

## **RESSALVA**

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo deste  
documento será disponibilizado  
somente a partir de 26/06/2028.

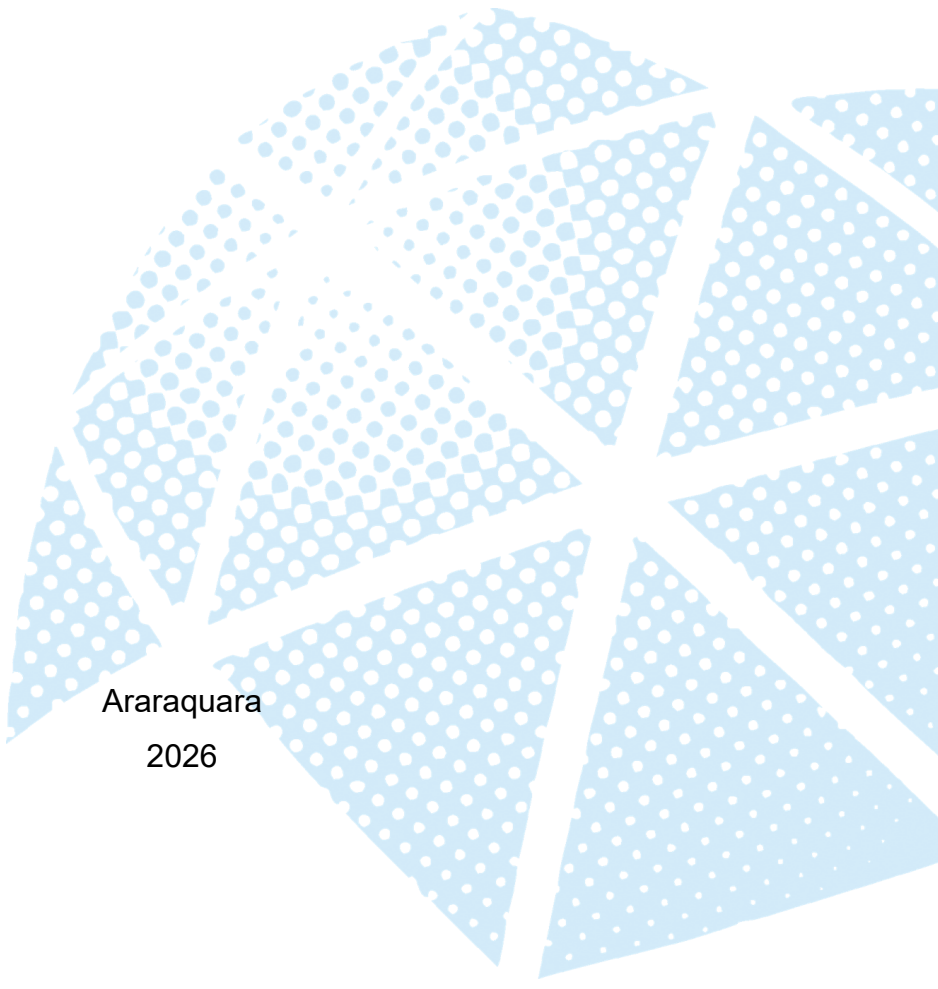
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**JESSYCA APARECIDA PAES DUTRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM  
TRANSFERRINA DISPERSOS EM HIDROGÉIS MUCOADESIVOS PARA  
ADMINISTRAÇÃO NASAL DE TEMOZOLOMIDA NO TRATAMENTO DO  
GLIOBLASTOMA**

Araraquara

2026



**JESSYCA APARECIDA PAES DUTRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM  
TRANSFERRINA DISPERSOS EM HIDROGÉIS MUCOADESIVOS PARA  
ADMINISTRAÇÃO NASAL DE TEMOZOLOMIDA NO TRATAMENTO DO  
GLIOBLASTOMA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Grau acadêmico Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Tavares Guiguer

Coorientador: Prof. Dr. Bruno da Fonseca dos Santos

Araraquara

2026

---

**D978a** Dutra, Jessyca Aparecida Paes.  
Avaliação do potencial de lipossomas funcionalizados com transferrina dispersos em hidrogéis mucoadesivos para administração nasal de temozolomida no tratamento do glioblastoma / Jessyca Aparecida Paes Dutra. – Araraquara, 2026.  
174 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.  
Coorientadora: Marcela Tavares Guiguer.  
Coorientador: Bruno da Fonseca dos Santos.

1. Direcionamento ativo. 2. Gliomas. 3. Astrocitoma. 4. Nanopartículas. 5. Goma gelana. 6. Poloxâmer. 7. Termorresponsivo. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Guiguer, Marcela Tavares, coorient. III. Santos, Bruno da Fonseca dos, coorient. IV. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM TRANSFERRINA DISPERSOS EM HIDROGÉIS MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO NASAL DE TEMOZOLOMIDA NO TRATAMENTO DO GLIOBLASTOMA

AUTORA: JESSYCA APARECIDA PAES DUTRA

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

COORIENTADOR: BRUNO GUIMARÃES DA FONSECA DOS SANTOS

COORIENTADORA: MARCELA TAVARES GUIGUER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Presencial)

Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Profa. Dra. LETICIA SCHERER KOESTER (Participação Virtual)

Faculdade de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. ENEIDA DE PAULA (Participação Virtual)

Departamento de Biologia / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. STEPHANIA FLEURY TAVEIRA (Participação Virtual)

Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. OMAR MERTINS (Participação Virtual)

Departamento de Biofísica / Universidade Federal de São Paulo

Araraquara, 26 de junho de 2026.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus e às grandes forças que me guiaram até a finalização deste trabalho. Foram horas dedicadas à conclusão de um projeto que, desde sua concepção inicial, ao longo dos meses e anos, foi reestruturado, repensado e refeito. Sem acreditar que tudo tem um propósito, eu não estaria finalizando esta etapa. Agradeço, portanto, a Jessyca, que, na vontade iminente de desistir algumas vezes, permaneceu firme, acreditando em propósitos que muitas vezes eram abstratos. Agradeço imensamente à minha família: meu pai, Sandro; minha mãe, Eliane; minha irmã, Bianca; e minha sobrinha, Ana Lis, que entendem a minha ausência e permanecem apoiando minhas escolhas. Agradeço, imensamente, ao meu noivo, João Otávio, que esteve presente em todos os momentos, me apoiando, entendendo verdadeiramente cada passo e participando de cada etapa, tanto nas alegres quanto nas mais difíceis. Obrigada por ter me sustentado quando já não havia mais forças me fazendo ser melhor a cada dia.

Na minha jornada acadêmica, passei por diferentes centros acadêmicos e por diferentes orientações, e não poderia deixar de ser grata a toda essa estrutura pública que me fez quem eu sou. Sou grata à Universidade Federal do Espírito Santo e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, instituições que persistem diante de todas as intempéries governamentais e contribuem para a formação acadêmica de milhares de alunos, promovendo sonhos e gerando oportunidades. Agradeço a cada mestre, orientador e coorientador que tive durante toda a minha trajetória, por terem participado da minha formação e por terem me moldado profissionalmente por meio de distintas formas de orientação e ensino.

Em especial, agradeço ao meu orientador e professor Dr. Marlus Chorilli, que abriu as portas para que eu iniciasse mais um sonho e que, mesmo diante dos desgastes diários do doutorado, sempre acreditou, incentivou e fazia tudo parecer mais ameno. Professor, sou muito grata a você por ter oportunizado não apenas a realização de um doutorado em um programa conceituado dentro de uma universidade de excelência, mas também por ter permitido a internacionalização, um sonho muito distante para alunos de outros estados. Eternizo nestes agradecimentos toda a gratidão que tenho, ainda que palavras sejam insuficientes para descrevê-la. Agradeço à minha coorientadora, Dra. Marcela Tavares Luiz, que ouviu incansavelmente minhas lamúrias e embarcou nas minhas ideias, desdobrando-se com meus questionamentos. Obrigada por estar presente mesmo diante do desafio de ser mãe, profissional, esposa e filha. Sou grata a vocês por confiarem no meu trabalho e me darem liberdade para executar e desenvolver minhas ideias, por mais improváveis que fossem.

