

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanoemulsões termorresponsivas contendo temozolomida para administração nasal: estudos analíticos, farmacotécnicos e biológicos visando a avaliação da atividade antitumoral sobre o glioblastoma

LUANA ROBERTA MICHELS

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanoemulsões termorresponsivas contendo temozolomida para administração nasal: estudos analíticos, farmacotécnicos e biológicos visando a avaliação da atividade antitumoral sobre o glioblastoma

Tese apresentada por
Luana Roberta Michels
para obtenção do TÍTULO
DE DOUTORA em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizandra Braganhol

PORTO ALEGRE, 2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de março de 2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Maria Oliveira Battastini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Cristiana Lima Dora
Universidade Federal de Rio Grande

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Michels, Luana Roberta
Desenvolvimento de nanoemulsões termorresponsivas contendo temozolomida para administração nasal: estudos analíticos, farmacotécnicos e biológicos visando a avaliação da atividade antitumoral sobre o glioblastoma / Luana Roberta Michels. -- 2021.
181 f.
Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Coorientadora: Elizandra Braganhol.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Glioblastoma. 2. Temozolomida. 3. Nanoemulsões. 4. Nanoemulsões termorresponsivas. I. Ferreira Teixeira, Helder, orient. II. Braganhol, Elizandra, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos e o projeto para o desenvolvimento deste trabalho; ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS e ao Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA.

Ao meu orientador, Professor Dr. Helder Ferreira Teixeira, pela oportunidade e incentivo. Por ter confiado à mim esse projeto e acreditado que eu era capaz de concluí-lo. Agradeço ainda por toda palavra de apoio, conhecimento, atenção e tempo dedicados à mim ao longo desses 4 anos.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Elizandra Braganhol, pelo carinho, apoio e incentivo. Por sempre me ajudar a encontrar uma solução para os problemas que enfrentei ao longo do trabalho, por me receber de forma tão acolhedora em seu grupo de pesquisa e por me inspirar como mulher e pesquisadora.

Aos meus queridos colegas do LDG (UFRGS), que foram minha companhia diária durante o doutorado e que dividiram comigo as alegrias e as tristezas da pesquisa. Em especial à Bruna, que me recebeu e apresentou o LDG de forma tão generosa. À Flávia, que se tornou uma grande parceira de experimentos e amiga. À Rose, por toda a ajuda, incentivo e inspiração.

Às queridas colegas do Biocel (UFCSPA), por todo o apoio e auxílio para a realização de grande parte deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, Mari, Lucélia, Kleyton, Tainá e Nessa, que se tornaram minha segunda família, e com quem vivi os momentos mais felizes desses últimos quatro anos.

Às pessoas mais especiais da minha vida, meus pais e irmão, meus grandes incentivadores, fontes de inspiração, amor e carinho. A vocês, todo o meu amor e gratidão. Obrigada por tudo!

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese de doutorado foi redigida na forma de capítulos. Assim, este exemplar encontra-se estruturado da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Revisão da literatura;

- Capítulo I – Artigo científico publicado: HPLC-UV METHOD FOR TEMOZOLOMIDE DETERMINATION IN COMPLEX BIOLOGICAL MATRICES: APPLICATION FOR *IN VITRO*, *EX VIVO* AND *IN VIVO* STUDIES

- Capítulo II – Artigo científico a ser submetido: NANOCARRIERS AND AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMERS ASSOCIATION FOR INTRANASAL DRUGS DELIVERY: CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES TREATMENT

- Capítulo III – Artigo científico a ser submetido: NASAL ADMINISTRATION OF TMZ-LOADED THERMORESPONSIVE NANOEMULSIONS REDUCES *IN VIVO* GLIOBLASTOMA GROWTH

- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências;
- Anexos;

RESUMO

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral maligno mais frequente em adultos. O tratamento é realizado através da ressecção cirúrgica, combinação de radioterapia e quimioterapia com a temozolomida (TMZ) pela via oral. No entanto, a TMZ apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de administração de elevadas doses sistêmicas para atingir a concentração cerebral, acarretando em graves efeitos colaterais. As nanoemulsões vêm sendo muito estudadas para administração através da via nasal, que está anatomicamente ligada ao SNC, facilitando a liberação cerebral de fármacos. Além disso, a utilização de polímeros termorresponsivos como os poloxâmeros pode ser útil para melhorar as propriedades das nanoemulsões para administração nasal. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoemulsões contendo TMZ, com incorporação do poloxâmero 407 para administração nasal visando o tratamento de GB. A primeira etapa do trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico e bioanalítico para quantificação da TMZ em diferentes matrizes. Os resultados mostraram que o método desenvolvido demonstrou ser linear, preciso, exato e robusto, com baixos limites de detecção (0,01 µg/mL) e quantificação (0,05 a 5 µg/mL). Após, as nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e morfologia. As nanoemulsões apresentaram tamanho de gotícula nanométrico e uma população monodispersa. Também foram avaliadas a viscosidade e a força mucoadesiva, estudos de permeação/retenção através da mucosa nasal, distribuição cerebral e plasmática da TMZ, além da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. A adição do poloxâmero 407 resultou em aumento da viscosidade das formulações, força mucoadesiva, controle da liberação do fármaco, além de maior retenção do fármaco na mucosa nasal suína. A NTMZ-P10 reduziu a distribuição plasmática da TMZ, aumentou a concentração em 2,8 vezes no cérebro em comparação à F-TMZ e reduziu significativamente o volume tumoral dos animais em relação ao grupo controle. Os resultados demonstram o potencial da NTMZ-P10 como um sistema a ser utilizado para o tratamento de glioblastoma através da via nasal.

ABSTRACT

Development of thermoresponsive nanoemulsions containing temozolomide for nasal administration: analytical, pharmacotechnical and biological studies aimed at assessing antitumor activity on glioblastoma

Glioblastoma (GB) is the most common malignant brain tumor in adults. Treatment is by surgical resection and combination of radiotherapy and chemotherapy with oral temozolomide (TMZ). However, TMZ has some drawbacks, such as the need of high systemic doses to achieve brain concentration, leading to serious side effects. Nanoemulsions have been widely studied for administration through the nasal route, which is anatomically linked to the CNS, favoring the cerebral release of drugs. In addition, the use of thermoresponsive polymers such as poloxamers may be useful for improving the properties of nanoemulsions for nasal administration. In this context, the objective of this study was to develop TMZ-loaded nanoemulsions with the incorporation of poloxamer 407 for nasal administration to GB treatment. The first stage of the work was the development of an analytical and bioanalytical method to quantify the TMZ in different matrices. The results showed that the developed method proved to be linear, precise, accurate and robust, with low detection limits (0.01 $\mu\text{g/mL}$) and quantification (0.05 to 5 $\mu\text{g/mL}$). Next, nanoemulsions were characterized by diameter, polydispersion index, zeta potential, pH, content and morphology. The nanoemulsions presented nanometric droplet size and a monodisperse population. Viscosity and mucoadhesive strength, permeation/retention through the nasal mucosa, brain and plasma TMZ distribution, as well as *in vitro* and *in vivo* antitumor activity were also evaluated. The addition of poloxamer 407 resulted in increased viscosity of formulations, mucoadhesive strength, drug release control, and increased retention of the drug in porcine nasal mucosa. NTMZ-P10 reduced the plasma distribution of TMZ, increased brain concentration 2.8-fold compared to F-TMZ, and significantly reduced the tumor volume of animals compared to the control group. The results demonstrate the potential of NTMZ-P10 as a system to be used for nasal glioblastoma treatment.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura molecular da temozolomida (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011).

CAPÍTULO I

Figure 1. Representative chromatograms of temozolomide standard solution, 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A), LLOQ (B) and blank samples (specificity in the different matrices) obtained by HPLC-UV at 330 nm. Where, MPL: mouse plasma, BRN: brain, PNM: porcine nasal mucosa, NE: nanoemulsions, RM: receptor media, DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), GL261: GL261 glioma cell line.

