar o desenvolvimento tecnológico e inovação na área da saúde Quality by design: A new approach to accelerate the technological development in health. **Resista Visa em debate**, v. 5, n. 1, p. 3–10, 2012.
- HASAN, M. et al. Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: study of lipid—polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. **RSC Advances**, v. 6, n. 51, p. 45290–45304, 9 maio 2016.
- HATANAKA, M. et al. Novel mechanism of ghrelin therapy for cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, n. 4, p. 393, 2015.
- HINNA, A. et al. Filter-extruded liposomes revisited: A study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 1, p. 11–20, 2 jan. 2016.
- HSU, T. M. et al. Hippocampus ghrelin signaling mediates appetite through lateral hypothalamic orexin pathways. **eLife**, v. 4, 2015.
- IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Administration strategies for proteins and peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 578–589, 30 dez. 2014.
- ICH. **Pharmaceutical Development Q8**ICH Harmon Tripart Guidel, , 2009. Disponível em: https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-

- single/article/pharmaceutical-development.html>. Acesso em: 29 jul. 2019
- ILLUM, L. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1–3, p. 187–198, 21 fev. 2003.
- ILLUM, L.; FARRAJ, N. F.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 8, p. 1186–9, ago. 1994.
- JAIN, A. K.; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 524–539, 4 dez. 2019.
- JOSHI, S. et al. Cationic surface charge enhances early regional deposition of liposomes after intracarotid injection. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 120, n. 3, p. 489–497, 7 dez. 2014.
- KAYS, J. K. et al. Three cachexia phenotypes and the impact of fat-only loss on survival in FOLFIRINOX therapy for pancreatic cancer. **Journal of Cachexia**, **Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 4, p. 673–684, 1 ago. 2018.
- KHAN, S. et al. Formulation of intranasal mucoadhesive temperature-mediated in situ gel containing ropinirole and evaluation of brain targeting efficiency in rats. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 3, p. 223–234, 2010.
- KHATIB, M. N. et al. Ghrelin for the management of cachexia associated with cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 50, 2018a.
- KHATIB, M. N. et al. Ghrelin as a promising therapeutic option for cancer cachexia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 2172–2188, 2018b.
- KISHIMOTO, I. et al. Ghrelin and cardiovascular diseases. **Journal of Cardiology**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 2012.
- KOCKISCH, S. et al. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: An in vitro evaluation of mucoadhesive potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 8, p. 1614–1623, 1 ago. 2003.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y. Ghrelin is a growth-hormone- releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, 1999.
- KUMAR, A.; PANDEY, A. N.; JAIN, S. K. Nasal-nanotechnology: Revolution for efficient therapeutics delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 681–693, 2016.
- KWON, J. et al. Participation of the central melanocortin system in metabolic regulation and energy homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2014.
- LAI, F.; FADDA, A. M.; SINICO, C. Liposomes for brain delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 7, p. 1003–1022, 2013.
- LAJOIE, J. M.; SHUSTA, E. V. Targeting Receptor-Mediated Transport for Delivery of Biologics Across the Blood-Brain Barrier. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 613–631, 6 jan. 2015.

- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 1 jun. 2018.
- LEAL, J.; SMYTH, H. D. C.; GHOSH, D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug deliveryInternational Journal of Pharmaceutics Elsevier B.V., , 30 out. 2017.
- LEE, K.-R. et al. Lack of a primary physicochemical determinant in the direct transport of drugs to the brain after nasal administration in rats: potential involvement of transporters in the pathway. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 25, n. 5, p. 430–41, 2010.
- LEGUISAMO, N. M. et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovascular Diabetology**, v. 11, p. 100, 16 ago. 2012.
- LI, Y. Sensory Signal Transduction in the Vagal Primary Afferent Neurons. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 2554–2563, 2007.
- LIN, T. C.; HSIAO, M. Ghrelin and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 51–57, 2017.
- MALIK, J. S.; YENNURAJALINGAM, S. Prokinetics and ghrelin for the management of cancer cachexia syndrome. **Ann Palliat Med.**, v. 8, n. 1, p. 80–85, 1 jan. 2019.
- MARIANECCI, C. et al. Drug delivery in overcoming the blood-brain barrier: Role of nasal mucosal grafting. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 325–335, 2017.
- MERKUS et al. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 29, n. 1–2, p. 13–38, 5 jan. 1998.
- MILLA, P.; DOSIO, F.; CATTEL, L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 1, p. 105–19, jan. 2012.
- MITTAL, D. et al. Insights into direct nose to brain delivery: Current status and future perspective. **Drug Delivery**, v. 21, n. 2, p. 75–86, 2014.
- MIYAKE, M. M.; BLEIER, B. S. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 29, n. 2, p. 124–127, 2015.
- MOELLER, E. H. et al. Stability, liposome interaction, and in vivo pharmacology of ghrelin in liposomal suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 13–18, 2010.
- MOLFINO, A. et al. Ghrelin: from discovery to cancer cachexia therapy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 5, p. 471–476, set. 2014.

- MORRISON, E. E.; COSTANZO, R. M. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v. 23, n. 1, p. 49–61, 1992.
- MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin and its potential in the treatment of eating/wasting disorders and cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 1, n. 2, p. 159–167, dez. 2010.
- MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 6, p. 437–460, 2015.
- MUSCARITOLI, M. et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and precachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 154–159, 2010.
- NAITO, T. Emerging treatment options for cancer-associated cachexia: A literature reviewTherapeutics and Clinical Risk ManagementDove Medical Press Ltd., , 2019.
- NASS, R. M. et al. Ghrelin and growth hormone: story in reverse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8501–8502, 2010.
- NISHI, Y. et al. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. **Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 2255–2264, 2005.
- NISINI, R. et al. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, 2018.
- NOBLE, G. T. et al. Ligand-targeted liposome design: Challenges and fundamental considerations. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 32–45, 2014.
- ÖSTH, K.; GRÅSJÖ, J.; BJÖRK, E. A New Method for Drug Transport Studies on Pig Nasal Mucosa Using a Horizontal Ussing Chamber. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1259–1273, maio 2002.
- PALLAGI, E. et al. Application of the QbD-based approach in the early development of liposomes for nasal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, p. 11–22, 2019.
- PAPAHADJOPOULOS, D.; KIMELBERG, H. K. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: Their properties and interactions with cholesterol and proteins. **Progress in Surface Science**, v. 4, p. 141–232, 1 jan. 1974.
- PAVAN, B. et al. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. **Molecules**, v. 13, n. 5, p. 1035–1065, 2008.
- PEREIRA, J. A. DA S.; DA SILVA, F. C.; DE MORAES-VIEIRA, P. M. M. The impact of ghrelin in metabolic diseases: An immune perspective. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p. 4527980, 2017.
- PHILIPPART, M.; SCHMIDT, J.; BITTNER, B. Oral Delivery of Therapeutic Proteins

- and Peptides: An Overview of Current Technologies and Recommendations for Bridging from Approved Intravenous or Subcutaneous Administration to Novel Oral Regimens. **Drug Research**, v. 66, n. 03, p. 113–120, 4 nov. 2015.
- PIRES, A. et al. Intranasal drug delivery: How, why and what for? **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 288–311, 2009.
- POHER, A. L.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Ghrelin regulation of glucose metabolism. **Peptides**, v. 100, p. 236–242, 1 fev. 2018.
- PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The sympathetic nervous response in inflammation. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 6, p. 504, 2014.
- PREGO, C.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Chitosan nanocapsules as carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan molecular weight and type of salt on the in vitro behaviour and in vivo effectiveness. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. Anais...set. 2006
- PRODAM, F.; FILIGHEDDU, N. Ghrelin Gene Products in Acute and Chronic Inflammation. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 5, p. 369–384, 2014.
- RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 2013.
- SAKURADA, T. et al. Comparison of the actions of acylated and desacylated ghrelin on acid secretion in the rat stomach. **Journal of Gastroenterology**, v. 45, n. 11, p. 1111–1120, 2010.
- SALADE, L. et al. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8531–8543, 2017.
- SALADE, L. et al. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 129, p. 257–266, 2018.
- SALEHI, A. et al. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: A study of isolated pancreatic islets and intact mice. **Regulatory Peptides**, v. 118, n. 3, p. 143–150, 2004.
- SAUPE, A.; GORDON, K. C.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 56–62, 11 maio 2006.
- SCHERBAKOV, N.; DOEHNER, W. Cachexia as a common characteristic in multiple chronic disease. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, p. 1189–1191, 2019.
- SCHIPPER, N. G.; VERHOEF, J. C.; MERKUS, F. W. The nasal mucociliary

- clearance: relevance to nasal drug delivery. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 7, p. 807–14, jul. 1991.
- SCHNYDER, A.; HUWYLER, J. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, p. 99–107, 2005.
- SELIM, Z. I. et al. Serum levels of ghrelin, adipokines, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with juvenile idiopathic arthritis in Assuit University Hospitals: Relation to nutritional status and disease activity. **Egyptian Pediatric Association Gazette**, v. 63, n. 2, p. 52–57, 2015.
- SHEWAN, L. G. An analysis of the types of recently published research in the field of cachexia. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 24, n. 16, p. 1759–1773, 2017.
- SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, set. 2017.
- SONVICO, F. et al. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 34, 15 mar. 2018.
- STEINMAN, J.; DEBOER, M. D. Treatment of Cachexia. Melanocortin and Ghrelin Interventions. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 92
- TORSELLO, A. et al. Novel domain-selective ACE-inhibiting activity of synthetic growth hormone secretagogues. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 4, p. 317–324, 2012.
- VESTERGAARD, E. T. et al. Acyl ghrelin induces insulin resistance independently of GH, cortisol, and free fatty acids. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5381–5414, 2016.
- VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014Journal of Cachexia, Sarcopenia and MuscleWiley Online Library, , 26 nov. 2014.
- WADELL, C.; BJÖRK, E.; CAMBER, O. Nasal drug delivery Evaluation of an in vitro model using porcine nasal mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 197–206, 1 fev. 1999.
- WANG, Y. et al. Vagal nerve regulation is essential for the increase in gastric motility in response to mild exercise. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 222, n. 2, p. 155–163, 2010.
- WONG, C. Y.; MARTINEZ, J.; DASS, C. R. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 9, p. 1093–1108, set. 2016.

- WU, R. et al. Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1697–E1702, dez. 2007.
- YANAGI, S. et al. The Homeostatic Force of Ghrelin. **Cell metabolism**, v. 27, n. 4, p. 786–804, 3 abr. 2018.
- YANG, S. et al. Norepinephrine-induced hepatocellular dysfunction in early sepsis is mediated by activation of α 2-adrenoceptors. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 4, p. G1014–G1021, out. 2001.
- YING, W. The nose may help the brain: intranasal drug delivery for treating neurological diseases. **Future Neurology**, v. 3, p. 1–4, 2008.
- YU, L. X. et al. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. **The AAPS Journal**, v. 16, n. 4, p. 771–783, 23 jul. 2014.
- YU, L. X.; WOODCOCK, J. FDA pharmaceutical quality oversight. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 2–7, 1 ago. 2015.
- ZHANG, H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 1522p. 17–22.
- ZHAO, T.-J. et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 16, p. 7467–7472, 2010.

CAPÍTULO II

4 ABORDAGEM QUALIDADE BASEADA EM PROJETO PARA DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CARREADORES DE PEPTIDEOS

4.1 Introdução

Para o desenvolvimento dos lipossomas carreadores de peptídeos, utilizamos a abordagem Qualidade Baseada em Projeto (*Quality by Design* – QbD). QbD é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de produtos, que tem com partida objetivos previamente definidos e enfatiza o produto, a compreensão dos processos e controle desses processos (ICH, 2009). Os objetivos terapêuticos, o desenvolvimento do produto e os processos de fabricação são projetados visando a qualidade esperada, de acordo com as expectativas previamente definidas (YU et al., 2014).

A abordagem tradicional para o desenvolvimento e fabricação de produtos geralmente envolve o uso de métodos empíricos, em especial no que diz respeito às relações existentes entre os processos e o produto, e entre o produto e seus aspectos clínicos. Ao contrário, QbD promove o entendimento profundo do produto e do processo de produção e estimula a construção da qualidade durante o processo, e não apenas testando-o no final (GUINDALINI; CRUZ CDTS; DE JANEIRO, 2012).

O conceito QbD atualmente está sendo conduzido pela Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH), entidade onde participam as agências regulatórias americana (Food and Drug Administratiom, FDA), europeia (European Medicines Agency, EMA) e japonesa (Japan Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan PDMA). A previsão teórica indicada pela QbD e a abordagem centrada no risco ajudam a conduzir uma atividade de pesquisa prática mais eficaz, adaptável mesmo nas fases iniciais dos desenvolvimentos farmacêuticos (CSÓKA; PALLAGI; PAÁL, 2018; PALLAGI et al., 2015).

Os peptídeos são cada vez mais reconhecidos como potenciais direcionadores para o desenvolvimento de novas terapias para uma variedade de doenças, incluindo câncer, caquexia, hepatite, reumatismo, doenças infecciosas, doenças autoimunes, AIDS e condições relacionadas (LAU; DUNN, 2018). A desvantagem para o uso terapêutico dos peptídeos é sua suscetibilidade a clivagem por enzimas, possuindo

baixa biodisponibilidade (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Consequentemente, estratégias utilizando sistemas de liberação de fármacos estão sendo desenvolvidas para proteger os peptídeos contra ataques enzimático (WONG; MARTINEZ; DASS, 2016). Os lipossomas podem ser utilizados como sistemas de liberação de fármacos para melhorar a biodisponibilidade de fármacos com baixa permeabilidade ou facilmente biodegradáveis (ÇAĞDAŞ; SEZER; BUCAK, 2014). Os lipossomas podem ainda ser funcionalizados na superfície para melhorar a farmacocinética e possuir a capacidade de distribuição direcionada de fármacos (AGRAWAL et al., 2017).

A incorporação dos peptídeos em lipossomas, associado a escolha de uma via de administração alternativa podem oferecer várias vantagens nas terapias utilizando peptídeos (IBRAHEEM; ELAISSARI; FESSI, 2014). Como agente ativo modelo para estudar a incorporação de peptídeos nos lipossomas, o peptídeo utilizado foi a grelina (ghrl).