Agradeço aos meus queridos amigos, presenteados pelo doutorado e pela vida, que escolheram conviver comigo, aceitando minha personalidade, respeitando meu tempo e estando disponíveis sempre que precisei. Que me proporcionaram risadas e choros, que me fizeram refletir sobre a vida mesmo sem perceberem, e que, de alguma forma, me tornaram melhor. Levarei um pedaço de vocês na minha essência. Obrigada por tudo: Amanda, Victor, Alberto, Jennifer, Leonardo, Suzana, Geanne, Rita Cristina, Vitória e Vinycius. Em especial, agradeço aos meus mais íntimos amigos Winner, Suzana, Geanne e Rita, que me conhecem melhor do que eu mesma e estão comigo

independentemente de como eu esteja partilhando cada momento, vocês são parte de quem eu sou.

Aos meus colegas e amigos de profissão, com os quais compartilhei conhecimentos e aprendizados, especialmente àqueles que me deram muito mais do que um auxílio no final deste projeto, sendo parte essencial para a realização de alguns ensaios, em especial Alberto, Felipe, Suzana e Rita. E a toda a minha rede de apoio de amigos, que, mesmo distantes, estão presentes.

Sou grata a todas as agências de fomento que fizeram parte direta e indiretamente de toda a minha trajetória acadêmica e minha formação, dentre elas CAPES, FAPES, CNPq, FINEP, BNDES/EMBRAPPI e FAPESP, esta última que me forneceu auxílio financeiro para custeio deste projeto, bem como para a realização do Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE). Sou grata à UNESP e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela estrutura física fornecida para a execução dos projetos. Sou grata às parcerias que fizeram parte deste trabalho, incluindo o Istituto Italiano di Tecnologia de Pontedera (IIT-Pontedera), na Itália.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, processo nº 2021/02609-9. E bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), processo nº 2023/15267-4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O glioblastoma (GBM) é um tumor cerebral sólido difuso de alta agressividade. A temozolomida (TMZ), único fármaco disponível para o tratamento, torna-se pouco eficaz devido à baixa distribuição cerebral, visto que é um pró-fármaco que se hidrolisa ao cátion metildiazônico, metabólito ativo, em pH fisiológico (pH 7,4). Portanto, o presente trabalho visou desenvolver, caracterizar e avaliar lipossomas contendo TMZ funcionalizados com transferrina (Tf) para a entrega ao cérebro via administração intranasal objetivando maior disponibilidade cerebral da TMZ. Os lipossomas (LIP) foram obtidos via hidratação do filme lipídico, seguido de extrusão para posterior conjugação com Tf. Os lipossomas foram funcionalizados via processos distintos, maleímida e carbodiimida, sendo que em ambos os processos os lipossomas mostraram-se monodispersos ( $PDI < 0,2$ ) de tamanho reduzido ( $< 200$  nm) e carga superficial negativa e positiva, respectivamente. A análise de eficiência de conjugação e da integridade da proteína mostraram que o processo de conjugação via maleímida mantém a proteína mais estável comparado ao processo via carbodiimida, sendo, portanto, o método escolhido. A inserção do fármaco não alterou as propriedades coloidais das formulações LIP e LIP TF, obtida via maleímida, com os dados de rastreamento de partícula confirmando a homogeneidade e o tamanho da amostra, que se mostraram estáveis por 90 dias e biocompatíveis quando avaliados via HET-CAM. A formulação LIP TMZ apresentou maior eficiência de encapsulação ( $68,45 \pm 9,48$ ) comparada aos LIP TMZ TF ( $37,95 \pm 4,17$ ), porém ambos os lipossomas apresentaram propriedade de liberação controlada com perfis semelhantes em pH 6,4 e 5,1, indicando a capacidade em conter o fármaco durante a administração nasal e na presença de compartimentos celulares ácidos. A interação com proteínas do soro demonstrou a estabilidade do sistema frente a meios biologicamente relevantes, à medida que a atividade sob esferoides de GBM em 72 h dos LIP TMZ TF – viabilidade de ~40%, demonstrou o potencial biológico desses nanossistemas. A incorporação dos lipossomas nos hidrogéis de poloxâmer e goma gelana (20:0,01%, m/v) através da gelificação direta foi observada pela mudança da rugosidade superficial dos hidrogéis analisada por MEV e mudanças na entalpia do sistema por DSC. Os resultados de análise de regime estacionário e oscilatório demonstram que a incorporação dos lipossomas não alterou a resposta à temperatura do poloxâmer, ao passo que as análises de textura e mucoadesão na presença de fluido nasal evidenciam que a concentração de goma gelana ocasiona uma resposta ao nível micro-estrutural da matriz, aumentando sua coesão e adesividade. Considerando a agressividade do GBM e a limitada opção terapêutica os resultados sugerem que o sistema ou os lipossomas individualizados possuem potencial para aumentar a interação com células tumorais reduzindo a perda sistêmica devido à via proposta, contribuindo para o desenho experimental de estudos futuros envolvendo plataformas de administração nasal para entrega de sistema lipossomais ao cérebro.

**Palavras-chave:** direcionamento ativo; glioma; astrocitoma; nanopartícula; goma gelana; poloxâmer; termorresponsivo.

## ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is a highly aggressive diffuse solid brain tumor. Temozolomide (TMZ), the only drug available for treatment, is not very effective due to its poor distribution in the brain, as it is a prodrug that hydrolyzes to the methyl diazonium cation — the active metabolite — at physiological pH (pH 7.4). Therefore, the present study aimed to develop, characterize, and evaluate TMZ-containing liposomes functionalized with transferrin (Tf) for delivery to the brain via intranasal administration, with the goal of increasing the cerebral availability of TMZ. The liposomes (LIP) were prepared by hydration of a lipid film, followed by extrusion and subsequent conjugation with Tf. The liposomes were functionalized using two distinct processes—maleimide and carbodiimide—and in both processes, the liposomes were found to be monodisperse ( $PDI < 0.2$ ) with small sizes ( $< 200$  nm) and negative and positive surface charges, respectively. Analysis of conjugation efficiency and protein integrity showed that the maleimide-mediated conjugation process maintains greater protein stability compared to the carbodiimide-mediated process; therefore, the maleimide method was selected. The incorporation of the drug did not alter the colloidal properties of the LIP and LIP TF formulations, prepared via maleimide, with particle tracking data confirming the homogeneity and size of the sample, which remained stable for 90 days and were biocompatible when evaluated via HET-CAM. The LIP TMZ formulation exhibited higher encapsulation efficiency ( $68.45 \pm 9.48$ ) compared to LIP TMZ TF ( $37.95 \pm 4.17$ ), however, both liposomes exhibited controlled-release properties with similar profiles at pH 6.4 and 5.1, indicating their ability to retain the drug during nasal administration and in the presence of acidic cellular compartments. Interaction with serum proteins demonstrated the system's stability in biologically relevant environments, as the activity of LIP TMZ TF on GBM spheroids at 72 hour with a viability of  $\sim 40\%$ —demonstrated the biological potential of these nanosystems. The incorporation of liposomes into poloxamer and gellan gum hydrogels (20:0.01%, w/v) via direct gelation was observed through changes in the surface roughness of the hydrogels, as analyzed by SEM, and changes in the system's enthalpy, as measured by DSC. The results of steady-state and oscillatory regime analyses demonstrate that the incorporation of liposomes did not alter the temperature response of poloxamer, whereas texture and mucoadhesion analyses in the presence of nasal fluid show that the concentration of gellan gum induces a response at the microstructural level of the matrix, increasing its cohesion and adhesiveness. Given the aggressiveness of GBM and the limited treatment options, the results suggest that the system or the individualized liposomes have the potential to increase interaction with tumor cells while reducing systemic loss due to the proposed route, thereby contributing to the experimental design of future studies involving nasal administration platforms for delivering liposomal systems to the brain.

