

RESUMO Introdução: A caquexia é uma síndrome progressiva de perda muscular, associada ao catabolismo e à inflamação sistêmica, sem tratamento eficaz atual. A grelina (ghrl) mostra potencial terapêutico, mas sua eficácia é limitada devido à baixa biodisponibilidade. Este estudo tem como objetivo avaliar uma formulação lipossômica para a administração de grelina via naso-cerebral, oferecendo uma abordagem promissora para tratamento da caquexia. Métodos: As formulações foram preparadas com base na metodologia Qualidade Baseada em Projeto (Quality by Design - QbD), com hidratação de filmes de fosfolípidios, seguida de pós-formação e revestimento com quitosana. A morfologia das vesículas lipossomais foi detalhada por criomicroscopia eletrônica de transmissão (CrioMET), e a estabilidade foi avaliada ao longo de dois anos. Testes in vitro de viabilidade celular foram conduzidos para avaliar as alterações microscópicas da morfologia celular e o metabolismo celular por ensaio de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT). A capacidade de permeação da ghrl e a adesividade da formulação lipossomal à mucosa nasal foram investigadas usando modelo ex-vivo de mucosa nasal suína. A biodisponibilidade in vivo da ghrl no cérebro, foi avaliada utilizando modelo animal com ratos, e a ghrl foi quantificada por meio do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Resultados e Discussão: Os parâmetros de otimização incluíram uma concentração de grelina de 70 µg/mL, 0,3% (m/m) de quitosana e tempo de revestimento de 12 h. A formulação otimizada resultou em partículas de $152,43 \pm 0,24$ nm, índice de polidispersão de $0,159 \pm 0,018$, potencial zeta de $+60,81 \pm 6,61$ mV e eficiência de encapsulação de $53,2 \pm 0,8$. A análise morfológica por CrioMET mostrou que o processo de preparação seguido por extrusão dos lipossomas foi adequado para obter lipossomas nanométricos. A avaliação de estabilidade revelou que os parâmetros analisados permaneceram estáveis ($p < 0,5$) por 60 dias. Ao analisar a concentração de 0,5% (v/v) da formulação lipossomal, a linhagem de epitélio nasal apresentou uma viabilidade de 86,74%, enquanto a linhagem de neuroblastoma demonstrou uma viabilidade de 96,6%. O revestimento com quitosana melhorou o desempenho da formulação em testes de permeação ex-vivo e aderência à mucosa nasal em comparação com formulações não revestidas. A concentração de ghrl quantificada foi de $33,754 \pm 6,124$ µg/mL em 30 min (48,22% da ghrl administrada) em homogenato cerebral por CLAE-UV, grupo tratado (n=3) com a formulação lipossomal contendo ghrl, enquanto

a ghrl livre não foi possível ser quantificada. Conclusão: Os achados desta tese proporcionam uma visão abrangente da formulação lipossomal para o transporte naso-cerebral da grelina. As informações sobre tamanho, estabilidade, encapsulação, biocompatibilidade, permeação e biodisponibilidade estabelecem uma base sólida para futuras investigações. A otimização das formulações lipossomais oferece perspectivas promissoras para aprimorar a administração naso-cerebral, destacando seu potencial terapêutico em contextos neurobiológicos.

Palavras-chave: caquexia; grelina; liberação de fármacos; liberação naso-cerebral; lipossomas; nanotecnologia.

ABSTRACT Introduction: Cachexia represents a progressive syndrome characterized by muscular wasting, concomitant with heightened catabolism and systemic inflammation, currently devoid of efficacious therapeutic interventions. Ghrelin (ghrl) has exhibited therapeutic promise, albeit hindered by limited efficacy due to its diminished bioavailability. This study endeavors to assess a liposomal formulation designed for the nose-to-brain delivery of ghrl, presenting a promising avenue for cachexia treatment. Methods: Formulations were meticulously prepared employing the Quality by Design (QbD) methodology, involving the hydration of phospholipid films, subsequent post-formation, and chitosan coating. The morphology of liposomal vesicles was intricately examined through cryo-transmission electron microscopy (CryoTEM), while stability was rigorously evaluated over a two-year period. In vitro cellular viability assays were conducted to scrutinize microscopic alterations in cell morphology and cellular metabolism utilizing the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The permeation capacity of ghrl and the adhesiveness of the liposomal formulation to nasal mucosa were investigated using an ex-vivo porcine nasal mucosa model. In vivo bioavailability of ghrl in the brain was assessed in a rat model, with quantification performed through high-performance liquid chromatography (HPLC). Results and Discussion: Optimization parameters, inclusive of a ghrl concentration of 70 µg/mL, 0.3% (w/w) chitosan, and a coating time of 12 hours, yielded a refined formulation with particles measuring 152.43 ± 0.24 nm, a polydispersity index of 0.159 ± 0.018 , a zeta potential of $+60.81 \pm 6.61$ mV, and an encapsulation efficiency of 53.2 ± 0.8 . CryoTEM analysis affirmed that the preparation process, coupled with liposome extrusion, effectively yielded nanometric liposomes. Stability assessments indicated that the scrutinized parameters-maintained stability ($p < 0.5$) over a 60-day period. At a concentration of 0.5% (v/v) of the liposomal formulation, the nasal epithelium lineage exhibited a viability of 86.74%, whereas the neuroblastoma lineage demonstrated a viability of 96.6%. Chitosan coating markedly enhanced the formulation's performance in ex-vivo permeation tests and adhesion to nasal mucosa compared to uncoated formulations. The quantified ghrl concentration was 33.754 ± 6.124 µg/mL at 30 minutes (48.22% of administered ghrl) in the cerebral homogenate by HPLC-UV, in the treated group (n=3) with the liposomal formulation containing ghrl, while free ghrl remained unquantifiable.

Conclusion: The findings presented in this thesis offer a comprehensive understanding of the liposomal formulation designed for nose-to-brain delivery of ghrl. Insights into size, stability, encapsulation, biocompatibility, permeation, and bioavailability collectively establish a robust foundation for future investigations. The optimization of liposomal formulations presents promising avenues for enhancing nose-to-brain administration, thereby underscoring its therapeutic potential within neurobiological contexts.

Keywords: cachexia; ghrelin; drug delivery; nose-to-brain delivery; liposomes; nanotechnology.