Figure 2. Representative standard curve with regression type of temozolomide plotting the peak area vs. the concentration of the TMZ standard (0.05 - 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Figure 3. Cell uptake quantification of TMZ in glioma cell cultures. GL261 glioma cells were exposed to increasing TMZ concentrations as indicated. Following 24 h, TMZ was determined in cell homogenate (A) or in culture medium (B) by HPLC-UV validated method. Results were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. Experiment was repeated at least three times. * $p < 0.05$ as compared to TMZ-F in each concentration. TMZ-F = temozolomide solubilized in ACN:H₂O (50:50, v/v); TMZ-NE: temozolomide-loaded nanoemulsion.

CAPÍTULO III

Figure 1. Morphological characterization of NTMZ and NTMZ-P10 formulations. TMZ-loaded NE was prepared in presence or in absence of 10% poloxamer 407 and TEM was performed. NTMZ (A) and NTMZ-P10 (B). Magnification 100K (A1; B1) and 300k (A2; B2). TEM: transmission electron

microscopy; TMZ: temozolomide; NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsion); NTMZ-P10 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 10% of poloxamer 407).

Figure 2. Analysis of apparent viscosity of NTMZ-P5 (A), NTMZ-P7.5 (B), NTMZ-P10 (C) and NTMZ-P12.5 (D) was determined at different temperatures (24 to 32°C). TMZ: temozolomide; NTMZ-P5, NTMZ-P7.5, NTMZ-P10, NTMZ-P12.5 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 5, 7.5, 10 or 12.5% of poloxamer 407, respectively).

Figure 3. *In vitro* release profile through synthetic cellulose membrane of F-TMZ, NTMZ, NTMZ-P5, NTMZ-P7.5, NTMZ-P10 and NTMZ-P12.5 in potassium phosphate buffer pH 5.8 at 32 ± 0.5 °C. F-TMZ (free drug); NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsions without poloxamer 407); NTMZ-P5 (TMZ-loaded nanoemulsions with 5% of poloxamer 407); NTMZ-P7.5 (TMZ-loaded nanoemulsions with 7.5% of poloxamer 407); NTMZ-P10 (TMZ-loaded nanoemulsions with 10% of poloxamer 407); NTMZ-P12.5 (TMZ-loaded nanoemulsions with 12.5% of poloxamer 407).

Figure 4. Determination of mucoadhesive properties of TMZ-loaded NE. Analysis was performed using a texture analyser and porcine nasal mucosa hydrated with artificial mucus. The values represent the mean \pm standard deviation (SD). Results were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ as compared with NTMZ; ** $p < 0.001$ as compared with NTMZ; *** $p < 0.0001$ as compared with NTMZ. TMZ: temozolomide; NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsions); NTMZ-P5, NTMZ-P7.5, NTMZ-P10, NTMZ-P12.5 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 5, 7.5, 10 or 12.5% of poloxamer 407).

Figure 5. Analysis of nasal permeation/retention of TMZ-loaded NEs. The study was performed on a Franz type diffusion cell employing excised nasal mucosa and the indicated groups shown in the figure were analyzed following 8 h of permeation/retention study. Fluorescent formulations were obtained by adding Nile Red stain. (A) Fluorescence (–upper panel) and HE staining (– down panel) representative images of control (nasal mucosa in PBS without fluorescence) or NEs-

exposed nasal mucosa (magnification 100x). **(B)** Quantification of Nile Red fluorescent intensity. The values represent the mean \pm standard deviation (SD). Results were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ as compared with NTMZ. TMZ: temozolomide; NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsion); NTMZ-P5, NTMZ-P7.5, NTMZ-P10, NTMZ-P12.5 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 5, 7.5, 10 or 12.5% of poloxamer 407).

Figure 6. Cell line assay (IC_{50}) measured against C6 rat glioma by MTT (A) and sulforhodamine B (B) for F-TMZ, NTMZ, NTMZ-P5, NTMZ-P7.5 and NTMZ-P10. F-TMZ (free drug); NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsions without poloxamer 407); NTMZ-P5 (TMZ-loaded nanoemulsions with 5% of poloxamer 407); NTMZ-P7.5 (TMZ-loaded nanoemulsions with 7.5% of poloxamer 407); NTMZ-P10 (TMZ-loaded nanoemulsions with 10% of poloxamer 407).

Figure 7. Brain (A) and plasma (B) quantification of TMZ following a single nasal administration of F-TMZ, NTMZ and NTMZ-P10 in Wistar rats. TMZ levels was determined at the indicated times by HPLC-UV. The values represent the mean \pm standard deviation (SD). Data were analyzed one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ as compared with F-TMZ; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$, ### $p < 0.0001$ as compared with NTMZ. F-TMZ (free TMZ); NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsion); NTMZ-P10 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 10% of poloxamer 407).

Figure 8. Analysis of GB growth in tumor-bearing animals treated with formulations as indicated. Tumor size was measured 21 days after glioma implantation in Wistar rats by analyzing three hematoxylin and eosin (HE) sections of each tumor. HE images were captured using a digital camera connected to a microscope, and total volume (mm^3) was determined using ImageJ Software[®]. (A-E) Representative tumor images. (F) Tumor volume quantification of implanted glioblastomas. Values represent the mean \pm SD of at least five animals per group. Data were analyzed one-way analysis of

variance followed by Tukey's post-hoc. * $p < 0.05$, significantly different from control group (saline); # $p < 0.05$, significantly different from NE-P10. (A) Control (saline); (B) NTMZ-P10 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 10% of poloxamer 407). (C) F-TMZ (free TMZ); (D) NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsion); (E) NE-P10 (unloaded nanoemulsion with 10% of poloxamer 407).

Figure 9. (A) Analysis of olfactory capacity of animals (scale in seconds). (B-D) Analysis of behavioral parameters of glioma-implanted rats using Open Field apparatus. Values represent the mean \pm SD of at least five animals per group. Data were analyzed two-way analysis of variance followed by Bonferroni's test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ significantly different from pre-surgery and after surgery for each group. Control (saline); F-TMZ (free TMZ); NE-P10 (unloaded nanoemulsion with 10% of poloxamer 407); NTMZ (TMZ-loaded nanoemulsion); NTMZ-P10 (TMZ-loaded nanoemulsion containing 10% of poloxamer 407).

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Exemplos de nanoemulsões, com métodos de obtenção e agentes mucoadesivos utilizados visando a administração nasal de fármacos para o SNC.

CAPÍTULO I

Table 1. Linearity evaluation and sensitivity data of TMZ detected in different matrices.

Table 2. Linearity data of the TMZ by ANOVA and linear regression analysis.

Table 3. Results of repeatability, intermediate precision, accuracy and stability evaluation of TMZ recovered from different matrices.

Table 4. Recovery data of TMZ added in biological matrices.

Table 5. HPLC-UV method application for TMZ determination in *ex vivo* and *in vivo* samples.

CAPÍTULO II

Table 1. Rheological properties and mucoadhesive strength of thermoresponsive poloxamer-based nanocarriers.

Table 2. Poloxamer-based nanocarriers by intranasal drug delivery for CNS diseases treatment

CAPÍTULO III

Table 1. Physicochemical characterization of nanoemulsions.

Table 2. TMZ quantification in permeation/retention studies.

Table 3. Histological characteristics of control or F-TMZ, NTMZ, NE-P10 or NTMZ-P10 treated glioma-bearing rats.