Existem numerosos peptídeos terapêuticos eficazes que são administrados por vai parenteral, devido à biodisponibilidade inadequada por vias de não injeção (PHILIPPART; SCHMIDT; BITTNER, 2015). Levando em consideração que as vias de administração invasivas podem levar a uma baixa adesão do paciente e subsequente falha no tratamento, especialmente quando as administrações crônicas são necessárias, a via intranasal apresenta vantagens por ser uma forma não invasiva e indolor de administrar fármacos (SALADE et al., 2018).

No entanto, a via naso-cerebral tem várias limitações. No transporte naso-cerebral a capacidade de permeação está associada ao tamanho dos lipossomas, o que sugere que apenas estruturas com dimensões menores que 400 nm poderão ser transferidas (BOURGANIS et al., 2018). A faixa ideal de tamanho de partícula para administração nasal se o alvo for especificamente a via naso-cerebral é de 70-400 nm (PALLAGI et al., 2019; SONVICO et al., 2018). Outra limitação é que o muco na mucosa nasal é renovado a cada 15-20 minutos devido à secreção contínua de muco e atividade mucociliar. Portanto, se a força bioadesividade do produto for fraca, a meia-vida do ingrediente farmacêutico ativo é de 10 a 15 minutos, resultante da limitação da depuração mucociliar nasal (BUSTAMANTE-MARIN; OSTROWSKI, 2017).

Um dos objetivos da QbD é aumentar a capacidade do processo e reduzir a variabilidade do produto que geralmente leva a defeitos e rejeições do produto nas próximas etapas. Atingir esse objetivo requer produtos e processos robustos. Além

disso, um melhor entendimento do produto e do processo pode facilitar a identificação e o controle de fatores que influenciam a qualidade do medicamento. A QbD aprimora a capacidade de desenvolvimento, a velocidade e o design da formulação (YU et al., 2014).

Esta pesquisa visou definir o perfil de alvo, selecionar os fatores críticos, realizar uma avaliação de risco, realizar um planejamento fatorial, avaliar os resultados e selecionar as formulações otimizadas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

- Grelina (obtida de rato, composta por 28 aminoácidos e seu resíduo Ser3 é N- octanilado; pureza ≥ 97%, Sigma-Aldrich, USA)
- Fosfatidilcolina de soja (pureza ≥ 94%, LS100[®], Lipoid Kosmetik AG, Switzerland);
- Sal sódico de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi-(polietilenoglicol) 2000 (DSPE-PEG2000, Lipoid Kosmetik AG, Switzerland);
- Colesterol (NF, Dishman Group, India).
- Etanol PA 99% (Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda., Brazil)
- Tampão fosfato pH 5,9, isosmótico, contendo fosfato de sódio dibásico P.A. (Na₂HPO₄, Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda., Brazil), fosfato de sódio monobásico P.A (NaH₂PO₄, Labsynth Produtos Para Laboratorios LTDA., Brasil) e cloreto de sódio P.A. (Na Cl, Labsynth Produtos Para Laboratórios LTDA., Brasil);
- Quitosana de baixa massa molecular (75-85% desacetilada, 50,000-190,000 Da, Sigma-Aldrich, USA);
- As membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 50 e 100 nm (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama).

4.2.2 Produção de lipossomas

O método de produção por reidratação de filme lipídico (BANGHAM, 1978) foi selecionado para a preparação de lipossomas. Resumidamente, LS100, DSPE-PEG2000 e colesterol, na proporção 100:6:8% m/m, foram solubilizados em etanol sob agitação por 10 min. Após solubilização, a mistura foi transferida para um balão de fundo redondo. Com auxílio do evaporador rotativo (TE-211-Tecnal), o etanol foi evaporado à uma temperatura de 45°C com pressão regulada para 300mmHg por 20 min, ou até assegurar a formação do filme lipídico seco aderido na superfície do balão. Em seguida, o filme de lipídios foi hidratado com 10mL de tampão fosfato-salino, isosmótico (PBS - pH 5,9, 308 mOsm/L) contendo diferentes concentrações de ghrl (70, 105 ou 140μg/ml). As suspensões de lipossomas formados foram armazenados sob refrigeração a 5-8°C.

A técnica de produção reidratação do filme lipídico está ilustrado na Figura 4.

Etanol

PBS pH 5,9 + ghrl

Processamento de pós formação

PBS pH 5,9 + ghrl

Figura 4 - Representação esquemática da produção de lipossomas por reidratação de filme lipídico.

Fonte: elaboração própria.

Neste estudo foram testados dois métodos de processamento de pós formação: a extrusão e homogeneização de alta pressão.

Com auxílio do recurso do *software* Design Expert® versão 12.0.0 por Stat-Ease, Inc. (Suite 480, Minneapolis, MN, EUA), o equilíbrio entre as variáveis categóricas foi constrito, garantimos que cada processamento de pós formação recebesse um número igual de execuções no delineamento experimental.

O grupo de formulações selecionados para o processamento de pós formação de extrusão, foram extrudadas através de membranas de policarbonato (ZHANG, 2017). Os lipossomas multilamelares grandes (diâmetro varia de 200 a 1000 nm) foram extrudados através da extrusora com suporte/bloco de aquecimento (610000-1EA - Avanti Polar Lipids, Alabama, EUA) (Figura 5). O suporte/bloco de aquecimento foi mantido a 70±5 °C, apesar da temperatura elevada o tempo de contato é curto. As formulações passaram em ambos os sentidos subsequentemente, três vezes, em cada membrana com porosidade 0,1 µm (EMD Millipore).

Figura 5 - Extrusora com suporte/bloco de aquecimento.



Fonte: Avanti Polar Lipids, Inc. https://avantilipids.com/divisions/equipment-products

O grupo de formulações selecionados para o processamento de pós formação de homogeneização de alta pressão (2.20 - Homolab) (Figura 6) foram homogeneizados com duplo estágio. As suspensões iniciais de lipossomas foram processadas com um homogeneizador de alta pressão (Homolab 2.20 - FBF ITALIA Srl, Italy) no modo de não recirculação. A pressão de entrada do homogeneizador foi ajustada para 1000 bar e foram realizados 3 ciclos (número de vezes que as amostras foram processadas).

Figura 6 - Homogeneizador de alta pressão com duplo estágio de homogeneização.



Fonte: FBF do Brasil. http://fbfdobrasil.com.br/produto/homogeneizadores-de-laboratorio/

Após os procedimentos de pós formação, os lipossomas foram revestidos com quitosana. Por possuir característica catiônica, a quitosana foi escolhida, pois interage eletrostaticamente com estas cargas aniônicas na superfície da mucosa, diminuindo a limitação da depuração mucociliar nasal.

Para preparação da solução de quitosana foram preparadas três diferentes concentrações (1, 3 e 5 mg/mL) em ácido acético 0,1N. A dispersão foi agitada durante

4 horas para obter a solução final homogênea e transluzente. Então, 9 mL da suspensão de lipossomas foram revestidos com 1mL da dispersão de quitosana (nas concentrações preparadas de 1, 3 ou 5 mg/mL), a qual as suspensões de quitosana foram adicionados gota a gota, sob agitação constante, para obter uma diluição 10 vezes maior que a dispersão inicial de quitosana. Resultando em lipossomas revestidos com diferentes concentrações de quitosana (0,1; 0,3 e 0,5 mg/mL). As dispersões de lipossomas revestidos foram deixadas sob agitação constante em diferentes tempos (2h, 8h e 24 horas) e depois armazenada na temperatura entre 5-8°C. A representação esquemática do revestimento de quitosana é ilustrado na Figura 7.

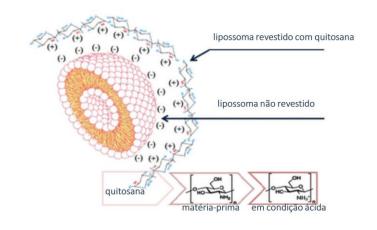


Figura 7 - Representação esquemática dos lipossomas revestidos com quitosana.

Fonte: Adaptado de BANG et al. (2011)

4.2.3 Qualidade Baseada em Projeto: Otimização da formulação

Neste estudo, como procedimento característico da QbD, definimos Perfil alvo do Produto (Quality Target Product Profile, QTPP); identificamos os Atributos Críticos do Material (Critical Material Atributes, CMA) e Parâmetros Críticos do Processo (Critical Process Parameters, CPP) e, consequentemente, os Atributos Críticos da Qualidade (Critical Quality Attributes, CQA).

Para o controle da qualidade no desenvolvimento dos lipossomas carreados com peptídeos foram utilizadas as ferramentas de: Avaliação do Risco inicial; Delineamento experimental (Design of Experiments – DoE) e as Técnicas Analíticas de Processo (Process Analytical Techniques, PAT) (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; ICH, 2009).

Como ponto de partida da abordagem QbD, foi definido o QTPP do produto lipossomal e seus critérios de qualidade. A seleção dos QTPPs baseia-se nos requisitos que permitem que o produto seja projetado com as características necessárias para atingir os objetivos terapêuticos. Para obter os QTPP foram pesquisadas na literatura e avaliados os fatores necessários para obter o produto alvo.

O segundo passo é a seleção dos fatores que têm efeitos críticos sobre a qualidade do produto alvo. A seleção desses parâmetros é baseada em conhecimento prévio e experiências anteriores. A seleção de um fator como um CQA sempre depende dos objetivos predefinidos, da qualidade esperada do produto e das necessidades terapêuticas.

Os CMAs e os CPPs, que são os fatores relacionados aos materiais e aos métodos e processos de produção selecionados, respectivamente, também foram identificados nessa etapa. Os CMAs e CPPs são atributos e parâmetros que afetam e altera os CQAs da formulação final.

Os CMAs e os CPPs estão descriminados no diagrama de causa e efeito (Ishikawa), esse diagrama também foi utilizado para a avaliação de risco, selecionando assim os CQAs mais influentes.

O DoE foi utilizado na etapa subsequente como ferramenta de QbD. O DoE é a forma em que os fatores (variáveis independentes) são atribuídos aos experimentos.

O estudo foi realizado usando um L-optimal Design (também chamado IV ou variância integrada) que fornece uma variância de previsão média considerando a combinação do fator categórico com fatores numéricos. L-optimal é desejável para métodos de superfície de resposta onde a previsão é importante. O algoritmo escolhe o ponto que minimiza a integral da variação entre o espaço de design.

Em estatística, a metodologia de superfície de resposta explora a relação entre as variáveis independentes e as variações das respostas. O método foi introduzido por George EP Box e KB Wilson (1951). Na metodologia de superfície de resposta uma sequência de experimentos projetados é usada para obter uma resposta ótima.

O delineamento apresentado nesse estudo envolve um fator categórico e três fatores numéricos. Os fatores numéricos foram ajustados nos níveis -1 (baixo), 0 (médio) e +1 (alto), dentro da faixa adequada determinada na avaliação de risco inicial. Auxiliado por um recurso do *software* que força o equilíbrio, garantimos que cada fator categórico receba um número igual de execuções de experimentos.

Tendo como finalidade encontrar os principais parâmetros relevantes aos CQAs. Os fatores experimentais foram investigados através de uma matriz de delineamento de 24 experimentos, com 2 repetições de ponto central e 2 pontos para avaliar a falta de ajuste no modelo de regressão. Assim, um desenho experimental foi construído para estudar a influência das CMAs e CPPs nas propriedades CQAs. O DoE foi desenvolvido usando o *software* o Design Expert® versão 12.0.0 por Stat-Ease, Inc. (Suite 480, Minneapolis, MN, EUA).

4.2.4 Técnicas Analíticas de Processo

O tamanho de partícula, o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta foram determinados usando um analisador de partículas (ZetaPALS, modelo NanoBrook 90PlusPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville NY, E.U.A). O espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS) foi utilizado para determinação do tamanho de partículas e a análise de fase de dispersão de luz (PALS) para determinação da carga superficial. O analisador de partículas não apenas permite a medida do tamanho de partícula e potencial zeta da amostra, como também informações de distribuições nos resultados para amostras polidispersas.

Para a determinação, as partículas foram diluídas em água ultrapura (1:30), e homogeneizadas. As medidas foram realizadas na temperatura de 25°C, a um ângulo de espalhamento de luz em 90° e potencial zeta em 15°. Os testes foram realizados em triplicata de análise.

Para determinar a eficiência de encapsulação de ghrl dos lipossomas, a suspensão lipossomal foi centrifugada 15.000 rpm através de tubos de centrífuga (Sorvall ST 16 - Thermo Scientific) durante 30 min à 5°C. Adicionalmente, uma solução PBS pH 5,9 contendo ghrl foi centrifugada para confirmar a não sedimentação da ghrl livre.

A quantidade foi determinada pelo método de Bradford (1976). A interação entre o reagente de Bradford e a proteína, estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. O sobrenadante que continha ghrl livre foi separado e lipossomas sedimentados. Os quais foram dissolvidos em reagentes de Bradford. Após a solubilização dos lipossomas no reagente a ghrl que estava encapsulada foi liberada e quantificada.

A eficiência de encapsulação (EE) de ghrl nos lipossomas foi calculada utilizando a seguinte equação (1):

A construção da curva analítica para proteínas foi realizada entre as concentrações de 0,8-80µg/mL. As amostras foram analisadas por espectroscopia UV - visível utilizando o comprimento de onda de 595nm.

4.2.5 Análise de resposta para otimização

Gráficos de superfície de resposta tridimensional foram obtidos usando o software para ilustrar o efeito de fatores selecionados (variáveis independentes) nas respostas (variáveis dependentes).

As equações para cada variável independente foram geradas usando os valores de seus coeficientes. A equação (2) tem como forma geral a seguinte estrutura:

$$CQA = a + b*[ghrl] + c*[ch] + d*tempo + e*postf$$
 (2)

Onde, CQA = atributo crítico da qualidade; a = constante característica de cada CQA; b = coeficientes da concentração de ghrl; c = coeficiente da concentração de quitosana; d = coeficiente do tempo de revestimento; e = coeficiente do processamento de pós formação; [ghrl] = concentração de ghrl; [ch] = concentração de quitosana; tempo = tempo de revestimento; postf = processamento de pós formação.