**Keywords:** active targeting; glioma; astrocytoma; nanoparticle; gellan gum; poloxamer; thermoresponsive hydrogel.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** — Esquema da conversão da TMZ ao cátion metildiazônio. A imagem ilustra a hidrólise não enzimática da TMZ em condições com pH acima de 5, seguida da conversão nos produtos de hidrólise em pH inferior a 5 até formação do íon alquilante metildiazônio. -----23
- Figura 2** — Representação esquemática das vias de transporte e captação neural na cavidade nasal. -----33
- Figura 3** — Representação esquemática da estrutura química da goma gelana e poloxâmer. -----37
- Figura 4** — Esquema do processo de funcionalização dos lipossomas com transferrina via maleímida. A primeira etapa mostra a ativação da transferrina com o Traut, e a segunda etapa mostra o processo de bioconjugação da transferrina ativada com o grupo maleímida do lipossoma. -----48
- Figura 5** — Esquema do processo de funcionalização dos lipossomas com transferrina via reação por carbodiimida. A primeira etapa mostra a ativação da transferrina com EDC e NHS, e a segunda etapa mostra o processo de bioconjugação da transferrina ativada com o grupo amina dos lipossomas. ---49
- Figura 6** — Cromatograma da temozolomida (5 µg/mL) em solução acética (0,5%) e fase móvel acética 0,5%v (pH 3,2): metanol (70:30). -----66
- Figura 7** — Curva analítica da temozolomida obtida no processo de validação por CLAE. A figura mostra os valores de coeficiente angular ( $\alpha$ ), coeficiente linear (b), coeficiente de correlação (r), equação da reta seguida do  $R^2$ , obtidos pela curva de mili-absorbância por segundos (mAU.s) em relação a concentração de TMZ (µg.mL).-----67
- Figura 8** — Representação gráfica da dispersão dos resíduos dos valores da curva analítica da TMZ. -----68
- Figura 9** — Cromatogramas sobrepostos dos componentes das formulações. Rosa: DPPC; Verde: Colesterol; Azul: DSPE-PEG; Roxo: solução de temozolomida (30µg/mL).-----71
- Figura 10** — Representação gráfica da influência do pH no comportamento interfacial da carga da TMZ em solução aquosa acidificada (10 mg/mL) (n=3) -----73
- Figura 11** — Resultados do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas. LIPMAL: DPPC:Colesterol:DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Maleimida (6,6: 3: 0,4; %mol); LIPCAR: DPPC:Colesterol:DSPE-PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> (6,6: 3: 0,4; %mol); D1: 24h. \* p< 0,05: diferença estatística avaliada através da análise de variância de duas vias. Resultados representam a média e o desvio padrão (n=3).-----76
- Figura 12** — Análise de SDS-Page das amostras e proteína. Funcionalização das formulações de lipossomas via reagente de traute (A) ou via carbodiimida (B), sendo, P: padrão de peso, Tf: transferrina em PBS-EDTA 5 mM pH 8 (A) ou pH 6 (B), Fr: frações ativadas, lipossomas com uma hora de ativação e diferentes horas de reação, LIPMAL ou LIPCAR: lipossomas sem funcionalizantes. -----81
- Figura 13** — Espectro de absorção na região do UV/Vis para a transferrina em solução (Tf), lipossomas funcionalizados (LIPMAL + TF e LIPCAR + TF),

Lipossomas sem funcionalização (LIPMAL e LIPCAR) e frações de ativação para ambos os protocolos de conjugação (A) via maleimida, pH 8.0 e (B) via carbodiimida, pH 6.0. Espectros coletados em comprimento de excitação de 195-800 nm e cubeta de quartzo de 1 cm. -----83

**Figura 14** — Espectro de dicroísmo circular da transferrina em solução aquosa (Tf) e de lipossomas funcionalizados (LIP) para ambos os protocolos de conjugação (A) via maleimida e (B) via carbodiimida. Comprimento de excitação 195-300 nm, cubeta de quartzo 0,1cm. -----84

**Figura 15** — Análise da estrutura secundária da transferrina livre (TF, RSMD 0.115) e dos sistemas funcionalizados via maleimida (LIPMAL, RSMD 0.117) e carbodiimida (LIPCAR, RSMD 0.039) obtida por deconvolução dos espectros de dicroísmo circular usando o software BeStSel (Protein Circular Dichroism Spectra Analysis). O gráfico de barras empilhadas apresenta a distribuição percentual das subcategorias estruturais, e a tabela complementar apresenta os percentuais totais agrupados de estruturas  $\alpha$ -helicoidais e  $\beta$ -sheet e outras para cada amostra. Ao lado é mostrada a estrutura da proteína no seu estado saturado com ferro retirado do protein data bank [222].-----85

**Figura 16** — Espectros de absorvância (u.a) por FTIR dos componentes isolados e das formulações lipossomais, obtidos na faixa de 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . TF: fração de transferrina ativa via Traut, LIP: lipossomas, LIP TMZ: lipossomas com temozolomida, LIP TF: lipossomas com transferrina, LIP TMZ TF: lipossomas conjugados com transferrina contendo TMZ.-----91

**Figura 17** — Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com contraste negativo (acetato uranila 2%) de formulações lipossomais. (A) Lipossomas contendo temozolomida com magnificação de 25k $\times$  e (B) Lipossomas funcionalizados com transferrina carregados com temozolomida com magnificação de 45k $\times$ .-----93

**Figura 18** — Avaliação da estabilidade coloidal das formulações lipossomais ao longo de 90 dias de armazenamento (4°C). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de duas amostras independentes com quatro leituras por ponto temporal (n = 4), com potencial zeta avaliado em modo automático e tamanho com 10 medidas repetidas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa (p < 0,05) ao longo do tempo para uma mesma formulação comparado ao Dia 0, avaliada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparação de Bonferroni. -----94

**Figura 19** — Gráficos de liberação da TMZ em tampão acetato pH 5.1 (A) e FNS pH 6.3 (B). Os gráficos mostram o perfil de liberação cumulativa (%) de TMZ a partir de LIP TMZ e LIP TMZ TF e do fármaco livre. Os dados são expressos como média e desvio padrão de três formulações (n=3).-----97

**Figura 20** — Análise da interação *in vitro* de dispersões de lipossomas em 3 diferentes concentrações de mucina previamente preparada em FNS (pH 6,3) e lipossomas livres em solução de FNS. Resultados expressos pela média e desvio padrão de 2 amostras distintas e três leituras de densidade de carga. LIP: lipossomas vazios, LIP TMZ: lipossoma com temozolomida, LIP TF: lipossoma funcionalizado com transferrina, e LIP TMZ TF: Lipossomas com temozolomida funcionalizado com transferrina. ----- 101

**Figura 21** — Avaliação do potencial irritativo das formulações pelo ensaio HET-CAM. (A) Imagens representativas da membrana corioalantoide (CAM) nos

tempos de 0 e 300 s; setas indicam hemorragia, (B) Pontuação de irritação e classificação HET-CAM e (C) Gráfico com a taxa de sobrevida analisada até 600s.----- 104

**Figura 22** — Avaliação da formação de corona proteica e da estabilidade coloidal das formulações lipossomais em meio biológico ao longo de 2 h de incubação. (A) LIP, (B) LIP TMZ e (C) LIP TMZ TF incubadas em tampão HEPES 10 mM e DMEM + 10% SFB e análise do diâmetro hidrodinâmico médio (barras) e índice de polidispersão (PDI) (linhas vermelhas). (D) Potencial zeta das formulações em HEPES 10 mM e DMEM + 10% SFB ao longo do tempo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=2). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Kruskal–Wallis para comparação entre os tempos de análise, e ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni para comparação entre as formulações e condições experimentais. Letras diferentes (a–c) indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores de diâmetro ou potencial zeta em HEPES 10 mM, enquanto letras diferentes (x–z/w) indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores de PDI ou potencial zeta em DMEM + 10% SFB ( $p < 0,05$ ).----- 106