Table 4. Tissue damage serum markers in control or F-TMZ, NTMZ, NE-P10 or NTMZ-P10 treated glioma-bearing rats.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	24
Objetivo Geral	25
Objetivos específicos	25
REVISÃO DA LITERATURA	26
Gliomas	27
Temozolomida	28
Via nasal	30
Administração nasal de nanoemulsões	32
Referências	38
CAPÍTULO I	46
Artigo publicado no periódico Biomedical Chromatography	46
CAPÍTULO II	74
CAPÍTULO III	112
DISCUSSÃO GERAL	162
CONCLUSÕES GERAIS	170
REFERÊNCIAS	174
ANEXOS	178

Os gliomas compreendem um grupo de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) caracterizados por sua elevada agressividade e malignidade (DANHIER et al., 2015; MESSAOUDI et al., 2014), como os glioblastomas (GB), que compreendem os tumores cerebrais primários mais comuns em adultos (LAWS; SHAFFREY, 1999; VAN WOENSEL et al., 2013). Os GB são classificados como tumores de grau IV e exibem características de extrema malignidade, incluindo proliferação vascular, necrose e resistência a radio/quimioterapia. Além disso, o prognóstico para pacientes diagnosticados com GB é bastante desfavorável, pois se observa uma sobrevida média de apenas 12 a 14 meses, sendo que menos de 3% dos pacientes acometidos pela doença atingem uma taxa de sobrevivência de até cinco anos (DANHIER et al., 2015; ERYLLMAZ et al., 2017; FANG et al., 2016).

O tratamento para GB é um dos mais difíceis dentre os tipos de câncer. Isso se deve a fatores relacionados a este tipo de tumor, como a grande variabilidade histopatológica e a elevada taxa de proliferação (DAI; HOLLAND, 2001; FANG et al., 2016). Além disso, as células de GB têm grande capacidade de infiltrarem-se difusamente no tecido cerebral, impossibilitando a ressecção completa de tecido canceroso e, portanto, a recorrência do tumor se torna quase inevitável (ERYLLMAZ et al., 2017; FANG et al., 2016; MESSAOUDI et al., 2014).

Além da ressecção cirúrgica, o atual tratamento para o GB também é realizado pela combinação de radio/quimioterapia com temozolomida pela via oral (TMZ) (DANHIER et al., 2015; ERYLLMAZ et al., 2017; KIM et al., 2015b). A TMZ atua como um agente alquilante de DNA através da metilação das bases de guanina e de adenina, conduzindo a quebras de dupla cadeia de DNA, parada do ciclo celular e consequente morte celular por apoptose (FANG et al., 2016; ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011). A TMZ apresenta desvantagens que comprometem a eficácia do tratamento, como curto tempo de meia-vida e necessidade de administração de elevadas doses sistêmicas para atingir níveis terapêuticos no cérebro, acarretando em efeitos colaterais

graves como dores de cabeça, náuseas, fadiga, depressão da medula óssea e ulcerações orais (KHAN et al., 2016a; KIM et al., 2015b).

Como alternativa, a administração nasal tem se mostrado promissora para administração de fármacos direcionados ao SNC, que apresentam reduzida biodisponibilidade cerebral após administração intravenosa ou oral. A via nasal apresenta a vantagem de estar anatomicamente ligada ao SNC por meio da via olfatória, evitando a seletividade da barreira hemato-encefálica (BAHADUR; PATHAK, 2012a; SHAH; YADAV; AMIJI, 2013). Além disso, essa via não apresenta interferência do metabolismo de primeira passagem, além de ser não invasiva e de fácil administração, contribuindo para adesão do paciente ao tratamento (FONSECA et al., 2014). Contudo, a administração nasal apresenta limitações, como o *clearance* mucociliar, baixa permeabilidade do epitélio nasal a alguns fármacos e degradação enzimática (FONSECA et al., 2014; GRASSIN-DELYLE et al., 2012). Assim, os nanosistemas podem ser promissores para o direcionamento cerebral dos fármacos pela via nasal devido a sua rápida absorção, biodegradabilidade e diâmetro reduzido (ALAM et al., 2010; KHAN et al., 2016a).

Dentre os sistemas nanoestruturados, encontram-se as nanoemulsões O/A (NE) que são dispersões nanométricas de gotículas de óleo em água estabilizada por um sistema tensoativo (BAJERSKI et al., 2016; BRUXEL et al., 2012). A reduzida viscosidade desses sistemas pode ser considerada como um fator limitante para a mucoadesão à cavidade nasal. Tal característica pode ser aprimorada com a adição de polímeros, como os poloxâmeros, que constituem um grupo de copolímeros formados por blocos de óxido de etileno e de propileno (OP) dispostos em uma estrutura tribloco (DUMORTIER et al., 2006). O poloxâmero 407 apresenta uma propriedade conhecida como termoresponsividade que se caracteriza pela temperatura de transição do estado de solução para gel (Tsol-gel). Abaixo dessa temperatura, a amostra permanece fluida, e acima, a solução se torna semissólida (DUMORTIER et al., 2006). O uso desses polímeros tem sido descrito na composição de sistemas de liberação de fármaco para a via nasal com vistas ao tratamento de doenças do SNC, devido

ao aumento do tempo de permanência do fármaco na cavidade nasal, retardo na taxa de liberação e, ainda, no coeficiente de permeabilidade e aumento da concentração cerebral (SALAMA et al., 2012; SHELKE et al., 2016).

Até o momento, nenhum estudo envolvendo o desenvolvimento de nanoemulsões termoresponsivas contendo TMZ para utilização através da via nasal, visando o aumento da absorção do fármaco no SNC foi encontrado na literatura. A partir do exposto, considerando o grande interesse da área farmacêutica no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças do SNC, e a possibilidade de aumento da liberação do fármaco para o cérebro através da via nasal, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanoemulsões termorreversíveis para a liberação cerebral de temozolomida visando o tratamento de glioblastoma.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolvimento de nanoemulsões termoresponsivas contendo temozolomida como um sistema de liberação para administração nasal do fármaco ao Sistema Nervoso Central com vistas ao tratamento de glioblastomas.

Objetivos específicos

- Validar método analítico e bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação da temozolamida em formulações e amostras biológicas obtidas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.
- Desenvolver nanoemulsões termoresponsivas contendo temozolamida por emulsificação espontânea destinada à administração nasal.
- Caracterização físico-química, morfológica e reológica das nanoemulsões desenvolvidas.
- Avaliar o perfil de liberação, permeação e retenção da temozolamida em pele de orelha suína a partir das nanoemulsões utilizando-se células de difusão de Franz.
- Examinar a distribuição plasmática e cerebral da temozolamida em ratos a partir das nanoemulsões administradas por via nasal.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* das nanoemulsões desenvolvidas em células de glioma C6.
- Investigar *in vivo* do efeito antiproliferativo das nanoemulsões sobre o crescimento dos gliomas em modelo murino.

1. GLIOMAS

Os gliomas estão entre os tumores cerebrais primários mais comuns em adultos, representando mais de 70% dos tumores cerebrais malignos (GUSYATINER; HEGI, 2018).

Uma das características mais marcantes dos gliomas é a presença de células tumorais que perniciosamente invadem o parênquima do SNC à sua volta (PISAPIA, 2017). Como principal consequência aos pacientes acometidos por gliomas, é o grande comprometimento do tecido nervoso periférico ao tumor, resultando em edemas, alterações cognitivas, cefaleia e hemiparesia progressiva (GIROLAMI et al., 2000).

Até recentemente, os diagnósticos dos gliomas eram realizados e classificados somente com base na histopatologia dos tumores, obtendo-se informações importantes sobre o prognóstico dos pacientes. Entretanto, nas duas últimas décadas, evidenciou-se que algumas características moleculares se correlacionam melhor com a biologia dos gliomas do que o diagnóstico histológico (LOUIS et al., 2016). Devido a isso, na classificação de tumores do SNC da OMS de 2016 (a atualização mais recente da quarta edição publicada em 2007), características histológicas e moleculares são integradas na definição de múltiplos tipos de glioma. Nessa nova classificação da OMS, os gliomas difusos incluem os tumores astrocíticos de grau II e III, os oligodendrogliomas de grau II e III, os glioblastomas de grau IV, assim como os gliomas difusos da infância. Essa abordagem deixa aqueles astrocitomas que possuem um padrão de crescimento mais circunscrito, falta de alterações na família de genes IDH, frequentemente têm alterações de BRAF (astrocitoma pilocítico, xantastrostoma pleomórfico) ou mutações TSC1/TSC2 (astrocitoma subependimário de células gigantes) distintos dos gliomas difusos. Em outras palavras, astrocitoma difuso e oligodendrogliomas são agora nosologicamente mais semelhantes do que astrocitoma difuso e astrocitoma pilocítico (LOUIS et al., 2016).