As equações polinomiais geradas por *software* podem prever o efeito de fatores individuais (variáveis independentes), bem como combinações de fatores nas respostas (variáveis dependentes). A equação em termos de fatores codificados pode ser usada para fazer previsões sobre a resposta para determinados níveis de cada fator. A equação codificada é útil para identificar o impacto relativo dos fatores, comparando os coeficientes dos fatores.

A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada às respostas obtidas.

4.2.6 Seleção da formulação otimizada

As restrições estabelecendo os objetivos de tamanho (mínimo), IPD (mínimo), potencial zeta (máximo) e EE (máximo) foram aplicadas nas variáveis dependentes e a formulação otimizada com o maior fator de desejabilidade estatística foi selecionada pelo *software* por técnica numérica.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Produção de lipossomas

Os lipossomas foram sintetizados pela técnica de hidratação por película fina ou o método de Bangham (1978). Uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a produção de lipossomas. Neste método o fármaco a ser carreado pode ser incluído no meio aquoso (para fármacos hidrofílicos) ou no filme lipídico (para fármacos lipofílicos). Porém, esse método produz vesículas multimalelares grandes (diâmetro varia de 200 a 1000 nm) e não homogêneas (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Para garantir as propriedades desejadas de tamanho, uniformidade de tamanho e lamelaridade foi necessário realizar processamentos após a formação das vesículas lipossomais.

4.3.2 Qualidade Baseada em Projeto: otimização da formulação

A implementação do conceito QbD envolve elementos e ferramentas. Os elementos da QbD buscam direcionar os objetivos do processo. As ferramentas do QbD visam monitorar da qualidade por meio do controle sistemático das variáveis envolvidas no processo (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; ICH, 2009)

O primeiro elemento o QTPP é representado pelo conjunto de atributos do produto relacionados às características necessárias para atingir os objetivos terapêuticos (BEZERRA; RODRIGUES, 2017). Assim, foram identificados os QTPP, definidos os alvos e as justificativas (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil do Produto Alvo da Qualidade (QTPP) do produto lipossômico carreador de

grelina.		`	, ,
PARÂMETRO QTPP		ALVO	JUSTIFICATIVA
Efeito terapêutico		Alcançar o tecido cerebral (no caso deste fármaco modelo, o alvo potencial é o tratamento da caquexia)	Transporte direto ou axonal do fármaco pela via naso-cerebral, em vez da rota através da barreira hematoencefálica (CROWE et al., 2017)
Via de administração		Via intranasal	A via nasal oferece acesso direto ao sistema nervoso central. (ERDŐ et al., 2018)
Forma de dosagem		Suspensão líquida	O uso da forma líquida da formulação lipossômica oferece um método confortável para a administração do medicamento na cavidade nasal. (ILLUM, 2003)
Atributos físicos	Tamanho das partículas	~100nm	A faixa ideal de tamanho de partícula para administração nasal se o alvo for especificamente a via naso-cerebral é de 70-400 nm (PALLAGI et al., 2019; SONVICO et al., 2018)
	Índice de polidispersão	<0,3	Em aplicações de administração de nano lipossomas, um IPD de 0,3 e abaixo é considerado aceitável e indica uma população homogênea de vesículas de fosfolipídios. (DANAEI et al., 2018)
	Potencial zeta	> (+)20mV	Nano carreadores catiônicos são veículos mais eficientes para a entrega de medicamentos ao cérebro devido às interações eletrostáticas.(VIEIRA; GAMARRA, 2016) A quitosana é o polímero catiônico dominante usado para interagir eletrostaticamente com as cargas negativas do muco. (CHATURVEDI; KUMAR; PATHAK, 2011)
	pH	4,5-6,5	O pH ótimo da preparação se ajusta ao pH normal do ambiente nasal. O valor de pH adequado garante conforto durante a aplicação e determina a qualidade e a eficácia in vivo do produto. (KUMAR; PANDEY; JAIN, 2016)
Estabilidade		60 dias	A estabilidade de tamanho dos lipossomas, uniformidade e carga de superfície preparados está ligada à eficácia e qualidade da preparação.

Fonte: elaboração própria.

Na etapa seguinte, de acordo com o desenvolvimento da formulação segundo a abordagem QbD, os CQAs foram identificados.

Os CQA são propriedade ou característica que deve estar dentro de um limite, faixa ou distribuição apropriada para garantir a qualidade desejada do produto (ICH, 2009). Os CQA determinam o QTPP e, portanto, estão intimamente relacionadas com o desempenho clínico do produto (YU; WOODCOCK, 2015).

No presente estudo, o tamanho lipossomal (Y₁), índice de polidispersão (Y₂), potencial zeta (Y₃) e eficiência de encapsulação (Y₄) foram identificados como CQAs do produto final. Os objetivos para cada CQA analisados, visando garantir a qualidade do produto.

É relevante observar que se fossem considerados todos os CQAs de um processo, estes seriam um obstáculo a fase experimental da investigação devido ao grande número de experimentos para comprovar a relação entre eles e as varáveis do processo. Assim a ferramenta de avaliação de risco foi utilizada para priorizar os CQA mais relevantes no desenvolvimento do produto lipossomal, com base nas características definidas no QTPP dos lipossomas.

Os CMAs e os CPPs estão descriminados no diagrama de causa e efeito (Ishikawa), esse diagrama também foi utilizado para a avaliação de risco, selecionando assim os CQAs mais influentes (Figura 8).

REIDRATAÇÃO REVESTIMENTO MATERIAIS grelina pH solução ácida tempo de mistura LS100 temperatura tempo de dispersão colesterol quitosana tempo de secagem tempo de mistura etanol Tamanho, IPD, potencial zeta e EE número de número de extrusões homogeneizações poro da membrana pressão II pressão l temperatura **EXTRUSÃO** HOMOGEINIZAÇÃO

Figura 8 - Diagrama de Ishikawa com os Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do Processo (CPP) identificados e análise de riscos na produção de lipossomas carreadores de peptídeos.

IPD: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação; LS100: fosfatidilcolina de soja Fonte: elaboração própria.

Os CMA, representado pelas matérias-primas, são uma fonte de variação no processo de fabricação. Outras variáveis são os parâmetros do processo, quando um parâmetro tem papel significativo na qualidade do produto fabricado, este é identificado pela abordagem QbD como um CPP. (ICH, 2009).

As variáveis CQAs são dependentes das CMAs e CPPs. Definimos essa dependência como função, nesse caso, as CQAs estão em função das CMAs e CPPs.

Após a análise de risco utilizando o diagrama e estudos preliminares, dois CMAs foram identificados: concentração de grelina ([ghrl] - X_1), concentração de quitosana ([ch] - X_2), e dois CPPs: tempo de revestimento (X_3) e método de pós processamento (X_4).

Para análise de risco, os CMAs e CPPs selecionados, foram classificados em uma estimativa de três graus de interdependência: alta, média ou baixa, a fim de afetar os CQAs (Tabela 2).

Tabela 2 - Analise de risco relacionado aos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do Processo (CPP) com impacto estimado nos Atributos Críticos de Qualidade (CQA).

	Impa	cto Rela	Faixa adequada		
Variáveis	tamanho	IPD	Potencial EE zeta		
CMAs					
Concentração de grelina (µg.mL-1)	média	média	baixa	alta	70-140
Concentração de quitosana (% m/m)	alta	média	alta	baixa	0,1-0,5
CPPs					
Tempo de revestimento (horas)	média	baixa	alta	baixa	2-24
Pôs processamento	alta	alta	baixa	baixa	Homogeneização ou extrusão

IPD: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação. Fonte: elaboração própria.

O DoE é uma parte integrante da abordagem do QbD, que envolve o uso do software para gerar tabelas de dados estruturadas. O software permite obter uma interpretação gráfica dos resultados e efeitos de cada parâmetro nos CQAs da formulação.

Utilizando as variáveis selecionadas na análise de risco a matriz de desenho experimental é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis independentes e dependentes do Delineamento experimental (Design of Experiments – DoE) avaliadas para o desenvolvimento de lipossomas.

Nível usado				
Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)		
70	105	140		
0,1	0,3	0,5		
2	8	24		
Nível 1 Nível 2		ível 2		
Homogene	nogeneização Extrusão			
	Objetivo			
	Mínimo			
Mínimo				
Máximo				
Máximo				
	70 0,1 2 Nível 1	Baixo (-1) Médio (0) 70 105 0,1 0,3 2 8 Nível 1 N Homogene:zação Objetivo Mínimo Mínimo Máximo		

Fonte: Elaboração própria.

As 24 formulações foram preparadas, analisadas e os valores obtidos das variáveis dependentes para cada execução (Tabela 4).

Tabela 4 – Delineamento experimental (Design of Experiments – DoE) e dados da Análise de

	Resposta.							
Corrida	[ghrl]	[ch]	Tempo	Posf	Tamanho	IPD	Zeta	EE
	(µg.mL ⁻¹)	(% m/m)	(horas)		(nm)		(mv)	(%)
1	70	0,5	2	homo.	170,72	0,294	42,7	52,8
2	105	0,5	8	homo.	181,54	0,277	48,3	52,5
3	70	0,1	2	homo.	70,25	0,272	10,88	53,7
4	140	0,3	24	homo.	91,87	0,263	51,3	41,7
5	140	0,1	8	extrusão	181,4	0,147	7,64	41,9
6	105	0,5	2	extrusão	284,76	0,164	48,3	51,9
7	70	0,3	2	extrusão	135,97	0,157	39,9	53,4
8	105	0,3	8	extrusão	145,76	0,18	47,7	52,3
9	105	0,5	24	extrusão	294,34	0,152	56,4	51,5
10	70	0,1	24	extrusão	160,45	0,173	33,7	53,5
11	105	0,1	2	homo.	74,57	0,286	7,2	51,9
12	140	0,5	8	extrusão	299,7	0,186	42,4	41,6
13	70	0,1	8	extrusão	157,34	0,194	8,77	53,9
14	105	0,1	8	homo.	84,24	0,289	9,63	51,4
15	105	0,5	8	homo.	212,14	0,274	44,6	51,8
16	140	0,3	24	homo.	92,77	0,289	50,4	41,8
17	105	0,1	8	homo.	83,82	0,266	7,9	51,9
18	105	0,3	8	extrusão	173,34	0,15	36,3	51,7
19	70	0,3	24	homo.	93,9	0,298	52,8	52,4
20	140	0,3	2	homo.	79,76	0,297	40,9	40,9
21	105	0,3	8	extrusão	170,29	0,13	35,6	52
22	140	0,3	2	extrusão	179,55	0,143	41,5	41,7
23	70	0,1	2	extrusão	146,79	0,137	8,77	53,7
24	70	0,5	8	extrusão	294,33	0,158	43,3	53,8

[ghrl]: concentração de grelina; [ch]: concentração de quitosana; posf: processamento de pós formação; IPD: índice de polidispersão; Zeta: potencial zeta; EE: eficiência de encapsulação; homo.: homogeneização.

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3 Análise de resposta para otimização

Ao ajustar os dados de resposta resultantes para vários modelos (linear, interação de dois fatores, quadrático e cubico) verificou-se que as respostas para tamanho, potencial zeta e EE foram melhor explicadas pelo modelo quadrático, enquanto o IPD foi melhor explicado pelo modelo linear. Na tabela 5 são apresentados os resumos das respostas, com valores máximos e mínimos, media e desvio padrão e modelo selecionado.

Tabela 5 - Resumos das respostas, com valores máximos e mínimos, média e desvio padrão, além do modelo estatísticos selecionado.

Resposta	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Modelo
Tamanho (nm)	70,25	299,7	160,82	±73,25	Quadrático
IPD	0,13	0,298	0,216	±0,065	Linear
Potencial zeta (mV)	7,2	56,4	34,04	±17,46	Quadrático
EE (%)	40,9	53,9	49,82	±4,91	Quadrático

IPD: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação. Fonte: elaboração própria.

Tamanho

O tamanho de qualquer nanopartícula é um parâmetro crucial, pois tem grandes impactos no desempenho, na capacidade de direcionamento e no destino do fármaco no organismo (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Além disso, no nosso estudo, o revestimento dos lipossomas também foi feito, aumentando o tamanho dos lipossomas inicialmente formado (BANG et al., 2011).

Os 4 fatores estudados (concentração de grelina, concentração de quitosana, tempo de revestimento e método de pós processamento), tiveram impacto no tamanho lipossomal (Figura 9).

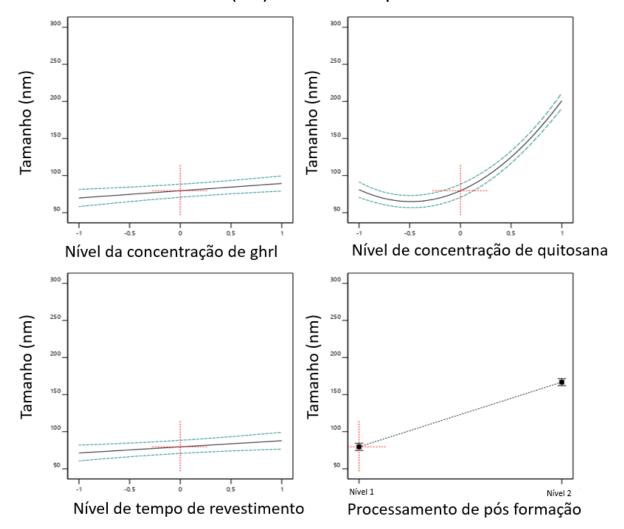


Figura 9 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do Processo (CPP) no tamanho dos lipossomas.

Fonte: Elaboração própria.

A equação em termos de fatores codificados foi usada para fazer previsões sobre a resposta de cada fator.

A equação (3) representa o efeito dos CMAs/CPPs no tamanho dos lipossomas:

Tamanho =
$$123,196 + 9,76769*[ghrl] + 59,9395*[ch] + 8,26868*tempo + 43,6249*postf + 61,4275*[ch]2 (3)$$

Onde, os CMAs/CPP são: [ghrl] = concentração de ghrl; [ch] = concentração de quitosana; tempo = tempo de revestimento; postf = processamento de pós formação.