**Figura 23** — Avaliação da atividade metabólica celular de células U87-MG após tratamento com as formulações lipossomais e TMZ livre por (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=2). ••• indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TMZ; #### indica diferença estatisticamente significativa em relação a presença de transferrina (LIP TMZ vs. LIP TMZ TF); e \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao lipossoma vazio (LIP) realizada por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos em um mesmo tempo experimental ( $p < 0,05$ ). 108

**Figura 24** — Avaliação quantitativa e qualitativa da interação de lipossomas com células U87 MG por citometria de fluxo (painel superior) e por microscopia de confocal (painel inferior) após 4h. Os dados representam a intensidade média de fluorescência (IMF) e o percentual de células positivas para DiO sendo (A) células basais, (B) LIP (C) LIP TF e (D) Percentual de células positivas para os tratamentos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3) e significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey com avaliação da homogeneidade pelo teste de Levene ( $p = 0,349$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Barra de escala de 100 $\mu$ m. ----- 111

**Figura 25** — Avaliação quantitativa e qualitativa da interação de lipossomas com células U87 MG por citometria de fluxo (painel superior) e por microscopia de confocal (painel inferior) após 24h. Os dados representam a intensidade média de fluorescência (IMF) e o percentual de células positivas para DiO sendo (A) células basais, (B) LIP (C) LIP TF e (D) Percentual de células positivas para os tratamentos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3) e significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey com avaliação da homogeneidade pelo teste de Levene ( $p = 0,064$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Barra de escala de 100 $\mu$ m. ----- 113

**Figura 26** — valiação da internalização intracelular das formulações LIP e LIP-TF em células U87-MG após 24 h de incubação por microscopia confocal. O

painel superior apresenta a marcação de clatrina, enquanto o painel inferior apresenta a marcação de caveolina-1. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst (azul), as formulações fluorescentes com DiO (verde) e os marcadores endocíticos em vermelho. Barra de escala 100µm. ----- 114

**Figura 27** — Avaliação da internalização intracelular das formulações LIP e LIP-TF em células U87-MG após 24 h de incubação por microscopia confocal. O painel apresenta a marcação de pinossomos via o reagente Cascade-Blue®. Os pinossomos estão corados de azul, as formulações fluorescentes com DiO de verde. Barra de escala 100µm.----- 116

**Figura 28** — Avaliação do destino intracelular das formulações LIP e LIP-TF em células U87-MG após 24 h de incubação por microscopia confocal. O painel apresenta a marcação da via endossomal-lisossomal via sonda fluorescente LysoTracker®. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst (azul), as formulações fluorescentes com DiO (verde) e a via endossomal-lisossomal em vermelho. Barra de escala 100µm.----- 117

**Figura 29** — Avaliação da atividade metabólica celular de células U251 após tratamento com as formulações lipossomais e TMZ livre por (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n=2). \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TMZ; ### indica diferença estatisticamente significativa em relação a presença de transferrina (LIP TMZ vs. LIP TMZ TF); e \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao lipossoma com transferrina (LIP TF) e o lipossomas com transferrina e TMZ (LIP TMZ TF) realizada por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos em um mesmo tempo experimental ( $p < 0,05$ ).----- 119

**Figura 30** — Representação esquemática da obtenção e avaliação da atividade citotóxica dos lipossomas em esferoides de monocultura de células U-251 MG. No painel esquerdo, ilustra-se o processo de formação dos esferoides utilizando micro-moldes de ágar/silicone a partir de 2500 células individuais por poço. A viabilidade celular e o crescimento estrutural foram monitorados a cada dois dias utilizando o ensaio de resazurina. No 5º dia os esferoides foram tratados (painel direito) e expostos às formulações lipossomais (LIP, LIP TMZ e LIP TMZ TF) nas concentrações de 250, 325 e 500 µM. Após o período de incubação de 72 horas, 5 esferóide por tratamento e concentração foram transferidos para placas de luminescência e a atividade metabólica e a viabilidade celular intrínseca dos esferoides foi avaliada por luminescência usando CellTiter-Glo® 3D. ----- 121

**Figura 31** — Formação e caracterização de esferoides de GBM em monocultura de tumor U-251 ao longo de 5 dias. Painel superior mostra as imagens de microscopia de campo claro da morfologia de dos esferoides em monocultura seguida de gráfico de atividade metabólica e diâmetro médio dos esferoide ao longo de 5 dias. Painel inferior mostra os esferoides após tratamento de 72 horas na concentração de 500 µM para os diferentes tratamentos seguido de gráfico da atividade metabólica nas três concentrações testadas ( 250, 325 e 500 µM). Os resultados são expressos como média e desvio padrão com Anova de duas vias e pós teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TMZ; ### indica diferença estatisticamente significativa em relação a presença de transferrina (LIP TMZ vs. LIP TMZ TF); e \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação controle. Barra de escala: 100 µm.----- 123