Os glioblastomas (GB) são divididos em (1) GB, IDH-selvagem (cerca de 90% dos casos), que corresponde mais frequentemente ao GB primário ou

cl clinicamente definido e predomina em pacientes com mais de 55 anos de idade; (2) GB, IDH-mutante (cerca de 10% dos casos), que corresponde ao chamado GB secundário com uma história prévia de glioma difuso de baixo grau e ocorre preferencialmente em pacientes mais jovens (OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

Dentre os gliomas, o GB (grau IV) é o tumor cerebral primário mais comum e devastador, caracterizado histologicamente por considerável celularidade e atividade mitótica, proliferação vascular e necrose (DAI; HOLLAND, 2001; OMURO; DEANGELIS, 2013). Como as células desses tumores variam em tamanho e forma, ou seja, são pleomórficas, os glioblastomas foram denominados glioblastomas multiformes, um termo que não está mais em uso. O glioblastoma e outros gliomas malignos são altamente invasivos, infiltrando o parênquima cerebral circundante, embora sejam tipicamente confinados ao SNC e não metastatizam (OMURO; DEANGELIS, 2013). Aproximadamente metade de todos os glioblastomas em adultos infiltram mais de um lobo e aproximadamente 5% crescem multifocalmente (DJALILIAN; SHAH; HALL, 1999).

Atualmente, o tratamento para GB conta com a ressecção cirúrgica, associada à radioterapia e quimioterapia pela temozolomida, tendo essa última grande limitação devido às restrições impostas pela barreira hematoencefálica (BHE), além dos graves efeitos colaterais (BRANDES et al., 2000). Além disso, a dificuldade de completa remoção cirúrgica dos gliomas é extremamente difícil, em virtude da natureza invasiva dessas células tumorais, que infiltram o tecido cerebral adjacente (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002). Dessa forma, a recorrência do tumor é quase inevitável, uma vez que uma população de células tumorais invariavelmente permanece no SNC. O prognóstico para pacientes diagnosticados com GB é considerado bastante desfavorável, pois se observa uma sobrevida média de 12 a 14 meses, sendo que menos de 3% dos pacientes acometidos pela doença atingem uma taxa de sobrevivência de até cinco anos (DANHIET et al., 2015; ERYLLMAZ et al., 2017; FANG et al., 2016).

2. TEMOZOLOMIDA

A temozolomida (TMZ) é um quimioterápico utilizado pela via oral que tem um papel estabelecido no tratamento de GB. A TMZ (3,4-di-hidro-3-metil-4-oxoimidazo [5,1-d] -as-tetrazina-8-carboxamida) é uma molécula pequena (194.15 Da) (Figura 1), lipofílica, pertencente à classe de agentes alquilantes, como um derivado da imidazotetrazina, e atua ligando covalentemente um grupo metil às bases de guanina e adenina no DNA do tumor (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011). Isso causa um erro do DNA durante a replicação celular e, através da ação do sistema de reparo incompatível, leva a apoptose das células tumorais e a regressão tumoral (WHITELAW, 2019).

A TMZ atua como um pró-fármaco, estável em pH ácido, uma propriedade que permite a administração oral, porém, com um tempo de meia-vida plasmático de 1,8 horas a pH 7,4. A TMZ é rapidamente absorvida intacta, mas depois sofre metabolização espontânea para formar monometil triazeno 5-(3-metiltriazen-1-il)-midazol-4-carboxamida (MTIC), que possui a atividade citotóxica (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011).

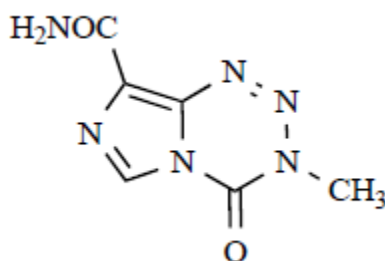


Figura 1. Estrutura molecular da temozolomida (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2011).

Embora a TMZ ofereça alguma esperança aos pacientes com GB, uma taxa de sobrevivência de 5 anos é alcançada por apenas 9,8% dos pacientes (STUPP, 2009; STUPP et al., 2005). A TMZ apresenta diversos efeitos colaterais, sendo as toxicidades mais comuns efeitos colaterais no trato gastrointestinal, como náuseas e vômitos, além de mielossupressão. Semelhante a outros agentes alquilantes, a TMZ pode exibir potencial efeito leucemogênico. Embora rara, a

TMZ tem sido associada ao desenvolvimento da síndrome mielodisplásica e a neoplasias secundárias como linfoma (TRINH; PATEL; HWU, 2009). Além dos efeitos colaterais, a eficácia do tratamento também esbarra na quimiorresistência desenvolvida pelo tumor. O mecanismo mais bem documentado de resistência à TMZ é mediado pela proteína de reparo do DNA, MGMT (*O*⁶-metilguanina metiltransferase), que remove os grupos metil das lesões *O*⁶-methylguanine (*O*⁶-MeG) que surgem do tratamento com a TMZ (PERAZZOLI et al., 2015; WIRSCHING; GALANIS, 2016).

3. VIA NASAL

Tradicionalmente, a via nasal era apenas utilizada para administração de fármacos para tratamento de distúrbios locais tais como congestão nasal, sinusite e infecções nasais. Posteriormente, a absorção nasal passou a explorada para a liberação sistêmica de certos fármacos, com baixo peso molecular, peptídeos e pequenas proteínas, como alternativa à sua administração por injeções parenterais (ILLUM, 2003).

Entretanto, durante as últimas décadas, a via nasal tem sido cada vez mais estudada para a liberação cerebral de fármacos com a finalidade de tratamento de doenças cerebrais específicas, como por exemplo, doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, epilepsia além de tumores cerebrais (ILLUM, 2012; KOZLOVSKAYA; ABOU-KAOUUD; STEPENSKY, 2014).

A administração nasal de fármacos tem sido um campo em rápido desenvolvimento. No entanto, não se sabe exatamente quais são os mecanismos que levam à liberação de medicamentos ao cérebro após a administração nasal. Algumas evidências demonstram que o fármaco pode atingir o cérebro por várias vias diretas e indiretas. O fármaco que é depositado na cavidade nasal pode escapar à degradação enzimática e à rápida depuração normal pelo sistema mucociliar, sofrer captação nas células das vias nervosas olfativas ou trigêmeas ou absorção na circulação sistêmica (DHURIA; HANSON; FREY, 2010;

GIZURARSON, 2012; LOCHHEAD; THORNE, 2012; PARDESHI; BELGAMWAR, 2013).

Cada fossa nasal é dividida em três segmentos: o vestíbulo, o átrio e o corneto (que por sua vez é dividido em superior, concha média e inferior). A zona respiratória (ao redor do corneto inferior) é o local principal para a entrada sistêmica de drogas devido à sua alta área superficial (120 a 150 cm²) e seu córion altamente vascularizado e permeável (GRASSIN-DELYLE et al., 2012).

Alguns estudos sugerem que os fármacos podem chegar ao SNC por meio de transporte extracelular ou intracelular ao longo dos nervos olfativos, e que essa pode ser a principal via para a liberação cerebral de fármacos após administração nasal (DHURIA; HANSON; FREY, 2010; KOZLOVSKAYA; ABOU-KAOUD; STEPENSKY, 2014).

Os ramos do nervo trigêmeo inervam o epitélio respiratório e olfativo da cavidade nasal. Assim, a via trigeminal, pode ser uma importante via direta de liberação cerebral de fármacos. Três ramos do nervo trigêmeo (divisão oftálmica, divisão maxilar e divisão mandibular) se fundem no gânglio do trigêmeo, entram no SNC e terminam nos núcleos espinhais do trigêmeo no tronco cerebral. Portanto, é possível uma relação cruzada entre as rotas trigeminal e olfativa na liberação cerebral dos fármacos.