Os coeficientes dos CMAs/CPPs demostram o quanto aquele CMA ou CPP influencia no tamanho lipossomal.

A equação codificada é útil para identificar o impacto relativo de cada fator, comparando os coeficientes dos fatores. O maior valor do coeficiente de concentração de quitosana (+ 59,9395) indica que essa é a variável que mais influência no tamanho dos lipossomas, seguida pelo processamento de pós formação, com coeficiente de + 43,6249.

Os termos lineares dos CQAs têm um efeito positivo no tamanho. Assim, tamanho dos lipossomas aumenta com o aumento do tempo de revestimento e das concentrações de quitosana e grelina e, comparando os níveis da variável categórica, a extrusão (nível 2) resulta em lipossomas maiores do que a homogeneização (nível 1).

No estudo de Salade e seus colaboradores (2017), foi realizado o revestimento dos lipossomas carreadores de ghrl com 1 % (m/m) de quitosana. Esse estudo mostrou um aumento (21,6%) na média dos tamanhos em comparação com os lipossomas sem revestimento, reforçando a influência dessa variável no tamanho lipossomal.

As interações entre a ghrl e os lipossomas foram evidentes a partir das alterações no tamanho observadas na adição da grelina, como também obeservado em outros estudos (MOELLER et al., 2010; SALADE et al., 2017).

O tamanho, para homogeneização, variou de 70,25 a 212,14nm, com média 112,33±48,77nm. Enquanto para extrusão variou de 135,97 a 299,70 nm, com média 201,85±64,87. Como o objetivo foi obter o mínimo valor de tamanho a variável categórica de homogeneização é mais efetiva em reduzir o tamanho dos lipossomas.

Os processamentos de pós formação são cruciais para obtenção dos lipossomas com tamanho desejado. Mesmo nas condições mínimas de pressão, a homogeneização causa uma variação importante do tamanho dos lipossomas (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001).

O controle de volume, da pressão e do o número de ciclos na produção de lipossomas com um homogeneizador de alta pressão tornam o processo controlável e torna este método ideal para grandes escalas de produção (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001).

A resposta de superfície é apresentada no gráfico 3D (Figura 10), apresentando o efeito da concentração de quitosana e grelina no tamanho dos lipossomas.

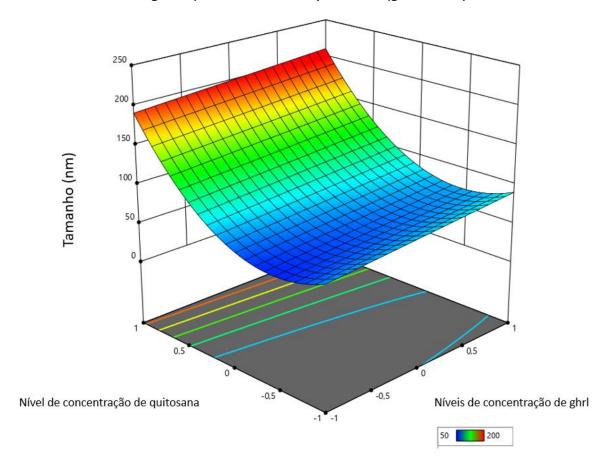


Figura 10 - Efeito de combinações de dois fatores (concentração de quitosana e grelina) no tamanho dos lipossomas (gráficos 3D).

Índice de polidispersão

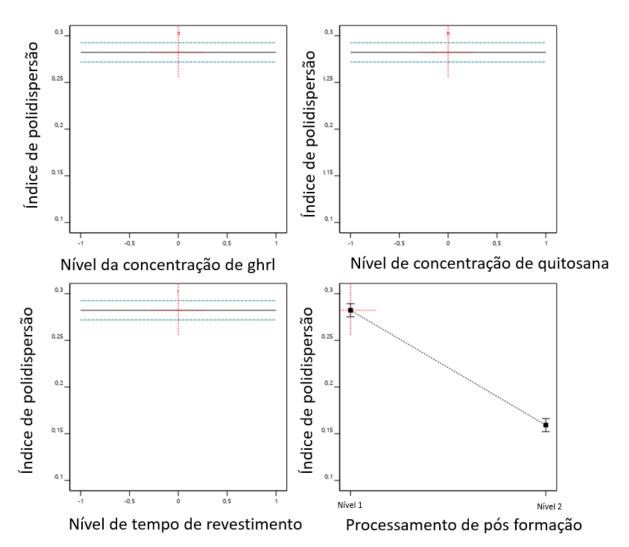
O PDI é uma representação da distribuição das populações de tamanho em uma determinada amostra.

Em aplicações de administração de fármacos usando transportadores baseados em lipídios, como formulações de lipossomas e nanolipossomas, uma PDI de 0,3 ou abaixo é considerada aceitável e indica uma população homogênea de vesículas de fosfolipídios (DANAEI et al., 2018).

O "Guidance for Industry" do FDA sobre medicamentos lipossômicos (FDA, 2018) enfatiza a importância do tamanho e distribuição do tamanho como CQAs, bem como componentes essenciais dos estudos de estabilidade desses produtos.

A variável que teve influência no IPD foi o processamento de pós formação (Figura 11).

Figura 11 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do Processo (CPP) no índice de polidispersão dos lipossomas.



A equação (4) representa o efeito do CPP no IPD dos lipossomas:

$$PDI = 0.22079 - 0.0614825*postf$$
 (4)

Onde, o CPP é: postf = processamento de pós formação.

O coeficiente do CPP demostra quatitativamente o quanto esse CPP influencia no IPD.

O processamento de pós formação foi a única variável estudada que teve influência no IPD.

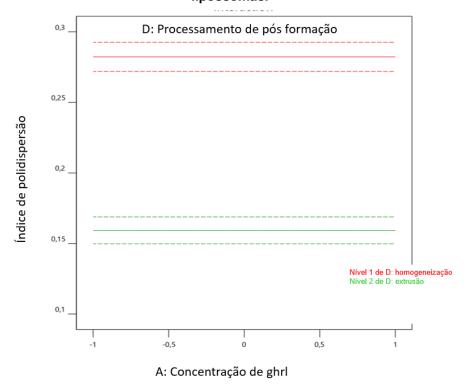
O valor negativo do coeficiente de postf na equação acima sugerem que comparando os níveis da variável categórica, a extrusão (nível 2) resulta em IPD menor do que a homogeneização (nível 1).

A extrusão apesar de obter uma média maior no tamanho dos lipossomas, obteve lipossomas com distribuição de tamanho mais uniformes (Figura 12). O IPD médio, para extrusão, variou de 0,130 a 0,194, com média 0,159±0,019. Enquanto para homogeneização variou de 0,263 a 0,298, com média 0,282±0,012.

As amostras extrudadas apresentaram mais uniformidade em relação ao tamanho das partículas, mas as amostras tratadas com homogeneizador obtiveram uma distribuição de tamanho dentro dos limites aceitáveis (menor que 0,3).

O pós processamento de extrusão é eficiente para preparar lipossomas com distribuição de tamanho bastante estreita, por sem um método de passagem sequencial através de membrana com de tamanho de poros definido (HINNA et al., 2016).

Figura 12 - Efeito do processamento de pós formação no índice de polidispersão dos lipossomas.



Fonte: Elaboração própria.

Potencial zeta

Os valores de potencial zeta fornecem informações sobre o caráter e a funcionalidade da superfície e têm grande significado no campo de lipossomas e nanomateriais. (SMITH et al., 2017)

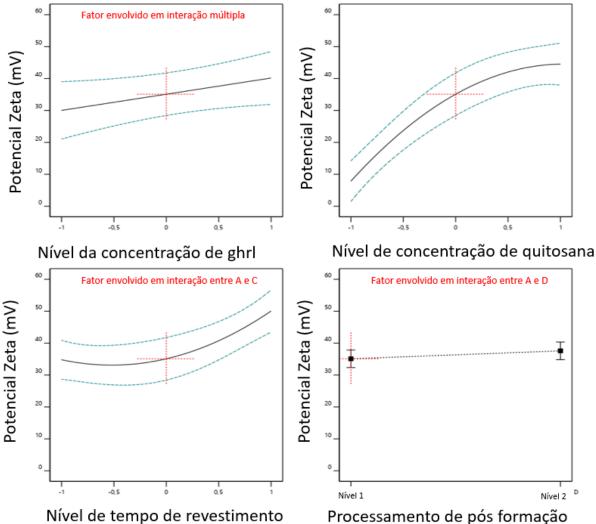
O aumento do potencial zeta foi atribuído aos grupos catiônicos adsorvidos à superfície lipossômica. Como a quitosana carregava uma carga positiva alta, a adsorção de quitosana nos lipossomas aumentou a densidade da carga positiva e levou a um valor potencial zeta positivo.

O potencial zeta indica a estabilidade dos sistemas: à medida que o potencial aumenta, a repulsão entre as partículas é maior, levando a dispersões coloidais mais estáveis. Se todas as partículas na suspensão tiverem um grande potencial zeta negativo ou positivo, elas se repelirão, e não haverá tendência para as partículas se agregarem (HASAN et al., 2016)

O potencial zeta do lipossoma sem revestimento de quitosana era negativo de -29,90±7,76 mV e potencial zeta do lipossoma revestido foi para 50,3 ±1,46 mV positivo.

Os 4 fatores estudados (concentração de grelina, concentração de quitosana, tempo de revestimento e método de pós processamento), tiveram impacto no potencial zeta (Figura 13).

Figura 13 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do Processo



Fonte: Elaboração própria.

A equação (5) representa o efeito dos CMAs/CPPs no potencial zeta dos lipossomas:

Potencial zeta =
$$36,334 + 1,4574*[ghrl] + 18,3276*[ch] + 7,62214*tempo$$

+ $1,24225*postf + -4,82753*[ghrl]*tempo - 3,60853*[ghlr]*postf$
- $8,90764*[ch]^2 + 7,3319*tempo^2$ (5)

Onde, os CMAs/CPP são: [ghrl] = concentração de ghrl; [ch] = concentração de quitosana; tempo = tempo de revestimento; postf = processamento de pós formação; [ghrl]*tempo = interação

entre concentração de ghrl e o tempo de revestimento; [ghlr]*postf = interação entre concentração de ghrl e o processamento de pós formação.

Os coeficientes dos CMAs/CPPs demostram o quanto aquele CMA ou CPP influencia no tamanho lipossomal. As interações entre os fatores também são demonstradas na equação, apresentando os coeficientes das interações dos CMAs/CPPs.

O valor do coeficiente de concentração de quitosana (+ 18,3276) indica que essa é a variável que mais influência no potencial zeta dos lipossomas, seguida pelo tempo de revestimento, com coeficiente de + 7,62214.

A carga de superfície é de grande importância para prolongar o tempo de permanência e a estabilidade da ghrl na cavidade nasal (SALADE et al., 2018). Por possuir característica catiônica, a quitosana interage eletrostaticamente com estas cargas aniônicas na superfície da mucosa, diminuindo a limitação da depuração mucociliar nasal (KOCKISCH et al., 2003).

A influência da concentração de ghrl é um fator envolvido em múltiplas interações, associando suas influencias com o tempo de revestimento e com o processamento de pós formação.

A ghrl também apresenta características catiônicas, que envolvem na mudança do potencial zeta dos lipossomas após a adição de ghrl.

Os lipossomas, mesmo carreados com ghrl, ainda possuem a carga resultante aniônica o que possibilita o revestimento com a quitosana, graças à atração eletrostática. Essas características também foram observadas no estudo de Salade e seus colaboradores (2017).

A resposta de superfície é apresentada no gráfico 3D (Figura 14), apresentando o efeito da concentração de quitosana do tempo de revestimento no potencial zeta dos lipossomas.

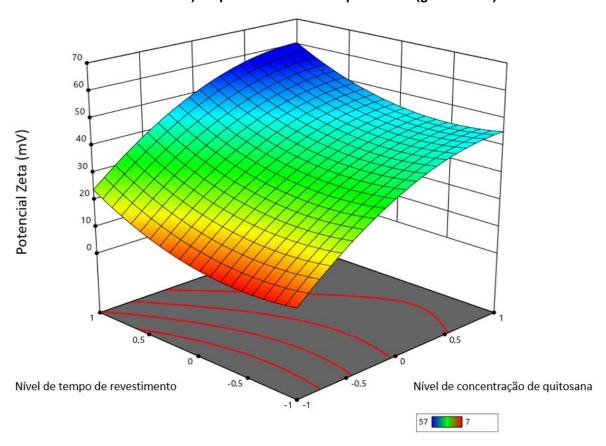


Figura 14 - Efeito de combinações de dois fatores (concentração de quitosana e tempo de revestimento) no potencial zeta dos lipossomas (gráficos 3D)

Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação é um CQA muito importante tendo em vista que quando o EE é aumentado, menos os peptídeos são potencialmente expostos à degradação enzimática nasal.

A variável que teve influência na eficiência de encapsulação foi a concentração de ghrl (Figura 15).

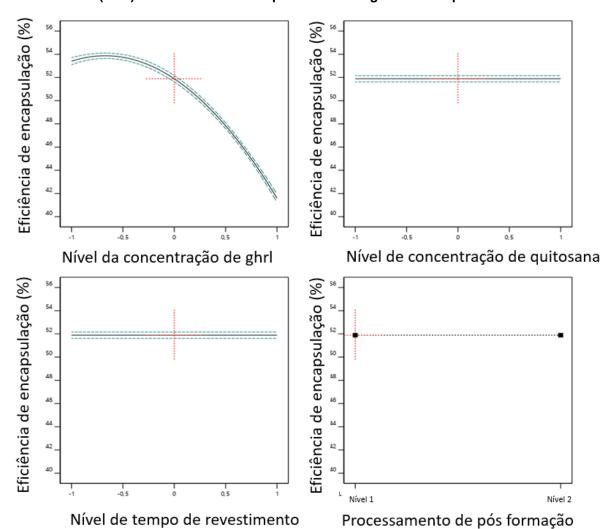


Figura 15 - Efeito dos Atributos Críticos do Material (CMA) e Parâmetros Críticos do Processo (CPP) na eficiência de encapsulamento da grelina nos lipossomas.