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 32</b> — Análise macroscópica das soluções de goma gelana em diferentes concentrações (m/v %) preparados em tampão fosfato de sódio (30 mM).---                                                                                                                                  | 126 |
| <b>Figura 33</b> — Caracterização reológica dos hidrogéis baseados em poloxâmer 407 (25% m/v) incorporados com concentrações crescentes de goma gelana (GG: 0,010%; 0,015% e 0,020% m/v). -----                                                                                            | 129 |
| <b>Figura 34</b> — Caracterização reológica dos hidrogéis baseados em poloxâmer 407 (20% m/v) incorporados com 0,010% de goma gelana (GG). -----                                                                                                                                           | 131 |
| <b>Figura 35</b> — Aspecto físico dos hidrogéis de poloxâmer à 20% e goma gelana 0,001%.-----                                                                                                                                                                                              | 132 |
| <b>Figura 36</b> — Micrografias dos hidrogéis após liofilização. (A) Hidrogel sem lipossomas, Plx:GG:PBS e (B) hidrogéis com lipossomas, Plx:GG: LIP TMZ TF com magnificação de 60 <sup>x</sup> . Barra de escala: 10 µm. -----                                                            | 133 |
| <b>Figura 37</b> — termogramas de goma gelana em pó (GG), poloxâmer 407 floculado (PLX), gel de poloxâmer à 20% (PLX 20%), hidrogel de poloxâmer à 20% e goma gelana à 0,010% sem lipossomas (PLX:GG:PBS) e hidrogéis de poloxâmer e goma gelana com lipossomas (PLX:GG:LIP TMZ TF). ----- | 134 |
| <b>Figura 38</b> — Caracterização reológica dos hidrogéis baseados em poloxâmer 407 (20% m/v) incorporados com 0,010% de goma gelana (GG) contendo lipossomas (Plx:GG:LIP TMZ TF). -----                                                                                                   | 135 |
| <b>Figura 39</b> — Resultados das medidas feitas pelo teste TPA, obtendo os parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão das amostras diluídas em FNS e amostras sem diluição. -----                                                                                    | 137 |
| <b>Figura 40</b> — Resultados das medidas feitas pelo teste de mucoadesão em mucina, obtendo os parâmetros pico de mucoadesão e trabalho de mucoadesão das amostras diluídas em FNS e amostras sem diluição. -----                                                                         | 138 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1</b> — Resultados do teste de conformidade do sistema cromatográfico.....                                                                                                            | <b>65</b>  |
| <b>Tabela 2</b> — Análise de variância dos valores de área obtidos da curva analítica da temozolomida .....                                                                                     | <b>67</b>  |
| <b>Tabela 3</b> — Resultados da análise de exatidão na quantificação de TMZ por CLAE (n=3).....                                                                                                 | <b>68</b>  |
| <b>Tabela 4</b> — Resultados da análise de repetibilidade para a quantificação da TMZ por CLAE (n=3).....                                                                                       | <b>69</b>  |
| <b>Tabela 5</b> — Resultados da análise de precisão intermediária com variação do analista (1) e dia (2) para a quantificação da TMZ por CLAE (n=3). .....                                      | <b>69</b>  |
| <b>Tabela 6</b> — Resultados da robustez do método analítico na quantificação de TMZ (30µg/mL) por CLAE quando submetido a variações de fluxo e temperatura (n=3). .....                        | <b>70</b>  |
| <b>Tabela 7</b> — Dados do estudo de degradação forçada da TMZ em diferentes condições de estresse (n=3). .....                                                                                 | <b>72</b>  |
| <b>Tabela 8</b> — Dados do estudo de estabilidade da TMZ (30µg/mL) em condições distintas de pH, temperatura e tempo.....                                                                       | <b>75</b>  |
| <b>Tabela 9</b> — Resultados da quantificação da temozolomida nas diferentes proporções e caracterização das propriedades coloidais.....                                                        | <b>78</b>  |
| <b>Tabela 10</b> — Resultados da quantificação de proteína nas frações ativadas e nas formulações funcionalizadas. ....                                                                         | <b>80</b>  |
| <b>Tabela 11</b> — Resultados da quantificação da temozolomida nas diferentes proporções e caracterização das propriedades coloidais.....                                                       | <b>88</b>  |
| <b>Tabela 12</b> — Resultados da caracterização físico-química de lipossomas e quantificação do fármaco em amostras funcionalizadas e não funcionalizadas. ....                                 | <b>89</b>  |
| <b>Tabela 13</b> — Resultados da análise de pH do meio de dissolução antes da adição do fármaco e no sobrenadante obtido depois do tempo de saturação.....                                      | <b>96</b>  |
| <b>Tabela 14</b> — Parâmetros cinéticos e mecanísticos obtidos por regressão não linear para a liberação TMZ a partir das formulações LIP TMZ e LIP TMZ TF sob diferentes condições de pH ..... | <b>99</b>  |
| <b>Tabela 15</b> — Caracterização macroscópica de soluções de goma gelana em diferentes concentrações sob duas condições térmicas. ....                                                         | <b>125</b> |
| <b>Tabela 16</b> — Caracterização macroscópica dos géis de poloxâmer (Plx) e goma gelana (GG).....                                                                                              | <b>127</b> |
| <b>Tabela 17</b> — Caracterização do tempo e distância de escoamento de hidrogéis de poloxâmer (Plx) e goma gelana (GG).....                                                                    | <b>128</b> |
| <b>Tabela 18</b> — Caracterização macroscópica dos hidrogéis de gelificação direta contendo lipossomas ou tampão fosfato. ....                                                                  | <b>132</b> |

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA- Análise de Variância  
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ASC – Área sob a curva  
ATP – Adenosina trifosfato  
BER – Base Excision Repair  
BHE – Barreira Hematoencefálica  
CC% - Capacidade de carreamento  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CMC – Concentração Micelar Crítica  
CTLA-4 – Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico  
COL – Colesterol  
DC – Dicroísmo circular  
DLS – Dispersão dinâmica de luz  
DMEM-HG – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco com Alto Teor de Glicose  
DP – Desvio Padrão  
DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina  
DSPE-PEG-mal - Distearoil fosfoetanolamina – PEGmaleimida  
DSPE-PEG-NH<sub>2</sub> - Distearoil fosfoetanolamina – PEGamina  
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal  
EE% - Eficiência de Encapsulação  
EMA - European Medicines Agency  
FDA - Food and Drug Administration  
FTIR - Fourier transform infrared  
GBM – Glioblastoma  
GG – Goma Gelana  
LIP – lipossoma vazio  
LIP-CAR – Lipossoma funcionalizado via carbordiiimida  
LIP-MAL – Lipossoma funcionalizado via maleimida  
LIP-TMZ – lipossoma com temozolomida  
LIP-Tf – Lipossoma vazio funcionalizado com transferrina  
LIP-TMZ-Tf – Lipossoma e temozolomida funcionalizado com transferrina  
LUV – Vesículas unilamelares gigantes  
MESF – Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome  
MGMT – 06-Metilguanina DNA metiltransferrase  
MMR – Mismatch repair  
MD – Média  
MTIC - 5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida  
MUV – Vesículas multilamelares  
NPs – Nanopartículas  
NTA – Nanoparticle Tracking Analysis  
NHS – N-Hidroxissuccinimida  
OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato de sódio  
PDI – Índice de Polidispersão  
PEG – Polietilenoglicol  
PEO – Óxido de polietileno  
PLX – Poloxâmer  
PPO – Óxido de polipropileno  
PTEN – Phosphatase and Tensin Homolog  
PZ – Potencial Zeta  
RSD – Relative Standard Deviation  
SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de Dodecil Sulfato de Sódio  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SUV – pequenas vesículas unilamelares  
Tf – Transferrina  
TfR – Receptor de Transferrina  
TMZ – Temozolomida  
TPA – Texture profile analysis  
TR – Tempo de retenção  
TRITC – Tetrametilrodamina Isotiocianato  
WST – Water Soluble Tetrazolium

## SUMÁRIO

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                        | <b>18</b> |
| <b>2. ASPECTOS TEÓRICOS</b>                                                                                 | <b>21</b> |
| 2.1 TUMORES CEREBRAIS E GBM: DEFINIÇÕES, TRATAMENTO E DESAFIOS                                              | 21        |
| 2.2 OPORTUNIDADES PARA PESQUISAS TERAPÊUTICAS NO GBM                                                        | 25        |
| 2.2.1 Explorando o Potencial dos Lipossomas na Terapia Anti-GBM                                             | 25        |
| 2.2.2 Explorando Receptores Superexpressos no GBM: O Papel do Receptor de Transferrina                      | 27        |
| 2.2.3 Novas Perspectivas para a Via Nasal: Entrega Nariz-Cérebro                                            | 31        |
| 2.2.4 Uso de Polímeros Termo e Ionorrresponsivos para administração intranasal: Poloxâmer 407 e Goma Gelana | 34        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                                         | <b>39</b> |
| <b>4. MATERIAIS</b>                                                                                         | <b>40</b> |
| <b>5. MÉTODOS</b>                                                                                           | <b>42</b> |
| 5.1. DOSEAMENTO DA TEMOZOLOMIDA POR CLAE                                                                    | 42        |
| 5.1.1. Linearidade                                                                                          | 42        |
| 5.1.2. Seletividade                                                                                         | 43        |
| 5.1.3. Precisão e exatidão                                                                                  | 43        |
| 5.1.4. Sensibilidade                                                                                        | 43        |
| 5.1.5. Robustez                                                                                             | 44        |
| 5.2 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO FORÇADA DA TMZ                                                                     | 44        |
| 5.2.1. Estudo de degradação ácido e básico                                                                  | 44        |
| 5.2.2. Estudo de degradação oxidativa                                                                       | 44        |
| 5.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA TEMOZOLOMIDA EM SOLUÇÃO TAMPÃO                                                | 45        |
| 5.3.1 Influência do pH no comportamento da carga relativa da TMZ sob titulação                              | 45        |
| 5.3.2 Avaliação da estabilidade da TMZ em solução tampão                                                    | 45        |
| 5.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS                                                             | 45        |
| 5.4.1 Obtenção das formulações via hidratação do filme lipídico                                             | 45        |
| 5.4.2 Análise do tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta                      | 46        |
| 5.4.3 Análise da eficiência de encapsulação e da capacidade de carregamento                                 | 46        |
| 5.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS FUNCIONALIZADAS COM TRANSFERRINA                            | 47        |
| 5.5.1 Funcionalização dos lipossomas por conjugação via reação tiol-maleimida                               | 47        |
| 5.5.2 Funcionalização dos lipossomas por conjugação via sistema carbodiimida                                | 48        |
| 5.5.3 Caracterização da bioconjugação dos lipossomas com transferrina                                       | 50        |
| 5.5.3.1 Determinação da eficiência de conjugação                                                            | 50        |
| 5.5.3.2 Determinação da bioconjugação por espectroscopia UV/Visível                                         | 50        |
| 5.5.3.3 Confirmação da bioconjugação e purificação por SDS-PAGE                                             | 50        |
| 5.5.3.4 Avaliação da integridade estrutural da proteína por dicroísmo circular                              | 51        |
| 5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS CONTENDO TEMOZOLOMIDA                                      | 51        |
| 5.6.1 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)                                                       | 51        |
| 5.6.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier                                           | 52        |
| 5.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)                                                           | 53        |
| 5.6.4 Análise da estabilidade física ao longo do tempo por Zetasizer Nano-ZS                                | 53        |
| 5.7. Estudo do perfil de liberação in vitro da temozolomida das formulações lipossomais                     | 53        |
| 5.7.1. Estudo de solubilidade da TMZ                                                                        | 53        |
| 5.7.2. Determinação do perfil de liberação in vitro da TMZ                                                  | 54        |