Existem várias razões pelas quais a liberação cerebral através da via nasal é de grande interesse, incluindo: 1) Esta via pode liberar o fármaco diretamente ao cérebro, ignorando a barreira hematoencefálica (BHE), que é considerada impermeável a quase 100% dos fármacos macromoleculares e a mais de 98% dos fármacos de moléculas pequenas (GAO; PANG; JIANG, 2013); 2) Por essa via não há metabolismo gastrointestinal ou efeito de primeira passagem que pode inativar uma fração substancial do fármaco administrado; 3) A administração nasal pode diminuir o tempo para o início da ação dos medicamentos no SNC, especialmente para tratamento da dor e enxaqueca (VELDHORST-JANSSEN et al., 2009). Essas e outras vantagens da administração nasal são potencialmente relevantes levando em consideração a ineficiência da liberação de fármacos no SNC por meio de vias sistêmicas (KOZLOVSKAYA; STEPENSKY, 2013).

4. ADMINISTRAÇÃO NASAL DE NANOEMULSÕES

A administração nasal tem se tornado uma área de interesse crescente para administração de medicamentos. Por ser uma via indolor não invasiva e de várias vantagens práticas, representa uma maneira favorável de administração de medicamentos (CHOUDHURY et al., 2017; COMFORT et al., 2015).

O avanço na utilização de sistemas nanoparticulados nas últimas décadas tem permitido a veiculação e melhorias nas propriedades biofarmacêuticas de diversos agentes terapêuticos com certas limitações, como toxicidade, baixa solubilidade ou elevada degradabilidade. Além disso, os nanocarreadores também possibilitaram a permeação através de barreiras biológicas, mostrando, assim, a potencialidade da nanotecnologia para a liberação de fármacos a órgão específicos, como por exemplo, o cérebro (KOZLOVSKAYA; STEPENSKY, 2013). Dentre os sistemas nanoparticulados de liberação estão as nanoemulsões (NE), dispersões de óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), compostas por cerca de 10 a 20% de óleo, estabilizado com 0,5 a 2% de tensoativo, onde o fármaco pode estar solubilizado, disperso e/ou adsorvido preferencialmente na fase interna da nanoestrutura (BAJERSKI et al., 2016; CALDERÓ; GARCÍA-CELMA; SOLANS, 2011; SINGH et al., 2017). As NE são sistemas cineticamente estáveis (sem floculação aparente ou coalescência durante longo prazo de armazenamento), com reduzido diâmetro médio de gotícula (20 a 400 nm) e distribuição uniforme de tamanho (RAI et al., 2018).

Diferentes métodos de preparação das NE são descritos na literatura, sendo divididos em dois principais grupos: os métodos de baixa energia e os de alta energia. Os métodos de baixa energia utilizam as propriedades físico-químicas intrínsecas aos componentes, como a emulsificação espontânea, inversão de fases e temperatura de inversão de fases. Já os métodos de alta energia necessitam de equipamentos para gerar forças de maior grau para quebrar as forças intermoleculares de atração, as ligações de hidrogênio e as forças de Van der Waals que existem entre os líquidos de tensão superficial muito alta e

muito baixa, como ultrassons, microfluidizadores e homogeneizadores de alta pressão (RAI et al., 2018; SINGH et al., 2017). Portanto, a seleção dos materiais, a concentração apropriada, ordem de adição, o método apropriado de preparação e a velocidade de agitação ideal/tensão de cisalhamento são os principais aspectos a serem considerados antes do desenvolvimento de uma formulação de qualidade.

Devido à estabilidade, reduzido tamanho de gotícula, além de boas propriedades de solubilização, as NE representam uma boa estratégia para veiculação de fármacos por diferentes vias de administração. Também devido à menor tensão superficial entre a fase oleosa e aquosa, mais difícil é a aglomeração ou precipitação da formulação e consequentemente, a possibilidade de formação de cremes ou sedimentação (RAI et al., 2018; SUTRADHAR; AMIN, 2013).

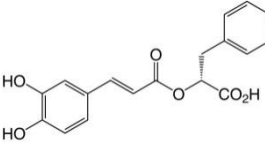
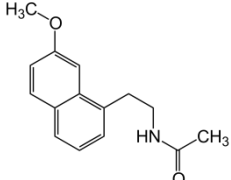
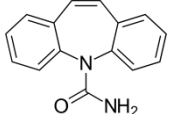
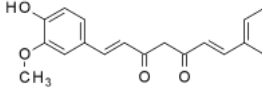
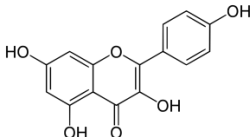
Isso ajuda a atravessar a barreira das membranas biológicas por alteração reversível do arranjo celular, melhorando a interação com as células após a solubilização da barreira lipídica ou a fusão da interface lipídica de duas camadas com a parede celular (BASPINAR; BORCHERT, 2012; RAI et al., 2018).

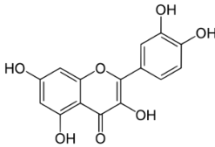
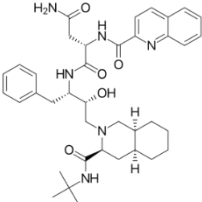
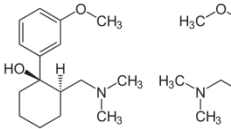
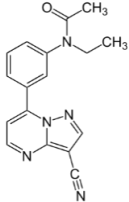
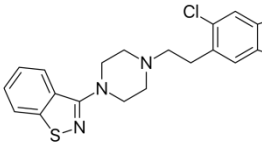
Além disso, pesquisas recentes se concentram no direcionamento cerebral através da região olfativa da via nasal para administração de medicamentos, a fim de evitar a natureza impermeável da barreira hemato-encefálica (BHE), que limita a chegada dos fármacos no cérebro pela circulação sistêmica (CHOUDHURY et al., 2017). Uma abordagem para melhorar a permeabilidade cerebral, contornando a BHE foi realizada para a administração da Ciclosporina-A. A administração pela via nasal do fármaco em um sistema nanomulsionado ajudou a contornar a barreira imposta pela BHE promovendo um aumento gradual na proporção da concentração cérebro-sangue após 4 horas da administração (YADAV et al., 2015).

Apesar da via nasal ser promissora para a liberação de fármacos ao SNC, há algumas desvantagens que podem limitar a eficiência no direcionamento cerebral do fármaco, como o baixo volume da cavidade nasal, menor tempo de permanência devido à depuração mucociliar e baixa permeabilidade de certos

fármacos (CHOUDHURY et al., 2017; ILLUM, 2003). Além disso, um sistema pouco viscoso pode acarretar em permanência na mucosa nasal por tempo insuficiente para a liberação do fármaco (ILLUM, 2003). Esses aspectos devem ser considerados durante o desenvolvimento de uma formulação nasal, podendo ser contornados através do uso de polímeros mucoadesivos (como quitosana) ou polímeros de gelificação *in situ* (carbopol, poloxâmero) para prolongar o tempo de permanência na cavidade nasal (HOSNY; BANJAR, 2013; KHAN et al., 2018; SALAMA et al., 2012; SHELKE et al., 2016).

Tabela 1. Exemplos de nanoemulsões, com métodos de obtenção e agentes mucoadesivos utilizados visando a administração nasal de fármacos para o SNC.