A equação (6) representa o efeito do CMA na eficiência da encapsulação:

$$EE = 51,89 - 5,9*[ghlr] - 4,39*[ghlr]^{2}$$
(6)

Onde, o CMA é: [ghrl] = concentração de ghrl.

O coeficiente do CMA demostra quantitativamente o quanto esse CMA influencia na EE.

A concentração de ghrl foi a única variável estudada que teve influência na EE.

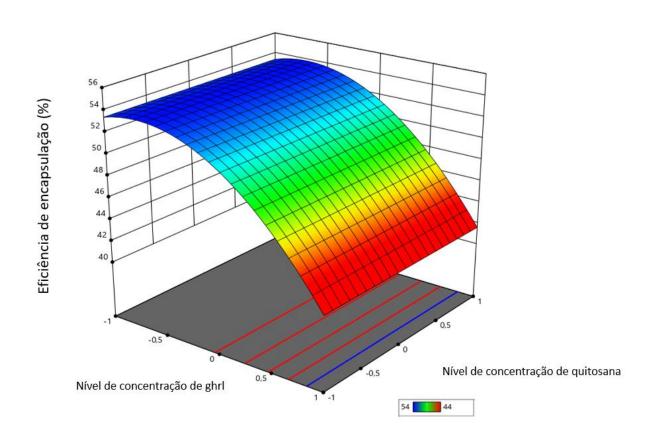
Os valores dos coeficientes de concentração de ghrl na equação acima sugerem que a concentração de ghrl tem um efeito negativo na eficiência de

encapsulação. A eficiência de encapsulação diminui com a maior concentração de ghrl.

A EE variou de 40,9 a 53,9%, com média 49,82±4,91%. O resultado foi similar aos melhores resultados obtidos por outro estudo, onde a EE vários de 9,8±3,7 a 56,1±7,8 % (SALADE et al., 2017).

A resposta de superfície é apresentada no gráfico 3D (Figura 16), apresentando o efeito da concentração de ghrl na eficiência de encapsulação.

Figura 16 - Efeito da concentração de grelina e quitosana na eficiência de encapsulação nos lipossomas (gráficos 3D).



Fonte: Elaboração própria.

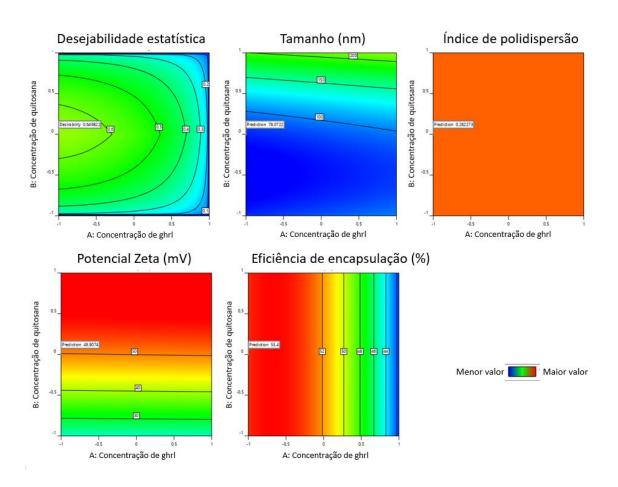
4.3.4 Seleção da formulação otimizada

O software sugeriu 24 soluções, das quais a que apresentou o maior fator de desejabilidade estatística foi selecionada.

A formulação selecionada sugeriu 70µg/mL de concentração de grelina, 0,3% (m/m) de quitosana, tempo de revestimento de 24 horas e processamento de pós formação por homogeneização.

O tamanho previsto da formulação optimizada foi de 78,07 nm, o IPD foi de 0,282, o potencial zeta foi de 49,81mV e a eficiência de encapsulação foi de 53,40% (Figura 17).

Figura 17 – Formulação obtida por homogeneização que apresentou o maior desejabilidade estatística, estabelecendo os critérios alvo de tamanho (mínimo),índice de polidispersão (mínimo), potencial zeta (máximo) e eficiência de encapsulação (máximo).



Fonte: Elaboração própria.

Foram produzidos lipossomas, segundo os parâmetros previstos pela otimização numérica e as respostas reais obtidas foram: 72,25±1,46nm, IPD de 0,300±0,027, potencial zeta de 50,3±1,46 e EE de 53,2%. Essa formulação foi denominada: L_{homo} (Tabela 6).

Tabela 6 - Respostas previstas pela otimização numérica e respostas reais dos lipossomas produzidos por homogeneização de alta pressão segundo os parâmetros otimizados.

L _{homo}	Previsto	Real
Tamanho (nm)	78,07 nm	72,25±1,46nm
IPD (mV)	0,282	0,300±0,02
Zeta	49,80 mV	50,3±1,46 mV
EE (%)	53,4%	53,2±0,8%

Para comparação, foi identificada através de otimização numérica os melhores resultados para lipossomas extrudados, que foram: 70µg/mL de concentração de grelina, 0,3% de concentração de quitosana, tempo de revestimento de 24 horas.

O tamanho previsto da formulação optimizada foi de 165,32nm, o IPD foi de 0,159, o potencial zeta foi de 59,5mV e a eficiência de encapsulação foi de 52,9% (Figura 18).

Índice de polidispersão Desejabilidade estatística Tamanho (nm) B: Concentração de quitosana B: Concentração de quitosana B: Concentração de quitosana A: Concentração de ghrl A: Concentração de ghrl A: Concentração de ghrl Potencial Zeta (mV) Eficiência de encapsulação (%) B: Concentração de quitosana B: Concentração de quitosana 13 IS II Menor valor Maior valor A: Concentração de ghrl A: Concentração de ghrl

Figura 18 - Formulação obtida por extrusão que apresentou o maior desejabilidade estatística, estabelecendo os critérios alvo de tamanho (mínimo),índice de polidispersão (mínimo), potencial zeta (máximo) e eficiência de encapsulação (máximo).

Foram produzidos lipossomas segundo os parâmetros previstos pela otimização numérica e as respostas reais obtidas foram: 152,43±0,24nm, IPD de 0,159±0,018, potencial zeta de 60,81±6,61 e EE de 53,6%. Essa formulação foi denominada: L_{extru} (Tabela 7).

Tabela 7 - Respostas previstas pela otimização numérica e respostas reais dos lipossomas produzidos por extrusão segundo os parâmetros otimizados.

Lextru	Previsto	Real
Tamanho (nm)	165,3 nm	152,43±0,24nm
IPD	0,159	0,159±0,018
Zeta (mV)	59,50 mV	60,81±6,61 mV
EE (%)	53,4%	53,6±0,7%

4.4 Conclusão

Neste estudo, a abordagem baseada em QbD foi adaptada com sucesso na fase inicial de desenvolvimento de uma formulação lipossômica carreadora de ghrl. Os lipossomas foram projetados visando a liberação naso-cerebral. As características relacionadas à ghlr sugerem que a mesma pode ser capaz de atingir o tecido cerebral pela via de administração nasal. Estudos futuros *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar essa liberação, porém as formulações lipossomais foram projetadas com as características necessárias para tal.

Os elementos do QTPP foram definidos e o método de hidratação do filme lipídico foi selecionado para preparar os lipossomas desejados. Os CPPs / CMAs relacionados ao processo, bem como os CQAs, foram determinados. Os CQAs do projeto foram influenciados pelos elementos mais críticos dos CMAs e CPPs e formaram o padrão do projeto experimental, assim, a preparação de lipossomas foi focada nos parâmetros mais críticos. Para atingir os objetivos estabelecidos no início do desenvolvimento do produto, todo processo de desenvolvimento foi realizado baseado na qualidade esperada.

Foi possível estabelecer os parâmetros do processo que influenciam no tamanho de partícula, distribuição do tamanho, na carga superficial e na EE. Assim, dentre os fatores de formulação, concentração de quitosana foi a variável que mais influenciou no tamanho dos lipossomas, seguida pelo processamento de pós formação. A extrusão resultou em lipossomas maiores do que a homogeneização. Porém as amostras tratadas com extrusão apresentaram mais uniformidade em relação ao tamanho das partículas. No entanto as amostras tratadas com homogeneizador obtiveram uma distribuição de tamanho dentro dos limites aceitáveis (menor que 0,3). A concentração de quitosana e o tempo de revestimento foram identificados como parâmetros críticos para o potencial Zeta. Enquanto a concentração de ghrl é o principal parâmetro que influencia a EE, a EE diminui com a maior concentração de ghrl.

Os resultados confirmaram que a abordagem QbD pode melhorar o processo de formulação no desenvolvimento de lipossomas, levar a um processo eficaz de preparação do produto e ajudar na otimização e racionalização do desenvolvimento lipossômico.

Referências

AGRAWAL, M. et al. Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier (BBB) for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 260, p. 61–77, 28 ago. 2017.

BANG, S. H. et al. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 595–604, nov. 2011.

BANGHAM, A. D. Properties and uses of lipid vesicles: an overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 308, n. 1, p. 2–7, 1978.

BARNADAS-RODRÍGUEZ, R.; SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1–2, p. 175–186, 1 fev. 2001.

BEZERRA, M. P.; RODRIGUES, L. N. C. Quality by design (QbD) como ferramenta para otimização dos processos farmacêuticos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 1, p. 5, 2017.

BOURGANIS, V. et al. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, p. 337–362, 2018.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.

BRADFORD, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BUSTAMANTE-MARIN, X. M.; OSTROWSKI, L. E. Cilia and mucociliary clearance. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 4, 3 abr. 2017.

ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as potential drug carrier Systems for Drug Delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014.

CHATURVEDI, M.; KUMAR, M.; PATHAK, K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. **Journal of Advanced Pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 215–22, out. 2011.

CROWE, T. P. et al. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sciences**, 2017.

- DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 18 maio 2018.
- ERDŐ, F. et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 155–170, 1 out. 2018.
- FDA. Liposome drug products. chemistry, manufacturing, and controls. human pharmacokinetics and Bioavailability. Labeling Documentation. Guidance for Industry, **Food and Drug Administration.** v. 27, n. 16, p. 1835–1840, 2018.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.
- GUINDALINI, C. I.; CRUZ CDTS, O.; DE JANEIRO, R. Qualidade por concepção: uma nova abordagem para acelerar o desenvolvimento tecnológico e inovação na área da saúde Quality by design: A new approach to accelerate the technological development in health. **Resista Visa em debate**, v. 5, n. 1, p. 3–10, 2012.
- HASAN, M. et al. Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: study of lipid—polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. **RSC Advances**, v. 6, n. 51, p. 45290–45304, 9 maio 2016.
- HINNA, A. et al. Filter-extruded liposomes revisited: A study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 1, p. 11–20, 2 jan. 2016.
- IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Administration strategies for proteins and peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 578–589, 30 dez. 2014.
- ICH. **Pharmaceutical Development Q8**ICH Harmon Tripart Guidel, , 2009. Disponível em: https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/pharmaceutical-development.html. Acesso em: 29 jul. 2019
- ILLUM, L. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1–3, p. 187–198, 21 fev. 2003.
- KOCKISCH, S. et al. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: An in vitro evaluation of mucoadhesive potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 8, p. 1614–1623, 1 ago. 2003.
- KUMAR, A.; PANDEY, A. N.; JAIN, S. K. Nasal-nanotechnology: Revolution for efficient therapeutics delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 681–693, 2016.
- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.

- 26, n. 10, p. 2700–2707, 1 jun. 2018.
- LEAL, J.; SMYTH, H. D. C.; GHOSH, D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics.** 30 out. 2017.
- MOELLER, E. H. et al. Stability, liposome interaction, and in vivo pharmacology of ghrelin in liposomal suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 13–18, 2010.
- PALLAGI, E. et al. Application of the QbD-based approach in the early development of liposomes for nasal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, p. 11–22, 2019.
- PHILIPPART, M.; SCHMIDT, J.; BITTNER, B. Oral Delivery of Therapeutic Proteins and Peptides: An Overview of Current Technologies and Recommendations for Bridging from Approved Intravenous or Subcutaneous Administration to Novel Oral Regimens. **Drug Research**, v. 66, n. 03, p. 113–120, 4 nov. 2015.
- SALADE, L. et al. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8531–8543, 2017.
- SALADE, L. et al. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 129, p. 257–266, 2018.
- SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, set. 2017.
- SONVICO, F. et al. Surface-modified nanocarriers for nose-to-brain delivery: From bioadhesion to targeting. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 34, 15 mar. 2018.
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5381–5414, 2016.
- WONG, C. Y.; MARTINEZ, J.; DASS, C. R. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 9, p. 1093–1108, set. 2016.
- YU, L. X. et al. Understanding pharmaceutical quality by design. **The AAPS Journal**, v. 16, n. 4, p. 771–783, 23 jul. 2014.
- YU, L. X.; WOODCOCK, J. FDA pharmaceutical quality oversight. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 2–7, 1 ago. 2015.

ZHANG, H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome reparation. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. v. 1522p. 17–22, 2017.

CAPÍTULO III

5 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES OTIMIZADAS SELECIONADAS

5.1 Introdução

Os principais objetivos dos nanocarreadores são gerenciar o tamanho das partículas, as propriedades da superfície e a liberação do medicamento, a fim de cumprir objetivos específicos. Portanto, as caracterizações de nanocarreadores são muito críticas para controlar o comportamento desejado (JAIN; THAREJA, 2019).

Os lipossomas demonstram possuir propriedades adaptáveis em termos de tamanho de partícula, carga de bicamada, composição de bicamada e sua capacidade de encapsulamento. Por isso, essas características devem ser extensamente exploradas.

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é usado para medir o diâmetro médio das partículas e a distribuição do diâmetro das partículas de tamanho nanométrico dispersas em líquido (ASHIZAWA, 2019). Nesse estudo o DLS e a otimização do projeto (capitulo II) foram utilizados para a triagem de formulações, medindo as flutuações dependentes do tempo na intensidade da luz dispersa. A análise das flutuações de intensidade torna possível determinar a distribuição dos coeficientes de difusão dos lipossomas, que são convertidos em uma distribuição de tamanho usando teorias estabelecidas. O DLS é um método simples e rápido, mas fornece uma propriedade de volume médio de lipossomas (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). O analisador de partículas também permite a medida de distribuições nos resultados para amostras polidispersas.