|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.8 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM COMPONENTES BIOLÓGICOS.....                                                                                           | 55        |
| 5.8.1. Estudo da interação <i>in vitro</i> dos lipossomas com a mucina .....                                                                                        | 55        |
| 5.8.2. Estudo <i>ex-vivo</i> da biocompatibilidade pelo modelo de membrana corioalantóica de ovo de galinha (HET-CAM) .....                                         | 55        |
| 5.8.3. Estudo de interação dos lipossomas com proteína do soro em Zetasizer Nano-ZS .....                                                                           | 56        |
| 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E DOS MECANISMOS DE INTERAÇÃO NANOPARTÍCULAS-CÉLULAS DE GBM .....                                                            | 57        |
| 5.9.1 Avaliação da viabilidade de células de GBM em modelo bidimensional .....                                                                                      | 57        |
| 5.9.2 Avaliação da interação dos lipossomas com células de GBM por microscopia confocal e citometria de fluxo.....                                                  | 57        |
| 5.9.3 Avaliação dos mecanismos de captação e tráfego intracelular dos lipossomas em células U87 MG de GBM.....                                                      | 59        |
| 5.9.4 Avaliação da citotoxicidade em modelos de esferoide monocultura de GBM                                                                                        | 60        |
| 5.10 DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMORRESPONSIVOS DE POLOXÂMER 407 E GOMA GELANA CONTENDO TEMOZOLOMIDA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS CONJUGADOS COM TRANSFERRINA..... | 61        |
| 5.10.1 Preparo dos hidrogéis contendo lipossomas .....                                                                                                              | 61        |
| 5.10.2 Determinação do tempo e distância de gelificação dos hidrogéis .....                                                                                         | 61        |
| 5.10.3 Análises reológicas dos hidrogéis.....                                                                                                                       | 62        |
| 5.10.4 Análises por microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis .....                                                                                         | 62        |
| 5.10.5 Análise Calorimétrica Diferencial Exploratória (DSC) dos hidrogéis .....                                                                                     | 63        |
| 5.10.6 Análise do perfil de textura e da mucoadesão em disco de mucina por texturômetro .....                                                                       | 63        |
| <b>6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                                                                                              | <b>64</b> |
| 6.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA TEMOZOLOMIDA.....                                                                                            | 64        |
| 6.2 DELINEAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CONTENDO TEMOZOLOMIDA E FUNCIONALIZADO COM TRANSFERRINA .....                                                      | 72        |
| 6.2.1 Avaliação do comportamento dependente do pH e da estabilidade química da TMZ em solução.....                                                                  | 72        |
| 6.2.2 Avaliação inicial das formulações lipossomais com temozolomida.....                                                                                           | 75        |
| 6.2.3 Otimização das estratégias de funcionalização dos lipossomas com transferrina.....                                                                            | 79        |
| 6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO TEMOZOLOMIDA E CONJUGADOS COM TRANSFERRINA VIA TIOL-MALEIMIDA .....                                                      | 88        |
| 6.4 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM COMPONENTES BIOLÓGICOS.....                                                                                           | 101       |
| 6.4.1 Estudo <i>in vitro</i> da interação de lipossomas com mucina.....                                                                                             | 101       |
| 6.4.2 Estudo de biocompatibilidade <i>ex vivo</i> em modelo de HET-CAM .....                                                                                        | 103       |
| 6.4.3 Estudo de interação dos lipossomas com proteínas do soro .....                                                                                                | 105       |
| 6.5 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E DA INTERNALIZAÇÃO INTRACELULAR DE NANOSSISTEMAS LIPOSSOMAS EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA.....                            | 107       |
| 6.5.1 Efeito <i>in vitro</i> dos lipossomas na viabilidade de células U87 MG de glioblastoma .....                                                                  | 107       |
| 6.5.2 Análise do efeito da conjugação da transferrina na interação com células de GBM .....                                                                         | 111       |
| 6.5.3 Estudo do efeito da presença de lipossomas na ativação de vias endocíticas e avaliação do destino intracelular .....                                          | 114       |

|                                                                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.5.4 Estudo do efeito dos lipossomas em esferoides de monocultura de células U251 de GBM.....                                                      | 118        |
| 6.6 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS TERMOSSENSÍVEIS DE POLOXÂMER 407 E GOMA GELANA PARA INCORPORAÇÃO DE SISTEMAS LIPOSSOMAS.....                 | 124        |
| 6.6.1 Desenvolvimento e caracterização preliminar dos hidrogéis de poloxâmer e goma gelana .....                                                    | 124        |
| 6.6.2 Caracterização dos hidrogéis de poloxâmer 20% e goma gelana 0,01% contendo lipossomas conjugados com transferrina contendo temozolomida ..... | 131        |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                                                                                | <b>139</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                              | <b>142</b> |
| <b>ANEXO A – GRÁFICOS DA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE NTA.....</b>                                                                    | <b>163</b> |
| <b>ANEXO B – PARÂMETROS DE DECONVOLUÇÃO DA REGIÃO ALIFÁTICA..</b>                                                                                   | <b>164</b> |
| <b>ANEXO C – PARÂMETROS DE DECONVOLUÇÃO DA REGIÃO DE ESTIRAMENTO DE ÉSTER E CARBONILA .....</b>                                                     | <b>165</b> |
| <b>ANEXO D – PARÂMETROS DE DECONVOLUÇÃO DA REGIÃO DE AMIDA I.</b>                                                                                   | <b>166</b> |
| <b>ANEXO E – PARÂMETRO PARA ENSAIO DE ESTABILIDADE PARA O MEIO DMEM.....</b>                                                                        | <b>167</b> |
| <b>ANEXO F – RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL (Z-STACK) DO ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL .....</b>                           | <b>168</b> |
| <b>PRODUÇÕES CIENTÍFICAS .....</b>                                                                                                                  | <b>169</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral primário maligno mais agressivo e comum em adultos. Trata-se de tumores de rápida proliferação, infiltração difusa e alta variabilidade intratumoral que acomete os astrócitos, células de sustentação e nutrição presente no sistema nervoso central (SNC) (Agosti *et al.*, 2023; Delgado-Martín e Medina, 2020; Perrin *et al.*, 2019). O tratamento atual consiste na ressecção cirúrgica segura seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ) que proporciona, somente, um ganho de sobrevida médio de doze meses, pois a progressão tumoral pós terapia é quase inevitável (Delgado-López e Corrales-García, 2016; Ostrom *et al.*, 2021; Stupp *et al.*, 2005; Thakkar *et al.*, 2014). O desfecho clínico desfavorável reforça a limitação e baixa eficácia da terapia atual para o tratamento do GBM, que é constantemente questionada na prática clínica, evidenciando a necessidade de novas estratégias. Existem diversos desafios associados à terapêutica do GBM, dentre os de maior impacto destaca-se a baixa disponibilidade cerebral da TMZ devido o perfil de hidrólise do fármaco, bem como a resistência terapêutica associados aos mecanismos intrínsecos às células tumorais e ao microambiente tumoral (Delgado-Martín e Medina, 2020; Goldwirt *et al.*, 2013; Meany *et al.*, 2009; Perrin *et al.*, 2019; Portnow *et al.*, 2009).