Fármaco	Método	Composição	Adjuvante mucoadesivo	Ref.
<p>Ácido rosmarínico</p> 	EE	TCM + lecitina de gema de ovo	Quitosana (0,1%, v/v)	(FACHEL et al., 2018)
<p>Agomelatina</p> 	T	Capmul MCM (2%) + polissorbato 80 + PEG-400	Quitosana (0,5%, p/v), Poloxâmero 407 (20%, p/v).	(AHMED et al., 2019)
<p>Carbamazepina</p> 	EE	Ácido oleico + macroglicérido de caprilocaproyl	Goma xantana (0,1%, p/p)	(SAMIA; HANAN; KAMAL, 2012)
<p>Curcumina</p> 	EE	Capmul MCM + Captex 500, Cremophor EL + polissorbato 80 + PEG 400 + éter monoetílico de dietilenoglicol	Quitosana (1%, p/v)	(SOOD; JAIN; GOWTHAMA RAJAN, 2014)
<p>Kaempferol</p> 	HP	TCM, lecitina de gema de ovo, polissorbato 80	Quitosana (0,25%, p/v)	(COLOMBO et al., 2018)

<p>Quercetina</p> 	T	Ácido oleico + PEG 400, polissorbato 80+ labrasol + éter monoetílico de dietilenoglicol	Quitosana (0,25, 0,5, 1,0 % p/v)	(AHMAD et al., 2018)
<p>Saquinavir</p> 	EE	Capmul MCM + polissorbato 80 + PEG 400	-	(MAHAJAN et al., 2014)
<p>Tramadol</p> 	EE	Miristato de isopropila + lecitina de soja	Poloxâmero 188 (2%, p/p)	(LALANI et al., 2015)
<p>Zaleplon</p> 	T	TCM + Labrasol + PEG 200	Carbopol 934 (0.5%)	(HOSNY; BANJAR, 2013)
<p>Ziprasidona</p> 	EE	Capmul MCM + Labrasol + éter monoetílico de dietilenoglicol	Quitosana (0,5%, p/p)	(BAHADUR; PATHAK, 2012b)

EE: emulsificação espontânea; T: titulação aquosa; HP: homogeneização a alta pressão; PEG: polietilenoglicol; TCM: triglicerídeos de cadeia média; Capmul MCM: monoglicerídeo de ácidos graxos de cadeia média; Labrasol: macroglicerídeo de caprilcaproyl

Como podem ser observados na Tabela 1, diversos componentes (óleos, tensoativos e adjuvantes), diferentes métodos de preparo e agentes mucoadesivos ou estratégias para aumento da permanência das formulações na mucosa nasal são empregados no desenvolvimento de nanoemulsões visando a administração de fármacos para o SNC.

Em um estudo realizado por Hosny e Banjar (2013), uma nanoemulsão com característica de gelificação *in situ* foi desenvolvida para prolongar o tempo

de permanência do fármaco zaleplon na cavidade nasal. Esta estratégia foi estabelecida com sucesso a partir da incorporação do polímero Carbopol 934 dependente do pH na nanoemulsão. A liberação do fármaco a partir das NE através da via nasal contornou o metabolismo de primeira passagem e promoveu a solubilidade do fármaco através da incorporação no núcleo oleoso, resultando assim num aumento de 8,62 vezes na biodisponibilidade cerebral do fármaco em comparação com a formulação comercializada de comprimidos (HOSNY; BANJAR, 2013).

O emprego de sistemas com polímeros de gelificação *in situ*, com capacidade termorreversível, que promovem aumento da viscosidade do sistema e conseqüente maior adesão da formulação à cavidade nasal podem ser estratégias interessantes para contornar alguns aspectos limitantes da via. Os poloxâmeros são copolímeros sintéticos que exibem um comportamento termoresponsivo, com uma determinada temperatura de transição de sol-gel (*Tsol-gel*), tornando-os amplamente utilizados para diversas aplicações farmacêuticas (SOLIMAN et al., 2019). Estes copolímeros em bloco consistem em blocos de poli (óxido de etileno) hidrofílicos (PEO) e óxidos de poli (óxido de propileno) hidrofóbicos (PPO) dispostos na estrutura tribloco A-B-A: PEO-PPO-PEO (BATRAKOVA; KABANOV, 2008).

O poloxâmero 407 (P407) e o poloxâmero 188 (P188) estão entre os poloxâmeros mais comumente utilizados em sistemas para veiculação de fármacos, como resultado de sua boa solubilidade em água, clareza de suas soluções aquosas, viscosidade dependente da concentração e segurança. A capacidade da transição de sol-gel tem gerado interesse no uso de poloxâmeros para aplicações em sistemas de liberação de fármacos (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; BUJŇÁKOVÁ et al., 2017; DJEKIC et al., 2015; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014).

Devido ao seu caráter anfifílico, estes copolímeros apresentam propriedades surfactantes, incluindo a capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas. Em soluções aquosas a concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) estes copolímeros se organizam em

micelas com diâmetros que geralmente variam de 10 nm a 100 nm (BATRAKOVA; KABANOV, 2008). A gelificação do poloxâmero 407 induzida pela temperatura é explicada no fato de que à medida que a temperatura aumenta, ocorre a dessolvatação do polímero e subsequentemente a micelização, formando um gel viscoso (ZAKI et al., 2007). Além disso, o poloxâmero 407 apresenta baixa toxicidade, compatibilidade com outros produtos químicos e alta capacidade de solubilização de diferentes fármacos (ZHANG et al., 2002).

Em um estudo descrito anteriormente por LALANI et al., (2015) a preparação de NE contendo tramadol, um fármaco que tem ação no SNC, utilizando miristato de isopropila, lecitina de soja e poloxâmero na composição não mostrou toxicidade no epitélio nasal, membrana basal ou na parte superficial da mucosa, mesmo após 2 horas de tratamento. Além disso, a eficiência da liberação cerebral da nanoemulsão foi 116% maior, além de um aumento de 3 a 4 vezes na biodisponibilidade cerebral em relação com a administração i.v. e nasal da solução do medicamento, respectivamente. A atividade antinociceptiva também foi maior para a nanoemulsão após a administração nasal, o que demonstra a adequação e capacidade do sistema de administração. Esse efeito evidencia a permeabilidade cerebral direta do fármaco através de vias olfativas e evitam o efeito de diluição sistêmica (LALANI et al., 2015).

Uma abordagem semelhante foi realizada por Chen et al., 2013 para aumentar a liberação cerebral de curcumina. Neste estudo, o poloxâmero foi utilizado para o desenvolvimento de um gel termorreversível contendo curcumina para administração nasal. O gel otimizado apresentou um tempo de gelificação favorável, liberação controlada, propriedades biológicas seguras além de maior concentração cerebral de curcumina em comparação com a administração intravenosa (CHEN et al., 2013).

Nesse contexto, o desenvolvimento de nanoemulsões com incorporação de polímero de gelificação *in situ* para administração nasal visando à liberação de TMZ no SNC tem grande potencial como uma nova estratégia para o tratamento de glioblastoma.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N. et al. Intranasal delivery of quercetin-loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischaemia. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 717–729, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1337024>>

AHMED, S. et al. Poloxamer-407 thickened lipid colloidal system of agomelatine for brain targeting: Characterization, brain pharmacokinetic study and behavioral study on Wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 181, n. April, p. 426–436, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.016>>

ALAM, M. I. et al. **Strategy for effective brain drug delivery**, 2010.

BAHADUR, S.; PATHAK, K. Expert Opinion on Drug Delivery Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. [s. l.], v. 5247, 2012. a.

BAHADUR, S.; PATHAK, K. Buffered Nanoemulsion for Nose to Brain Delivery of Ziprasidone Hydrochloride: Preformulation and Pharmacodynamic Evaluation. **Current Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 596–607, 2012. b.

BAJERSKI, L. et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 52, n. 3, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502016000300001>>

BASPINAR, Y.; BORCHERT, H. H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions - Is there a benefit of the positive charge? **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 430, n. 1–2, p. 247–252, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.040>>

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.013>>

BRANDES, A. A. et al. Temozolomide in patients with high grade gliomas. **Oncology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 181–186, 2000.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsions As Parenteral Drug Delivery Systems.