A Crio-microscópia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) é um método importante para caracterizar o tamanho e a forma dos lipossomas, pois pode visualizar diretamente partículas únicas e até sua arquitetura interna sem perturbar a estrutura (BAXA, 2018). Por tanto, a técnicas de microscopia eletrônica, como A cryo-TEM, fornecem uma determinação precisa do tamanho do lipossoma. O resultado são informações precisas sobre o perfil da população de lipossomas na faixa de tamanho. A cryo-TEM é importante pois as estruturas delicadas e dinâmicas de lipossomas requerem um ambiente aquoso para se formar e persistir, e não suportam as etapas de secagem ou coloração da microscopia eletrônica convencional (ALMGREN; EDWARDS; KARLSSON, 2000).

Outra característica importante é a carga de superfície. A estabilidade física e redispersibilidade da dispersão de nanocarreadores, bem como o desempenho *in vivo* depende da carga superficial. A determinação das cargas superficiais pode prever a estabilidade de armazenamento a longo prazo. Geralmente, o potencial zeta superior a ± 30 mV estabiliza a dispersão dos nanocarreadores, bloqueando o contato entre as partículas devido à repulsão elétrica (SAUPE; GORDON; RADES, 2006). A determinação do potencial zeta dá uma ideia da carga líquida das nanopartículas, portanto, fornece um sinal de repulsão elétrica ou atração entre as partículas, conforme sua carga em uma suspensão líquida (JAIN; THAREJA, 2019).

No presente estudo, os lipossomas foram revestidos com quitosana, que tem sido bem estudada no contexto da administração nasal por possuir propriedades mucoadesivas (CASETTARI; ILLUM, 2014). A quitosana é o polímero catiônico dominante usado para interagir eletrostaticamente com as cargas negativas do muco. (CHATURVEDI; KUMAR; PATHAK, 2011). A quitosana foi utilizada como excipientes mucoadesivos com objetivo de superar a limitação da atividade mucociliar que renova rapidamente o muco da mucosa nasal tornando a meia-vida dos fármacos administrados por essa via é muito curta (BUSTAMANTE-MARIN; OSTROWSKI, 2017). Assim, as propriedades mucoadesivas foram avaliadas por meio de um ensaio de força de mucoadesão, onde se analisa a interação entre a forma farmacêutica e a superfície da mucosa em temperatura corpórea.

A eficiência de encapsulação (EE) é outra variável importante. Quando o EE é aumentada, menos ghrl é potencialmente exposta à degradação enzimática (SALADE et al., 2017). A EE depende principalmente das características dos lipídeos, método de preparação usado e propriedades específicas do fármaco (JAIN; THAREJA, 2019). A quantidade de medicamento encapsulado nos lipossomas é estimada após a remoção do fármaco livre. A separação do fármaco livre foi realizada por ultracentrifugação e a quantidade de ghrl foi estimada usando a técnica analítica de espectroscopia UV.

O estudo da permeação transmucosa é geralmente realizado *ex vivo* usando mucosa nasal de animais. Os modelos *ex vivo* são muito populares como modelos de triagem de medicamentos, especialmente para avaliar a permeação do fármaco, durante a fase inicial do desenvolvimento (ERDŐ et al., 2018).

Assim, após os processos de caracterização citados, as formulações otimizadas poderão ser submetidas aos estudos *in vivo*.

5.2 Procedimentos experimentais

5.2.1 Estudos de estabilidade

As formulações otimizadas selecionadas no capítulo II foram analisadas quanto as seguintes propriedades: o tamanho de partícula, o IPD, o potencial zeta e EE em função do tempo (zero, 7, 15, 30 e 60 dias), armazenadas em refrigeração (5-8°C)

Os métodos utilizados nas análises de tamanho de partícula, IPD e potencial zeta foram determinados usando um analisador de partículas (ZetaPALS, modelo NanoBrook 90PlusPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville NY, E.U.A). Resumidamente, as partículas foram diluídas em água ultrapura (1:30), e homogeneizadas. As medidas são realizadas na temperatura de 25°C, a um ângulo de espalhamento de luz em 90° e potencial zeta em 15°. Os testes foram realizados em triplicata de análise.

A EE foi feita com determinação por método de Bradford (1976) posterior a ultracentrifugação.

As comparações estatísticas entre as diferentes formulações foram realizadas utilizando-se a ferramenta ANOVA com pós-teste de Tukey e intervalo de confiança de 95% e significância com p < 0,05

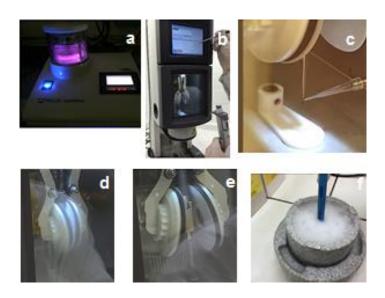
5.2.2 Crio-microscopia eletrônica de transmissão

Para o congelamento em gelo amorfo, as amostras foram preparadas em grades de carbono (Lacey Carbon Type A 300 mesh copper grids, Ted Pella Inc., Redding CA, E.U.A.), as quais foram previamente submetidas ao procedimento de Glow Discharge em um equipamento easiGlow (PELCO -Redding CA, E.U.A.), com os seguintes parâmetros: corrente de 15 mA, carga negativa e 25 segundos de descarga (Figura 19). Esse procedimento é realizado para aplicação de uma tensão na grade de carbono, visando a aderência da gota da amostra.

O congelamento em gelo amorfo (crio-preparação) foi realizado utilizando um equipamento robotizado Vitrobot Mark IV (FEI, Eindhoven, Holanda). Para preparação das amostras, 3 µL foram pingados nas grades carregadas negativamente deixando assentar por 20 segundos com temperatura de 22 °C e umidade relativa 100%.

As grades foram então secas (*blotted*) durante 2,5 segundos, com força 5, e espera de 20 segundos, com um único *blot* e vitrificadas mergulhando rapidamente em etano líquido a -145 °C. Após imersão em etano líquido, as grades foram mantidas em nitrogênio líquido a -196 °C até ao momento da análise no microscópio eletrônico de transmissão e mantidas a -173 °C na câmara do microscópio durante todo o período da análise.

Figura 19 - Procedimento de preparação das amostras para as análises por crio-microscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM).



a: procedimento para aplicação de uma tensão na grade de carbono, b: equipamento robotizado Vitrobot Mark IV (FEI, Eindhoven, Holanda), c: 3 µL da amostra foram pingados nas grades, d e c: grades foram então secas (*blotted*) e f: amostra vitrificadas mergulhando em etanol líquido a -145 °C
Fonte: elaboração própria.

As análises de microscopia eletrônica foram então realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM-1400 PLUS, JEOL, Tokyo, Japão), equipado com filamento de hexaboreto de lantânio (LaB6), operando a 120kV; o microscópio estava equipado com uma câmera CCD da GATAN INC. (MultiScan 794, Pleasanton CA, E.U.A.) (Figura 20) com uma resolução de 1k x 1k pixels para a aquisição digital de imagens. Para análise dos resultados será utilizado o *software* Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton CA, E.U.A.).

As análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), uma instalação nacional aberta do Ministério da Ciência, Tecnologia,

Inovações e Comunicações (MCTIC) operada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).



Figura 20 - Microscópio eletrônico de transmissão TEM-1400 PLUS, JEOL

Fonte: elaboração própria.

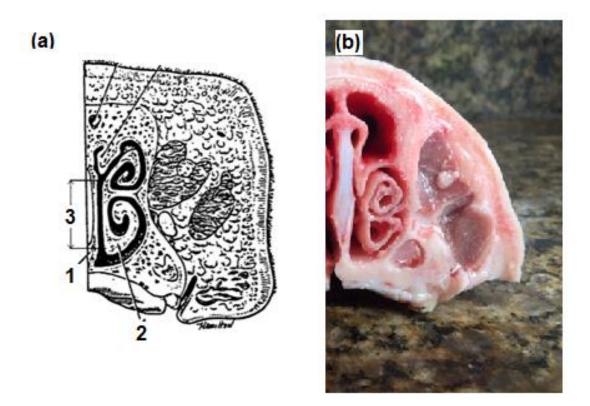
5.2.3 Preparação da mucosa

A membrana modelo utilizada foi uma mucosa nasal suína. As cabeças dos suínos foram doadas pelo abatedouro (Frigorífico Angelelli. Piracicaba- SP).

Para retirada da mucosa, foi seguido o procedimento descrito por Östh; Grasjö; Björk (2002). Resumidamente, o focinho foi separado do animal e aberto para expor a concha (Figura 21). A mucosa que cobre a concha nasal ventral (mucosa da cavidade) foi cuidadosamente removida das cartilagens utilizando pinça e bisturi. A mucosa da cavidade ventral do porco é mais adequada nesse tipo de experimento do que a mucosa do septo do porco (WADELL; BJÖRK; CAMBER, 1999).

As mucosas foram mantidas em solução de cloreto de sódio 0,9% (m/v) e congelada. No dia do experimento, as mucosas foram descongeladas e mantidas refrigeradas em gelo, mergulhadas em solução salina.

Figura 214 - Esquema da seção transversal do nariz de porco adulto (a) e fotografia da seção transversal do nariz de porco adulto (b).



1: septo nasal; 2: conchas nasais ventrais; 3: áreas de seleção Fonte: adaptada de ÖSTH; GRSJÖ; BJÖRK, (2002) (a) e elaboração própria(b).

5.2.4 Propriedade mucoadesiva

As propriedades mucoadesivas da formulação selecionada foram avaliadas sobre a superfície de mucosa suína utilizando TAXTPlus Analisador de Textura (Stable Micro Systems, UK). Uma representação esquemática do analisador de textura e de uma curva típica de mucoadesão é apresentada na Figura 22.

As mucosas foram fixadas com fita adesiva de dupla face e amarradas na extremidade inferior da sonda analítica. Uma quantidade de 2 mL de amostra foi transferida para o suporte de amostra e colocada em um béquer, onde foi mantida em banho de água com temperatura ajustada para 37 °C. A mucosa fixada na sonda foi comprimida sobre as amostras, com uma força de 0,1 N, direcionada no sentido apical

→ basal. O tempo de contato da mucosa com a amostra foi padronizado em 300 s, estipulado para que ocorresse um contato entre a mucosa e a amostra. A sonda foi removida da superfície da amostra com uma velocidade constante de 1,0 mm/s. A força necessária para destacar a mucosa da superfície de cada formulação foi determinada a partir de uma relação tempo x força. As medições foram realizadas em triplicata.

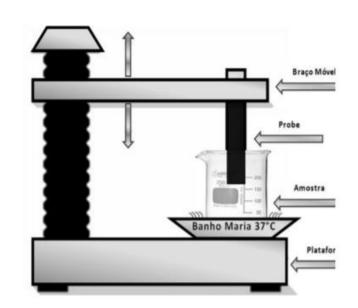


Figura 22 - Representação esquemática teste ex vivo de mucoadesão.

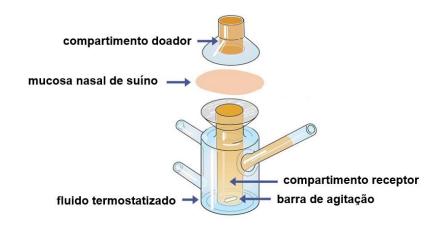
Fonte: adaptado de ALVES; CHAUD (2016)

5.2.5 Estudo de permeação transmucosa

O estudo foi realizado em difusão de células de Franz usando mucosas nasais de suíno (Figura 23).

O tecido foi utilizado para experiências e colocados entre os compartimentos receptor e doador. Uma alíquota de 2 mL de lipossomas carreadores de ghrl foi colocada no compartimento doador. Adicionalmente, uma solução PBS pH 5,9, como branco, foi testada para confirmar a não interferência de possíveis proteínas da membrana na leitura do reagente de Bradford. O compartimento receptor é encamisado para manter a circulação e temperatura do fluido oriundo da bomba do banho termostatizado.

Figura 23 - Representação esquemática da difusão vertical de células Franz.



Fonte: Permegear, Inc. https://permegear.com/franz-cells/

O mesmo volume de amostras que foi extraído do compartimento do receptor em intervalos de tempo de 2 horas durante 12 horas, foi substituído por um novo meio receptor tampão PBS pH 5,9 a 37 \pm 0,5°C sob agitação contínua. A determinação quantitativa da ghrl permeada por unidade de área (μ g/cm²) foi analisada pelo método de Bradford (1976).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Estudo de estabilidade

As formulações selecionadas pela otimização, foram analisadas em função do tempo (zero, 7, 15, 30 e 60 dias) quanto as propriedades de tamanho de partícula, IPD, potencial zeta e EE (tabela 8 e 9).

Tabela 8 - Estabilidade da amostra L_{homo} nos tempos zero, 7,15, 30 e 60 dias.

Tempo	Tamanho das partículas (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
0	72,3±1,46a	0,300±0,027a	50,4±1,46a	53,5±0,30c
7 dias	72,7±2,45a	0,305±0,034a	50,7±1,43a	55,8±0,17 _a
15 dias	72,3±1,66a	0,282±0,014a	49,9±1,33a	54,6±0,26 _b
30 dias	72,3±1,12 _a	0,303±0,082a	50,4±2,45a	53,6±0,20 _c
60 dias	72,3±1,51 _a	0,256±0,009a	50,6±1,76a	53,4±0,17 _c

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) (n=3). Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

IPD: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação.

Fonte: elaboração própria.

Tabela 9 - Estabilidade da amostra Lextru nos tempos zero, 7,15, 30 e 60 días.