Nesse cenário, estratégias multifuncionais podem ser úteis na busca de novas alternativas terapêuticas para auxiliar no controle da doença, aumento da taxa de sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Dentre as possibilidades, o desenvolvimento de uma estratégia combinatória que integra: (i) a entrega de fármacos direcionados às células tumorais explorando o ambiente tumoral através do uso de nanocarreadores, (ii) a entrega direta ao sistema nervoso central (SNC) via administração nasal contornando a BHE, e (iii) o uso de polímeros responsivos para formação de redes poliméricas visando um microambiente de distribuição estável e homogêneo durante a administração nasal, apresenta potencial para ser um sistema multifuncional no tratamento do GBM.

Os nanocarreadores são promissores pelas vantagens específicas inerentes a suas características coloidais e físico-químicas. Dentre eles, os lipossomas são os mais investigados e com maior sucesso clínico devido à biocompatibilidade, segurança, e regulamentação, visto que já são usados clinicamente (Bulbake *et al.*, 2017). Características distintas podem ser obtidas em termos de parâmetros

estruturais, químicos, mecânicos, magnéticos, elétricos e biológicos de acordo com o material usado e a técnica de preparo (Campos *et al.*, 2013; Tan e Billa, 2021). No cenário da terapêutica anticâncer dois parâmetros se destacam em nanosistemas, o primeiro é em função da estrutura nanométrica que permite o acúmulo passivo no tumor pelas fenestrações dos vasos sanguíneos, sem nenhum mecanismo adicional. E o segundo é em relação as propriedades de superfície dos nanocarreadores, que possibilitam estratégias de modificação de superfície com diferentes ligantes funcionais tais como a transferrina, para aumento da interação entre os nanocarreadores e a célula alvo. Esses dois mecanismos juntos, exploram vias distintas para acúmulo da terapêutica no local alvo (Danhier, Feron e Préat, 2010; Demetzos e Pippa, 2014; Ramalho, Coelho e Pereira, 2018; Zhou *et al.*, 2013).

Apesar das vantagens, nanosistemas ainda enfrentam barreiras fisiológicas importantes, como a própria barreira hematoencefálica (BHE), limitando sua eficácia quando administrados por vias convencionais. Como alternativa, a administração intranasal tem sido explorada como uma rota não-invasiva de acesso direto ao cérebro pelas vias olfatória e trigeminal. Essa estratégia evita o metabolismo pré-sistêmico, aumenta a distribuição cerebral e reduz os efeitos colaterais, sendo, particularmente atraente para o tratamento de doenças do SNC. No entanto, fatores limitantes como o curto de tempo de retenção e a depuração mucociliar na cavidade nasal podem comprometer a eficiência da via intranasal (Gao, Shen e Mao, 2020; Lochhead e Thorne, 2012; Ways *et al.*, 2020).

Para contornar essas limitações, materiais poliméricos têm sido investigados como biomateriais promissores como matrizes para administração nasal devido às suas propriedades absorptivas e mucoadesivas. Polímeros responsivos a estímulos externos têm sido empregados como materiais funcionais para formação de redes tridimensionais hidrofílicas, com alta capacidade absorptiva de água sem perda de integridade estrutural, conhecidos como hidrogéis. A formação de uma matriz polimérica responsiva à temperatura, íons ou muco da cavidade nasal tende diminuir a absorção sistêmica, a depuração mucociliar e agir como agente de mucoadesão ou penetração, melhorando a penetração dos nanosistemas no muco e otimizando a entrega cerebral (Brannigan e Khutoryanskiy, 2019; Donnelly *et al.*, 2011; Yom-Tov, Seliktar e Bianco-Peled, 2016).

A estratégia de carregamento da TMZ em lipossomas e a funcionalização desses nanocarreadores para o tratamento de GBM é descrita na literatura, bem como o uso

de lipossomas para via nasal (Gao *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2018; Lam *et al.*, 2018a; Vanza *et al.*, 2018). No entanto, a integração de lipossomas carregados com temozolomida funcionalizados com transferrina, e dispersos em uma matriz carreadora originando um sistema multifuncional para entrega cerebral via administração intranasal não é reportada na literatura. Dessa forma, a integração de lipossomas contendo TMZ funcionalizados com transferrina para aplicação intranasal baseados em hidrogéis de poloxâmer 407 e goma gelana, representa uma estratégia multifuncional promissora para mitigar parcialmente os problemas associados a terapia do GBM. Essa abordagem visa investigar o potencial de lipossomas contendo TMZ e funcionalizados com transferrina às células de GBM, em comparação ao fármaco de primeira escolha devido ao direcionamento mediado pela transferrina.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam que lipossomas encapsulados com temozolomida e conjugados com transferrina são viáveis de obtenção, e apresentam características físico-químicas e biológica compatíveis para encapsulação da TMZ e entrega e efeito sob células de GBM. Os sistemas demonstraram eficiência de encapsulação moderada — considerando que fármacos pequenos e hidrofílicos são difíceis de encapsular em lipossomas, bem como apresentaram-se estáveis fisicamente após conjugação incluindo estabilidade na presença de meio biologicamente relevante, além de se apresentarem biocompatíveis quando em contato com membrana biológica altamente vascularizada, como evidenciado pelo HET-CAM. Esses resultados associados à confirmação da conjugação da proteína à superfície dos lipossomas garantiram resultados biológicos relevantes na presença de modelos esferoidais que mimetizam de forma mais fidedigna a biológica tumoral, e, portanto, a interação com células de GBM, como evidenciado pelos resultados de atividade metabólica em sistema tridimensionais. Em paralelo, os resultados demonstraram que não apenas a presença da conjugação, mas as propriedades físico-químicas e composição dos nanosistemas influenciaram nos mecanismos de captação *in vitro*, como evidenciado pelos estudos de interação nanopartícula-célula em modelo bidimensional. Logo, as formulações lipossomais demonstraram ser sistemas fisicamente estáveis e com efetiva atividade biológica *in vitro* contornando um dos principais desafios no desenvolvimento de nanopartículas vetorizada para liberação de fármacos — um sistema fisicamente estável e com efetiva atividade biológica.

Os resultados evidenciam que a plataforma multifuncional contendo lipossomas em matrizes poliméricas foi obtida com sucesso pelo método de gelificação direta. Os resultados demonstram que os lipossomas influenciam nas propriedades estruturais dos hidrogéis de poloxâmer e goma gelana, mas sem causar rigidez estrutural a ponto de ser um sistema sem espalhabilidade — uma característica desejável durante a aplicação nasal. Em conjunto, os resultados obtidos durante a caracterização da plataforma evidenciam que em baixas concentrações a goma gelana exerce a função de estruturação do sistema em contato com fluido nasal, como evidenciado pelos ensaios de textura e mucoadesão. Esses resultados são satisfatórios, pois evidenciam

que as matrizes possuem potencial para aplicação nasal e permanência sem rápida eliminação pelo batimento ciliar.