Quimica Nova, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BUJŇÁKOVÁ, Z. et al. Preparation, properties and anticancer effects of mixed As₄S₄/ZnS nanoparticles capped by Poloxamer 407. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 71, p. 541–551, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.041>>

CALDERÓ, G.; GARCÍA-CELMA, M. J.; SOLANS, C. Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 353, n. 2, p. 406–411, 2011.

CHEN, X. et al. Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 807–816, 2013.

CHOUHDURY, H. et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Features of Nanoemulsion Following Oral, Intravenous, Topical and Nasal Route. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 2504–2531, 2017.

COLOMBO, M. et al. Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal administration reduces glioma growth in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.055>>

COMFORT, C. et al. Opportunities and Challenges for the Nasal Administration of Nanoemulsions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 356–368, 2015.

DAI, C.; HOLLAND, E. C. Glioma models. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1551, n. 1, p. 19–27, 2001.

DANHIER, F. et al. Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: In vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 481, n. 1–2, p. 154–161, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.051>>

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], 2010.

DJALILIAN, H. R.; SHAH, M. V.; HALL, W. A. Radiographic incidence of multicentric malignant gliomas. **Surgical Neurology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 554–558, 1999.

DJEKIC, L. et al. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 490, n. 1–2, p. 180–189, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.040>>

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

ERYLLMAZ, M. K. et al. Severe periocular bleeding induced by bevacizumab in a patient with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 392–395, 2017.

FACHEL, F. N. S. et al. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery—In vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], 2018.

FANG, C. et al. HHS Public Access. [s. l.], v. 7, n. 12, p. 6674–6682, 2016.

FONSECA, F. N. et al. Mucoadhesive amphiphilic methacrylic copolymer-functionalized poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules for nose-to-brain delivery of olanzapine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1472–1481, 2014.

GAO, H.; PANG, Z.; JIANG, X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 2485–2498, 2013.

GIROLAMI, U.; ANTHONY, D.C.; FROSCH, M. P. O sistema nervoso central. In: **Robbins - Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1153–1211.

GIZURARSON, S. Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery. **Current Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 566–582, 2012.

GRASSIN-DELYLE, S. et al. Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration - Focus on opioids. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 366–379, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.003>>

GROBBEN, B.; DE DEYN, P. P.; SLEGGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 310, n. 3, p. 257–270, 2002.

GUSYATINER, O.; HEGI, M. E. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 51, n. November, p. 50–58, 2018.

HOSNY, K. M.; BANJAR, Z. M. The formulation of a nasal nanoemulsion zaleplon in situ gel for the treatment of insomnia. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1033–1041, 2013.

ILLUM, L. Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 87, n. 1–3, p. 187–198, 2003.

ILLUM, L. Nasal drug delivery - Recent developments and future prospects. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 161, n. 2, p. 254–263, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.024>>

KHAN, A. et al. Brain Targeting of Temozolomide via the Intranasal Route Using Lipid-Based Nanoparticles: Brain Pharmacokinetic and Scintigraphic Analyses. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 3773–3782, 2016. a.

KIM, S. S. et al. Encapsulation of temozolomide in a tumor-targeting nanocomplex enhances anti-cancer efficacy and reduces toxicity in a mouse model of glioblastoma. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 369, n. 1, p. 250–258, 2015. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.08.022>>

KOZLOVSKAYA, L.; ABOU-KAOUD, M.; STEPENSKY, D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 189, p. 133–140, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.053>>

KOZLOVSKAYA, L.; STEPENSKY, D. Quantitative analysis of the brain-targeted delivery of drugs and model compounds using nano-delivery systems. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 17–23, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.028>>

LALANI, J. et al. Brain targeted intranasal delivery of tramadol: Comparative study of microemulsion and nanoemulsion. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 992–1001, 2015.

LAWS, E. R.; SHAFFREY, M. E. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: Implications for clinical management. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], 1999.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 7, p. 614–628, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>>

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

MAHAJAN, H. S. et al. Nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of saquinavir mesylate for brain targeting. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 148–154, 2014.

MESSAOUDI, K. et al. Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1479–1490, 2014.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 310, n. 17, p. 1842–1850, 2013.

PARDESHI, C. V.; BELGAMWAR, V. S. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: An excellent platform for brain targeting. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 957–972, 2013.

PERAZZOLI, G. et al. Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: Implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1–23, 2015.

PISAPIA, D. J. The updated world health organization glioma classification: Cellular and molecular origins of adult infiltrating gliomas. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 141, n. 12, p. 1633–1645, 2017.

RAI, V. K. et al. **Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications**. [s.l.] : Elsevier B.V, 2018. v. 270 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>>

SALAMA, H. A. et al. Phospholipid based colloidal poloxamer-nanocubic vesicles for brain targeting via the nasal route. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 100, p. 146–154, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.05.010>>

SAMIA, O.; HANAN, R.; KAMAL, E. T. Carbamazepine Mucoadhesive Nanoemulgel (MNEG) as brain targeting delivery system via the olfactory

mucosa. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 58–67, 2012.

SHAH, L.; YADAV, S.; AMIJI, M. **Nanotechnology for CNS delivery of bio-therapeutic agents**, 2013.

SHELKE, S. et al. Poloxamer 407-based intranasal thermoreversible gel of zolmitriptan-loaded nanoethosomes: formulation, optimization, evaluation and permeation studies. **Journal of Liposome Research**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 313–323, 2016.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 252, p. 28–49, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>>

SOLIMAN, K. A. et al. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.036>>

SOOD, S.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN, K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 113, p. 330–337, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.030>>

STUPP. Stupp trial (5y) 5yOS 10v2% MS 12 v 14.6mo. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204509700257>>

STUPP, R. et al. 2005STUPP rt + tmz. **N Engl J Med**, [s. l.], v. 352, p. 987–96, 2005. Disponível em: <www.nejm.org>

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Nanoemulsions: Increasing possibilities in drug delivery. **European Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 97–110, 2013.

TORCELLO-GÓMEZ, A. et al. Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 206, p. 414–427, 2014.

TRINH, V. A.; PATEL, S. P.; HWU, W. The safety of temozolomide in the treatment of malignancies. [s. l.], p. 493–500, 2009.

VELDHORST-JANSSEN, N. M. L. et al. A review of the clinical pharmacokinetics of opioids, benzodiazepines, and antimigraine drugs delivered intranasally. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2954–2987, 2009.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2009.12.015>>

WHITELAW, B. C. How and when to use temozolomide to treat aggressive pituitary tumours. **Endocrine-Related Cancer**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. R545–R552, 2019.

WIRSCHING, H.-G.; GALANIS, E. Chapter 23 – Glioblastoma. **Handbook of Clinical Neurology**, [s. l.], v. 134, p. 381–397, 2016.

YADAV, S. et al. Comparative biodistribution and pharmacokinetic analysis of cyclosporine-A in the brain upon intranasal or intravenous administration in an oil-in-water nanoemulsion formulation. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1523–1533, 2015.

ZAKI, N. M. et al. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 32, n. 4–5, p. 296–307, 2007.

ZHANG, J.; F.G. STEVENS, M.; D. BRADSHAW, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 102–114, 2011.

ZHANG, L. et al. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 85, n. 1–3, p. 73–81, 2002.

CAPÍTULO I

Artigo publicado no periódico *Biomedical Chromatography*. 2019;33:e4615.

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 46 – 72.

MICHELS, L.R; FACHEL, A. N. S.; AZAMBUJA, J. H.; GELSLEICHTER, N. E.; BRAGANHOL, E.; TEIXEIRA, H. F. HPLC-UV method for temozolomide determination in complex biological matrices: application for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies. ***Biomedical Chromatography***. 2019;33:e4615.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 74 – 111 foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 112 – 161, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

O texto completo da discussão geral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 162 – 169, foi suprimido por tratar-se de conteúdo que compõe periódico científico em preparação para publicação.