Tempo	Tamanho das partículas (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
0	152,4±0,20a	0,159±0,018a	60,9±6,61a	52,9±0,17 _b
7 dias	153,3±0,16a	0,183±0,023a	60,2±7,72a	52,6±0,30a
15 dias	152,2±0,15 _a	0,161±0,083 _a	60,8±5,83 _a	52,4±0,26c
30 dias	152,4±0,23a	0,183±0,011a	60,8±4,84a	51,9±0,20a
60 dias	150,4±0,29 _b	0,173±0,016a	50,9±6,39a	51,7±0,17 _{ab}

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) (n=3). Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

IPD: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação.

Fonte: elaboração própria.

As análises dos resultados mostraram que esses parâmetros permaneceram estáveis dentro dos desvios durante 60 dias. Não se observou diferença estatística entre o tempo inicial (t=0) e final (t=60 dias).

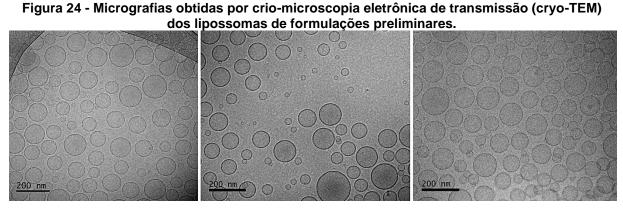
A EE variou estatisticamente durante o período de 60 dias, porem o tempo inicia (t=0) e o tempo final (t=60 dias) não teve diferença estatística. A variação entre os tempos pode sugerir que as formulações apresentam um período de acomodação do fármaco no lipossoma.

5.3.2 Crio-microscopia eletrônica de transmissão

O cryo-TEM é um método importante para caracterizar o tamanho e a forma dos lipossomas, pois pode visualizar diretamente partículas únicas e até sua arquitetura interna sem perturbar a estrutura (BAXA, 2018).

A técnicas de microscopia eletrônica, como cryo-TEM, fornecem uma determinação precisa do tamanho do lipossoma. O resultado são informações precisas sobre o perfil da população de lipossomas.

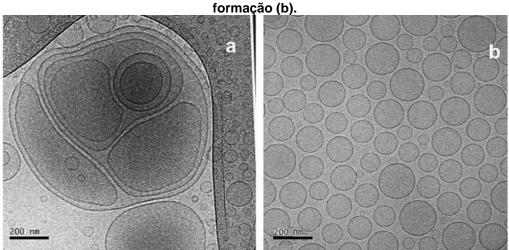
Na Figura 24, é possível observar, as formulações preliminares realizadas no estudo. Tamanhos em torno de 150 nm confirma os resultados obtidos por DLS para essa amostra.



Fonte: Elaboração própria.

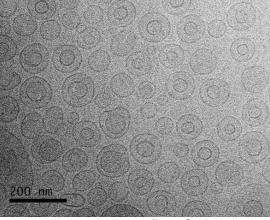
Conforme o descrito por Zhang (2017), após a adição e agitação do meio de dispersão, são formados lipossomas heterogéneos (Figura 25a) e após o processamento de pós formação, obtêm-se lipossomas pequenos homogéneos (Figura 25b). Os processamentos de pós formação são cruciais para obtenção dos lipossomas com tamanho desejado (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001).

Figura 25 - Micrografias obtidas por cryo-TEM dos lipossomas de formulações preliminares.antes do processamento de pós formação (a) e depois do processamento de pós



Mesmo após o processamento de pós formação, existe a ocorrência de dupla bicamada como visto nos lipossomas da Figura 26. No entanto, vimos através da cryo-TEM que lipossomas unilamelares são predominantes. Os lipossomas multicamadas são raros, mesmo obtendo essa micrografia onde esse tipo de lipossoma é predominante eles não foram observados em outras regiões.

Figura 26 - Micrografias obtidas por cryo-TEM dos lipossomas bilamelares de formulações preliminares.



Fonte: Elaboração própria.

5.3.3 Propriedade mucoadesiva

Os resultados para força máxima para separação (g), trabalho de adesão (W g/s) e deformação para o pico (mm) para a formulação L_{homo}, L_{homo} sem revestimento, L_{extru} e L_{extru} sem revestimento são apresentados na Tabela 10.

 2.872 ± 1.636^{a}

(media ± desvio padrao):			
	Força máxima para separação (g)	Trabalho de adesão (g.s ⁻¹)	Deformação para o pico (mm)
L_{homo}	8,585 ± 0,575 ^a	290,244 ± 23,448 ^a	$3,448 \pm 2,744^{a}$
L _{homo} sem revestimento	4,638 ± 0,163 ^b	181,956 ± 18,938 ^b	2,927 ± 1,735 ^a
Lextru	8,283 ± 0,472 ^a	268,173 ± 14,837 ^a	3,346 ± 1,837 ^a

Tabela 10 - Resultado do trabalho de mucoadesão da mucosa suína sobre os lipossomas (média ± desvio padrão).

As propriedades mucoadesivas das formulações com revestimento de quitosana foram significantemente maiores do que as formulações sem revestimento, nos parâmetros de força máxima de separação e de trabalho de adesão.

192.82 ± 4.839^b

 4.823 ± 0.263^{b}

Essas análises confirmam o efeito do revestimento visto nas análises de potencial zeta. Onde, o potencial zeta do lipossoma sem revestimento de quitosana era negativo de 29,90±7,76 mV e potencial zeta do lipossoma revestido foi para 50,3 ±1,46 mV positivo.

Devido à secreção contínua de muco nasal e atividade mucociliar, é de grande importância desenvolver uma formulação que prolongue o tempo de permanência e a estabilidade do peptídeo na cavidade nasal (SALADE et al., 2018). Isso pode ser alcançado através das propriedades mucoadesivas da quitosana. As mucinas, que são glicoproteínas presentes no muco nasal, são caracterizadas por uma carga negativa global conferida pelas funções de ácido siálico e sulfato (LEAL; SMYTH; GHOSH, 2017). A quitosana, que possui característica catiônica, interage eletrostaticamente com estas cargas aniônicas na superfície da mucosa (KOCKISCH et al., 2003).

5.3.4 Estudo de permeação transmucosa

L_{extru} sem

revestimento

Foram realizados estudos de liberação *ex vivo* para determinar se a ghrl liberada pelos lipossomas pode então permear a mucosa nasal. A mucosa nasal suína foi usada nesses estudos, pois demonstrou ser morfologicamente semelhante à mucosa nasal humana (WADELL; BJÖRK; CAMBER, 1999). A permeabilidade da ghrl livre na mucosa suína, como mostrado na Figura 27, foi mais lenta e com uma taxa inferior que as formulações com lipossomas como carreadores.

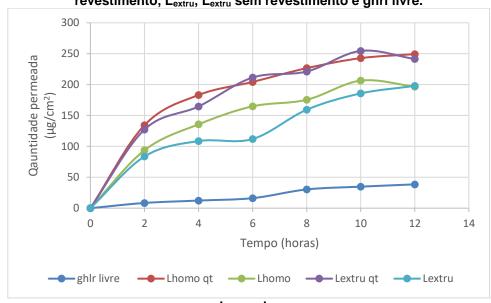


Figura 27 - Perfis de liberação da grelina, *ex vivo*, das formulações L_{homo}, L_{homo} sem revestimento, L_{extru}, L_{extru} sem revestimento e ghrl livre.

Legenda: Fonte: Elaboração própria

A formulações com revestimento de quitosana apresentou maior e mais rápida taxa de permeação do que as formulações sem revestimento. Mostrando que a interação com a mucosa confirmada no estudo de mucoadesão é relevante para permeação.

O impacto da quitosana na permeação foi avaliado devido ao seu efeito potencializador na permeação de peptídeos através das camadas da mucosa nasal, como observado também em outros estudos (ILLUM; FARRAJ; DAVIS, 1994; PREGO; TORRES; ALONSO, 2006; SALADE et al., 2017).

5.4 Conclusão

Com o método de reidratação do filme lipídico seguido de processamento de pós formação foi possível formar a estrutura de interesse, como confirmado pela cryo-TEM.

As análises dos resultados de tamanho de partícula, IPD, potencial zeta e EE mostraram que esses parâmetros permaneceram estáveis durante 60 dias.

O potencial zeta superior a ± 30 mV estabiliza a dispersão dos lipossomas, bloqueando a agregação das estruturas devido à repulsão eletrostática. O revestimento com quitosana foi efetivo para obter um resultado satisfatório de potencial zeta e de mucoadesão, em estudo *ex vivo*, com objetivo de superar a limitação da atividade mucociliar.

A ghlr carreada por lipossomas apresentou um perfil de permeação mais vantajoso do que a ghlr livre. As formulações com lipossomas como carreadores melhoraram a permeação através da mucosa nasal e também são importantes para fornecer proteção eficaz contra a degradação enzimática, especialmente para bioterapêuticos. O revestimento de quitosana também influenciou positivamente na permeação da ghrl através da mucosa suína no estudo *ex vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, M. et al. Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier (BBB) for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 260, p. 61–77, 28 ago. 2017.
- ALAMRI, B. N. et al. The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 26, n. 1, p. 3–11, 2016.
- ALMGREN, M.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 174, n. 1–2, p. 3–21, 2000.
- ALVES, T. F. R.; CHAUD, M. V. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL E VEICULAÇÃO DE CURCUMINA**. [s.l: s.n.].
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.
- ASAKAWA, A. et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 337–345, 2001.
- ASHIZAWA, K. [Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS)]. **Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 139, n. 2, p. 237–248, 2019.
- BAI, Y. et al. Anamorelin for cancer anorexia-cachexia syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 5, p. 1651–1659, 10 maio 2017.
- BANG, S. H. et al. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 595–604, nov. 2011.
- BANGHAM, A. D. Properties and uses of lipid vesicles: an overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 308, n. 1, p. 2–7, 1978.
- BANSAL, V. et al. Vagal stimulation modulates inflammation through a ghrelin mediated mechanism in traumatic brain injury. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 214–220, 2012.
- BARACOS, V. E. et al. Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 2018.
- BARNADAS-RODRÍGUEZ, R.; SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1–2, p. 175–186, 1 fev. 2001.
- BAXA, U. Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. In: **Methods** in molecular biology (Clifton, N.J.). [s.l: s.n.]. v. 1682p. 73–88.

BERGMAN, H. et al. Understanding and meeting the needs of the older population: a global challenge. **Canadian geriatrics journal: CGJ**, v. 16, n. 2, p. 61–5, 2013.

BEZERRA, M. P.; RODRIGUES, L. N. C. Quality By Design (Qbd) Como Ferramenta Para Otimização Dos Processos Farmacêuticos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 1, p. 5, 2017.

BINN, M. et al. Ghrelin gastrokinetic action in patients with neurogenic gastroparesis. **Peptides**, v. 27, n. 7, p. 1603–1606, 2006.

BOURGANIS, V. et al. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, p. 337–362, 2018.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRIMIJOIN, S. et al. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. **Chemico-biological interactions**, v. 259, n. Pt B, p. 271–275, 25 nov. 2016.

BUSTAMANTE-MARIN, X. M.; OSTROWSKI, L. E. Cilia and Mucociliary Clearance. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 4, 3 abr. 2017.

CABRAL, A. et al. Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central Ghrelin: Critical role of brain accessibility. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 8, p. 542–554, 2014.

ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014.

CARR, D. J.; BLALOCK, J. E. Neuropeptide Hormones and Receptors Common to the Immune and Neuroendocrine Systems: Bidirectional Pathway of Intersystem Communication. **Psychoneuroimmunology**, p. 573–588, 1 jan. 1991.

CASETTARI, L.; ILLUM, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 189–200, 28 set. 2014.

CHATURVEDI, M.; KUMAR, M.; PATHAK, K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 215–22, out. 2011.

CHEN, J. A. et al. Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 6, n. 2, p. 132–43, 2015.

CHEYUO, C. et al. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. **Shock**, v. 35, n. 3, p. 258–

265, 2011.

COLLDÉN, G.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Therapeutic potential of targeting the ghrelin pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–29, 2017.

CROWE, T. P. et al. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sciences**, 2017.

CURROW, D. C.; SKIPWORTH, R. J. The emerging role of anamorelin hydrochloride in the management of patients with cancer anorexia-cachexia. **Future Oncology**, v. 13, n. 20, p. 1767–1783, 16 ago. 2017.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 18 maio 2018.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.

DEBOER, M. D. Update on melanocortin interventions for cachexia: Progress toward clinical application. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 146–151, 2010.

DEBOER, M. D. Ghrelin and cachexia: will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? **Molecular and cellular endocrinology**, v. 340, n. 1, p. 97–105, 20 jun. 2011.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1654–1673, abr. 2010.

DJUPESLAND, P. G.; MESSINA, J. C.; MAHMOUD, R. A. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 6, p. 709–733, 2014.

ERDŐ, F. et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 155–170, 1 out. 2018.

ESPOSITO, A. et al. Mechanisms of anorexia—cachexia syndrome and rational for treatment with selective ghrelin receptor agonist. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 9, p. 793–797, nov. 2015.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, dez. 2008.

FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 3, p. 173–8, set. 2013.

FDA. Liposome Drug Products. Chemistry, Manufacturing, and Controls. Human Pharmacokinetics and Bioavailability. Labeling Documentation. Guidance for Industry. **Chinese Journal of New Drugs**, v. 27, n. 16, p. 1835–1840, 2018.

- FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.
- FUJITSUKA, N.; UEZONO, Y. Rikkunshito, a ghrelin potentiator, ameliorates anorexia-cachexia syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 271, 10 dez. 2014.
- GARCIA, J. M. et al. Anamorelin for patients with cancer cachexia: an integrated analysis of two phase 2, randomised, placebo-controlled, double-blind trials. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 1, p. 108–16, 1 jan. 2015.
- GARIN, M. C. et al. The human experience with ghrelin administration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 5, p. 1826–1837, 2013.
- GAUNA, C. et al. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 1055–1060, 2005.
- GRAFF, C. L.; POLLACK, G. M. Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus. **Current drug metabolism**, v. 5, n. 1, p. 95–108, 2004.
- GRAUL, A. I.; STRINGER, M.; SORBERA, L. Cachexia. **Drugs of Today**, v. 52, n. 9, p. 519–529, 1 set. 2016.
- GUINDALINI, C. I.; CRUZ CDTS, O.; DE JANEIRO, R. Qualidade por concepção: uma nova abordagem para acelerar o desenvolvimento tecnológico e inovação na área da saúde Quality by design: A new approach to accelerate the technological development in health. **Resista Visa em debate**, v. 5, n. 1, p. 3–10, 2012.
- HASAN, M. et al. Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: study of lipid—polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. **RSC Advances**, v. 6, n. 51, p. 45290–45304, 9 maio 2016.
- HATANAKA, M. et al. Novel mechanism of ghrelin therapy for cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, n. 4, p. 393, 2015.
- HINNA, A. et al. Filter-extruded liposomes revisited: A study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 1, p. 11–20, 2 jan. 2016.
- HSU, T. M. et al. Hippocampus ghrelin signaling mediates appetite through lateral hypothalamic orexin pathways. **eLife**, v. 4, 2015.
- IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Administration strategies for proteins and peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 578–589, 30 dez. 2014.
- ICH. **Pharmaceutical Development Q8**ICH Harmon Tripart Guidel, , 2009. Disponível em: https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-

- single/article/pharmaceutical-development.html>. Acesso em: 29 jul. 2019
- ILLUM, L. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1–3, p. 187–198, 21 fev. 2003.
- ILLUM, L.; FARRAJ, N. F.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 8, p. 1186–9, ago. 1994.
- JAIN, A. K.; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 524–539, 4 dez. 2019.
- JOSHI, S. et al. Cationic surface charge enhances early regional deposition of liposomes after intracarotid injection. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 120, n. 3, p. 489–497, 7 dez. 2014.
- KAYS, J. K. et al. Three cachexia phenotypes and the impact of fat-only loss on survival in FOLFIRINOX therapy for pancreatic cancer. **Journal of Cachexia**, **Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 4, p. 673–684, 1 ago. 2018.
- KHAN, S. et al. Formulation of intranasal mucoadhesive temperature-mediated in situ gel containing ropinirole and evaluation of brain targeting efficiency in rats. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 3, p. 223–234, 2010.
- KHATIB, M. N. et al. Ghrelin for the management of cachexia associated with cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 50, 2018a.
- KHATIB, M. N. et al. Ghrelin as a promising therapeutic option for cancer cachexia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 2172–2188, 2018b.
- KISHIMOTO, I. et al. Ghrelin and cardiovascular diseases. **Journal of Cardiology**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 2012.
- KOCKISCH, S. et al. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: An in vitro evaluation of mucoadhesive potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 8, p. 1614–1623, 1 ago. 2003.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y. Ghrelin is a growth-hormone- releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, 1999.
- KUMAR, A.; PANDEY, A. N.; JAIN, S. K. Nasal-nanotechnology: Revolution for efficient therapeutics delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 681–693, 2016.
- KWON, J. et al. Participation of the central melanocortin system in metabolic regulation and energy homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2014.
- LAI, F.; FADDA, A. M.; SINICO, C. Liposomes for brain delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 7, p. 1003–1022, 2013.
- LAJOIE, J. M.; SHUSTA, E. V. Targeting Receptor-Mediated Transport for Delivery of Biologics Across the Blood-Brain Barrier. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 613–631, 6 jan. 2015.

- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 1 jun. 2018.
- LEAL, J.; SMYTH, H. D. C.; GHOSH, D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug deliveryInternational Journal of Pharmaceutics Elsevier B.V., , 30 out. 2017.
- LEE, K.-R. et al. Lack of a primary physicochemical determinant in the direct transport of drugs to the brain after nasal administration in rats: potential involvement of transporters in the pathway. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 25, n. 5, p. 430–41, 2010.
- LEGUISAMO, N. M. et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovascular Diabetology**, v. 11, p. 100, 16 ago. 2012.
- LI, Y. Sensory Signal Transduction in the Vagal Primary Afferent Neurons. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 2554–2563, 2007.
- LIN, T. C.; HSIAO, M. Ghrelin and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 51–57, 2017.
- MALIK, J. S.; YENNURAJALINGAM, S. Prokinetics and ghrelin for the management of cancer cachexia syndrome. **Ann Palliat Med.**, v. 8, n. 1, p. 80–85, 1 jan. 2019.
- MARIANECCI, C. et al. Drug delivery in overcoming the blood-brain barrier: Role of nasal mucosal grafting. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 325–335, 2017.
- MERKUS et al. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 29, n. 1–2, p. 13–38, 5 jan. 1998.
- MILLA, P.; DOSIO, F.; CATTEL, L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 1, p. 105–19, jan. 2012.
- MITTAL, D. et al. Insights into direct nose to brain delivery: Current status and future perspective. **Drug Delivery**, v. 21, n. 2, p. 75–86, 2014.
- MIYAKE, M. M.; BLEIER, B. S. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 29, n. 2, p. 124–127, 2015.
- MOELLER, E. H. et al. Stability, liposome interaction, and in vivo pharmacology of ghrelin in liposomal suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 13–18, 2010.
- MOLFINO, A. et al. Ghrelin: from discovery to cancer cachexia therapy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 5, p. 471–476, set. 2014.

- MORRISON, E. E.; COSTANZO, R. M. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v. 23, n. 1, p. 49–61, 1992.
- MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin and its potential in the treatment of eating/wasting disorders and cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 1, n. 2, p. 159–167, dez. 2010.
- MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 6, p. 437–460, 2015.
- MUSCARITOLI, M. et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and precachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 154–159, 2010.
- NAITO, T. Emerging treatment options for cancer-associated cachexia: A literature reviewTherapeutics and Clinical Risk ManagementDove Medical Press Ltd., , 2019.
- NASS, R. M. et al. Ghrelin and growth hormone: story in reverse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8501–8502, 2010.
- NISHI, Y. et al. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. **Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 2255–2264, 2005.
- NISINI, R. et al. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, 2018.
- NOBLE, G. T. et al. Ligand-targeted liposome design: Challenges and fundamental considerations. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 32–45, 2014.
- ÖSTH, K.; GRÅSJÖ, J.; BJÖRK, E. A New Method for Drug Transport Studies on Pig Nasal Mucosa Using a Horizontal Ussing Chamber. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1259–1273, maio 2002.
- PALLAGI, E. et al. Application of the QbD-based approach in the early development of liposomes for nasal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, p. 11–22, 2019.
- PAPAHADJOPOULOS, D.; KIMELBERG, H. K. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: Their properties and interactions with cholesterol and proteins. **Progress in Surface Science**, v. 4, p. 141–232, 1 jan. 1974.
- PAVAN, B. et al. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. **Molecules**, v. 13, n. 5, p. 1035–1065, 2008.
- PEREIRA, J. A. DA S.; DA SILVA, F. C.; DE MORAES-VIEIRA, P. M. M. The impact of ghrelin in metabolic diseases: An immune perspective. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p. 4527980, 2017.
- PHILIPPART, M.; SCHMIDT, J.; BITTNER, B. Oral Delivery of Therapeutic Proteins

- and Peptides: An Overview of Current Technologies and Recommendations for Bridging from Approved Intravenous or Subcutaneous Administration to Novel Oral Regimens. **Drug Research**, v. 66, n. 03, p. 113–120, 4 nov. 2015.
- PIRES, A. et al. Intranasal drug delivery: How, why and what for? **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 288–311, 2009.
- POHER, A. L.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Ghrelin regulation of glucose metabolism. **Peptides**, v. 100, p. 236–242, 1 fev. 2018.
- PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The sympathetic nervous response in inflammation. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 6, p. 504, 2014.
- PREGO, C.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Chitosan nanocapsules as carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan molecular weight and type of salt on the in vitro behaviour and in vivo effectiveness. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. Anais...set. 2006
- PRODAM, F.; FILIGHEDDU, N. Ghrelin Gene Products in Acute and Chronic Inflammation. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 5, p. 369–384, 2014.
- RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 2013.
- SAKURADA, T. et al. Comparison of the actions of acylated and desacylated ghrelin on acid secretion in the rat stomach. **Journal of Gastroenterology**, v. 45, n. 11, p. 1111–1120, 2010.
- SALADE, L. et al. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8531–8543, 2017.
- SALADE, L. et al. Chitosan-coated liposome dry-powder formulations loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 129, p. 257–266, 2018.
- SALEHI, A. et al. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: A study of isolated pancreatic islets and intact mice. **Regulatory Peptides**, v. 118, n. 3, p. 143–150, 2004.
- SAUPE, A.; GORDON, K. C.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 56–62, 11 maio 2006.
- SCHERBAKOV, N.; DOEHNER, W. Cachexia as a common characteristic in multiple chronic disease. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, p. 1189–1191, 2019.
- SCHIPPER, N. G.; VERHOEF, J. C.; MERKUS, F. W. The nasal mucociliary

- clearance: relevance to nasal drug delivery. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 7, p. 807–14, jul. 1991.
- SCHNYDER, A.; HUWYLER, J. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, p. 99–107, 2005.
- SELIM, Z. I. et al. Serum levels of ghrelin, adipokines, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with juvenile idiopathic arthritis in Assuit University Hospitals: Relation to nutritional status and disease activity. **Egyptian Pediatric Association Gazette**, v. 63, n. 2, p. 52–57, 2015.
- SHEWAN, L. G. An analysis of the types of recently published research in the field of cachexia. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 24, n. 16, p. 1759–1773, 2017.
- SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, set. 2017.
- SONVICO, F. et al. Surface-Modified Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery: From Bioadhesion to Targeting. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 34, 15 mar. 2018.
- STEINMAN, J.; DEBOER, M. D. Treatment of Cachexia. Melanocortin and Ghrelin Interventions. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 92
- TORSELLO, A. et al. Novel domain-selective ACE-inhibiting activity of synthetic growth hormone secretagogues. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 4, p. 317–324, 2012.
- VESTERGAARD, E. T. et al. Acyl ghrelin induces insulin resistance independently of GH, cortisol, and free fatty acids. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5381–5414, 2016.
- VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014Journal of Cachexia, Sarcopenia and MuscleWiley Online Library, , 26 nov. 2014.
- WADELL, C.; BJÖRK, E.; CAMBER, O. Nasal drug delivery Evaluation of an in vitro model using porcine nasal mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 197–206, 1 fev. 1999.
- WANG, Y. et al. Vagal nerve regulation is essential for the increase in gastric motility in response to mild exercise. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 222, n. 2, p. 155–163, 2010.
- WONG, C. Y.; MARTINEZ, J.; DASS, C. R. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 9, p. 1093–1108, set. 2016.

- WU, R. et al. Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1697–E1702, dez. 2007.
- YANAGI, S. et al. The Homeostatic Force of Ghrelin. **Cell metabolism**, v. 27, n. 4, p. 786–804, 3 abr. 2018.
- YANG, S. et al. Norepinephrine-induced hepatocellular dysfunction in early sepsis is mediated by activation of α 2-adrenoceptors. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 4, p. G1014–G1021, out. 2001.
- YING, W. The nose may help the brain: intranasal drug delivery for treating neurological diseases. **Future Neurology**, v. 3, p. 1–4, 2008.
- YU, L. X. et al. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. **The AAPS Journal**, v. 16, n. 4, p. 771–783, 23 jul. 2014.
- YU, L. X.; WOODCOCK, J. FDA pharmaceutical quality oversight. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 2–7, 1 ago. 2015.
- ZHANG, H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 1522p. 17–22.
- ZHAO, T.-J. et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 16, p. 7467–7472, 2010.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do tratamento da caquexia baseada em ghrl pode oferecer a oportunidade de atender às necessidades dos pacientes caquéticos, e a via nasocerebral pode ser uma via fácil e eficaz de adesão. No entanto, são necessários estudos adicionais para estabelecer critérios para o uso de ghrl carreado por lipossomas pela via naso-cerebral no tratamento de caquexia

O uso de lipossomas está se mostrando uma estratégia potencialmente boa administração de ativos pela via naso-cerebral.

A ghlr carreada por lipossomas, pode atingir os alvos cerebrais e desempenhas efeitos pertinentes ao tratamento da caquexia. A ghrl também pode proteger os órgãos críticos do estresse e da inflamação metabólica envolvidos na patogênese da caquexia, quando administradas por essa via.

Neste estudo, a abordagem baseada em QbD foi adaptada com sucesso na otimização de uma formulação lipossômica carreadora de ghrl.

Foi possível estabelecer os parâmetros do processo que influenciam no tamanho de partícula, distribuição do tamanho, na carga superficial e na EE. Assim, dentre os fatores de formulação, concentração de quitosana foi a variável que mais influenciou no tamanho dos lipossomas, seguida pelo processamento de pós formação. O tamanho, para homogeneização, variou de 70,25 a 212,14nm, com média 112,33±48,77nm. Enquanto para extrusão variou de 135,97 a 299,70 nm, com média 201,85±64,87. As amostras tratadas com extrusão apresentaram mais uniformidade em relação ao tamanho das partículas. A concentração de quitosana e o tempo de revestimento foram identificados como parâmetros críticos no potencial zeta. Enquanto a concentração de ghrl é o principal parâmetro que influencia a EE, a EE diminui quando a concentração de ghrl aumenta. Os resultados provaram que a abordagem QbD pode melhorar o processo de formulação no desenvolvimento da formulação, levar a um processo eficaz de preparação dos lipossomas o e ajudar na otimização e racionalização do desenvolvimento.

Com o método de reidratação do filme lipídico seguido de processamento de pós formação foi possível formar a estrutura de interesse, com confirmado pela cryo-TEM. O revestimento com quitosana foi importante para obter um resultado satisfatório de potencial zeta, que garante a estabilidade da formulação; obter bons

resultados de mucoadesão, em estudo *ex vivo*, e também influenciou positivamente na permeação da ghrl através da mucosa suína no estudo *ex vivo*.

As análises dos resultados de tamanho de partícula, IPD, potencial zeta e EE mostraram que esses parâmetros permaneceram estáveis dentro dos desvios durante 60 dias.

Assim, esses processos realizados apresentaram um melhor entendimento do produto e do processo de desenvolvimento. As formulações otimizadas selecionadas podem ser extensamente exploradas, em desdobramentos futuros, em estudos *in vitro* e *in vivo*, a fim de confirmar a transferência naso-cerebral para o tratamento da caquexia.