Por meio do estudo realizado pode-se concluir que:

- O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação da temozolomida em nanoemulsões, mucosa nasal suína, fluido receptor, linhagem celular de glioma, meio de cultura, cérebro e plasma de camundongos apresentou-se sensível, específico, linear, preciso, exato e robusto;
- Foram obtidas nanoemulsões com diâmetro adequado, monodispersas, com potencial zeta negativo e teor próximo a 100%.
- A adição do poloxâmero 407 nas nanoemulsões promoveu um aumento na viscosidade e a característica de termogelificação. Além disso, foi possível obter uma liberação controlada do fármaco, aumento da força mucoadesiva e conseqüentemente uma maior retenção do fármaco na mucosa nasal.
- As nanoemulsões apresentaram maior atividade citotóxica em relação ao fármaco livre em linhagem celular de glioblastoma em ratos.
- A administração nasal das nanoemulsões contendo poloxâmero 407 aumentou a concentração da temozolomida no cérebro e conseqüente redução na distribuição plasmática.
- A administração nasal da NTMZ-P10 reduziu de modo significativo o volume tumoral em comparação com a administração do fármaco na forma livre (F-TMZ).
- O teste olfatório demonstrou que o tratamento adotado pela via nasal não ofereceu danos à capacidade olfativa dos animais.

- Os resultados das análises bioquímicas realizadas no soro dos animais ao final do experimento *in vivo* evidenciaram que as nanoemulsões não promoveram toxicidade após duas semanas de tratamento.
- Os dados do teste olfativo mostraram que o esquema de administração 2 vezes ao dia por 15 dias não afetou a capacidade dos nervos olfativos dos animais, provando que o tratamento através da via nasal é bem tolerado.
- Levando em consideração todos os resultados apresentados, pode-se inferir que a NTMZ-P10 pode ser considerado um sistema promissor para o tratamento de glioblastoma.

REFERÊNCIAS

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 152, p. 63–82, 2015.

AZAMBUJA, J. H. et al. Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as CD73-siRNA Delivery System for Glioblastoma Treatment: a New Therapeutical Approach. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], 2019.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.013>>

BUJŇÁKOVÁ, Z. et al. Preparation, properties and anticancer effects of mixed As₄S₄/ZnS nanoparticles capped by Poloxamer 407. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 71, p. 541–551, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.041>>

BUMCROT, D. et al. RNAi therapeutics: A potential new class of pharmaceutical drugs. **Nature Chemical Biology**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 711–719, 2006.

CHEN, X. et al. Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 807–816, 2013.

CHOUDHURY, H. et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Features of Nanoemulsion Following Oral, Intravenous, Topical and Nasal Route. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 2504–2531, 2017.

DANSON, S. et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 90, n. 11, p. 2085–2091, 2004.

DONG, C. G. et al. Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells. **International Journal of Oncology**, [s. l.], 2012.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

FURUBAYASHI, T. et al. Influence of formulation viscosity on drug absorption following nasal application in rats. **Drug metabolism and pharmacokinetics**,

[s. l.], v. 22, n. 3, p. 206–211, 2007.

HE, C.; KIM, S. W.; LEE, D. S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 189–207, 2008.

HUANG, J. L. et al. Lipoprotein-biomimetic nanostructure enables efficient targeting delivery of siRNA to Ras-activated glioblastoma cells via macropinocytosis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, n. May, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15144>>

JONES, D. S.; BROWN, A. F.; WOOLFSON, A. D. Solute and solvent effects on the thermorheological properties of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers: Implications for pharmaceutical dosage form design. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 87, n. 6, p. 1016–1026, 2002.

KABANOV, A. V. et al. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-6-oxypropylene-6-oxyethylene) Solutions. **Macromolecules**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 2303–2314, 1995.

KHAN, A. et al. Brain Targeting of Temozolomide via the Intranasal Route Using Lipid-Based Nanoparticles: Brain Pharmacokinetic and Scintigraphic Analyses. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 3773–3782, 2016.

KHAN, A. et al. Temozolomide loaded nano lipid based chitosan hydrogel for nose to brain delivery: Characterization, nasal absorption, histopathology and cell line study. [s. l.], n. 2017, p. #pagerange#, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.079>>

KIM, S. S. et al. Encapsulation of temozolomide in a tumor-targeting nanocomplex enhances anti-cancer efficacy and reduces toxicity in a mouse model of glioblastoma. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 369, n. 1, p. 250–258, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.08.022>>

LIANG, E.; AJMANI, P. S.; HUGHES, J. A. **Oligonucleotide delivery: A cellular prospective**, 1999.

MISHRA, P. R. et al. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 371, n. 1–2, p. 182–189, 2009.

MISTRY, A.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 379, n. 1–2, p. 146–157, 2009.

MURA, P. et al. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. 1.], v. 122, p. 54–61, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.008>>

OLIVA, C. R. et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, [s. 1.], 2010.

QIAN, X. et al. Sequence-dependent synergistic inhibition of human glioma cell lines by combined Temozolomide and miR-21 inhibitor gene therapy. **Molecular Pharmaceutics**, [s. 1.], 2012.

RAMIREZ, Y. P. et al. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. **Pharmaceutics**, [s. 1.], v. 6, n. 12, p. 1475–1506, 2013.

RICCI, E. J. et al. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. 1.], v. 288, n. 2, p. 235–244, 2005.

RODRIGUES, S. F. et al. Lipid-core nanocapsules act as a drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. 1.], 2016.

SHELKE, S. et al. Poloxamer 407-based intranasal thermoreversible gel of zolmitriptan-loaded nanoethosomes: formulation, optimization, evaluation and permeation studies. **Journal of Liposome Research**, [s. 1.], v. 26, n. 4, p. 313–323, 2016.

SOLIMAN, K. A. et al. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. **Drug Discovery Today**, [s. 1.], v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.036>>

TAYLOR, J. W.; SCHIFF, D. Treatment Considerations for MGMT-Unmethylated Glioblastoma. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. 1.], v. 15, n. 1, p. 1–6, 2015.

YADAV, S. et al. Comparative biodistribution and pharmacokinetic analysis of cyclosporine-A in the brain upon intranasal or intravenous administration in an oil-in-water nanoemulsion formulation. **Molecular Pharmaceutics**, [s. 1.], v. 12, n. 5, p. 1523–1533, 2015.

ZAKI, N. M. et al. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties. **European Journal of**

Pharmaceutical Sciences, [s. l.], v. 32, n. 4–5, p. 296–307, 2007.

ZHANG, J.; F.G. STEVENS, M.; D. BRADSHAW, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 102–114, 2011.

ZHOU, M. et al. H7K(R2)2-modified pH-sensitive self-assembled nanoparticles delivering small interfering RNA targeting hepatoma-derived growth factor for malignant glioma treatment. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 310, n. May, p. 24–35, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.010>>



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO**

1) PROTOCOLO Nº: 218/17 **Parecer 572/18**

2) DATA DO PARECER: 08/08/2018

3) TÍTULO DO PROJETO:

Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo temozolamida associados às sequências de siRNA para tratamento de gliomas através da via intranasal.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Elizandra Braganhol

5) RESUMO DO PROJETO:

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Objetivo geral: desenvolver sistemas nanoparticulados (NE-nanoemulsões) com incorporação de temozolamida (TMZ), revestidos por polímero mucoadesivo e associado às sequências de siRNA para a enzima MGMT na superfície. A partir desse sistema, pretende-se promover uma seletividade do fármaco ao sistema nervoso central (SNC) a partir da via nasal, além de contornar a resistência desenvolvida pelo tumor ao tratamento com a TMZ.

7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Os pesquisadores classificam como grau de invasividade 1. Sugere-se rever para 2.

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Comentários a seguir. Foi devidamente justificado o não uso de analgésicos.

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório):

Laboratório de Cultivo Celular e Biotério.
Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
------	---------	------	------------

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado

Data de início 01/01/2018 Data de Término 01/01/2022

Comentários gerais sobre o projeto:

Aprovado adendo de solicitação de alteração de espécie, em função da obtenção de maior quantidade de amostra, adequando a avaliação das variáveis e fundamentação dos resultados.