Os resultados promissores em modelos esferoidais evidenciam que estudos de interação esferoide-nanopartículas são necessários para melhorar o entendimento dos mecanismos que regem a melhor atividade dos lipossomas funcionalizados sobre células em modelo tridimensionais quando comparadas aos bidimensionais. No entanto, os resultados evidenciam as discussões já levantadas na literatura, nas quais modelos bidimensionais não são a melhor opção para entender os mecanismos de interação célula-nanopartículas, enfatizando que estudos envolvendo mecanismos celulares são mais promissores quando focados em modelos que mimetizam melhor a biologia tumoral. Em relação a matriz híbrida, ensaios de tempo de degradação da matriz polimérica seriam necessários para analisar o tempo de permanência dos hidrogéis na cavidade nasal, já que esse é um fator relevante por se associar diretamente ao potencial fisiológico e de proteção dessa mucosa. Ensaios de avaliação da permeabilidade da matriz aos lipossomas são necessários, e foram realizados nesse trabalho; no entanto, os resultados obtidos não foram cientificamente aceitáveis pois não garantiram a quantificação do fármaco de forma precisa, bem como a análise da permanência estrutural dos lipossomas após permeação, visto que a matriz polimérica é apenas um carreador dos lipossomas devendo garantir a sua permeação em estado íntegro. Considerando esses fatores, estudos de desenhos metodológicos que sejam eficientes em avaliar a permeação dos lipossomas como um sistema integral pela matriz estão sendo estudados visando obter resultados relevantes em termos de avaliação das propriedades físico-química e coloidal dos lipossomas permeados.

Considerando a complexidade da proposta, resultados relevantes foram obtidos no desenvolvimento da plataforma multifuncional bem como dos lipossomas como sistemas individualizados. No entanto, muito ainda precisa ser estudado, como já reportando anteriormente, em relação a integração da plataforma, mesmo antes de análises *in vivo* a fim de obter resultados relevantes biologicamente e não somente dados adicionais sem potencial de aplicação, visto que a dificuldade de obtenção de resultados similares *in vitro* e *in vivo* é um dos principais gargalos das tecnologias nanotecnologia.

Como já discutido durante o referencial teórico existem diversos estudos que englobam lipossomas encapsulados com TMZ direcionados ao GBM, nanopartículas

incluindo lipossomas conjugados à transferrina e hidrogéis de poloxâmer e goma gelana – inclusive para administração nasal, mas não há um estudo que integra simultaneamente esses componentes em uma plataforma multifuncional. Considerando que um medicamento deve ser desenvolvido sob uma perspectiva translacional, contemplando etapas de produção, administração, biodistribuição, farmacocinética e resposta biológica, esse estudo avança em direção a um sistema farmacêutico pensado na sua totalidade, mesmo que com várias limitações e gargalos ainda a serem estudados. Além disso, considerando a agressividade do GBM, a limitada opção terapêutica e a baixa resposta terapêutica os resultados sugerem que a plataforma estudada ou os lipossomas individualizados possuem potencial para aumentar a concentração do fármaco no sítio tumoral e reduzir a perda sistêmica devido a via proposta, contribuindo para o melhor desenho experimental de novos estudos envolvendo plataformas multifuncionais de administração nasal para entrega de sistema lipossomais ao cérebro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAFRIN HAZAANA, S. *et al.* Development and characterization of biopolymer electrolyte based on gellan gum (GG) with lithium chloride (LiCl) for the application of electrochemical devices. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 5, p. 5291–5311, 1 maio 2023.
- ABBASI, H. *et al.* What We Need to Know about Liposomes as Drug Nanocarriers: An Updated Review. **Advanced Pharmaceutical**, v.13, p.7-23, 2023.
- ADEL, I. M. *et al.* Gellan gum-based bi-polymeric hydrogel scaffolds loaded with Rosuvastatin calcium: A useful tool for tendon tissue regeneration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 192, p. 106659, jan. 2024.
- AGOSTI, E. *et al.* Tumor Microenvironment and Glioblastoma Cell Interplay as Promoters of Therapeutic Resistance. **Biology**, v. 12, n. 5, p. 736, 18 maio 2023.
- AHAD, A. *et al.* Thermodynamic Solubility Profile of Temozolomide in Different Commonly Used Pharmaceutical Solvents. **Molecules**, v. 27, n. 4, 1 fev. 2022.
- AHMAD, E. *et al.* Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: Cargoes but not vehicles. **Nanoscale**, v. 9, n. 3, p. 1174–1183, 21 jan. 2017.
- AIRES FERNANDES, M. *et al.* Transferrin-functionalized liposomes for docetaxel delivery to prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 611, p. 125806, fev. 2021.
- AKHTER, M. H. *et al.* Impact of Protein Corona on the Biological Identity of Nanomedicine: Understanding the Fate of Nanomaterials in the Biological Milieu. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1496, 19 out. 2021.
- ALEXANDRIDIS, P.; ALAN HATTON, T. Poly (ethylene oxide)poly(propylene oxide)poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, n. 1–2, p. 1–46, mar. 1995.
- ANANTA, J. S.; PAULMURUGAN, R.; MASSOUD, T. F. Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation. **Neurological Research**, v. 38, n. 1, p. 51–59, 2 jan. 2016.
- ANDERSON, S. A. *et al.* The IRP1-HIF-2 $\alpha$  Axis Coordinates Iron and Oxygen Sensing with Erythropoiesis and Iron Absorption. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 282–290, fev. 2013.
- ANDRASI, M. *et al.* Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 878, n. 21, p. 1801–8, 1 jul. 2010.
- ANDREANI, T. *et al.* Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 118–126, jun. 2015.
- ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, p. 163–177, 4 jun. 2016.
- ARAÚJO, D. R. DE *et al.* Poloxamers as Drug-Delivery Systems: Physicochemical, Pharmaceutical, and Toxicological Aspects. p. 281–298.

- ARMSTRONG, T. S. *et al.* Risk analysis of severe myelotoxicity with temozolomide: The effects of clinical and genetic factors. **Neuro-Oncology**, v. 11, n. 6, p. 825–832, 1 dez. 2009.
- ATTWOOD, S.; CHOI, Y.; LEONENKO, Z. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3514–3539, 6 fev. 2013.
- AZAMBUJA, J. H. *et al.* Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as CD73-siRNA Delivery System for Glioblastoma Treatment: a New Therapeutical Approach. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 2, p. 635–649, 12 fev. 2020.
- BACH, CHRISTIAN *et al.* Rapid and reproducible generation of glioblastoma spheroids for high-throughput drug screening. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 2024.
- BAER, J. *et al.* Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 6, p. 1299–1302, jun. 1993.
- BAJWA, M. *et al.* Thermo-Responsive Sol-Gel-Based Nano-Carriers Containing Terbinafine HCl: Formulation, In Vitro and Ex Vivo Characterization, and Antifungal Activity. **Gels**, v. 9, n. 10, p. 830, 20 out. 2023.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238–252, 1965.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 3–15, jan. 2018.
- BARAVALLE, G. *et al.* Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is differentially affected by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. **Cell and Tissue Research**, v. 320, n. 1, p. 99–113, 16 abr. 2005.
- BARENHOLZ, Y. (CHEZY). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, jun. 2012.
- BARKAKATY, B. *et al.* Amidine-Functionalized Poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone) for Selective and Efficient CO<sub>2</sub> Fixing. **Macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1523–1531, 9 mar. 2016.
- BATISTA-DUHARTE, A. *et al.* The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 627–633, 13 nov. 2016.
- BATTAGLIA, L. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles for Potential Doxorubicin Delivery in Glioblastoma Treatment: Preliminary In Vitro Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2157–2165, jul. 2014.
- BATTAGLINI, M. *et al.* Combining confocal microscopy, dSTORM, and mass spectroscopy to unveil the evolution of the protein corona associated with nanostructured lipid carriers during blood-brain barrier crossing. **Nanoscale**, v. 14, n. 36, p. 13292–13307, 11 ago. 2022.
- BAXA, U. Imaging liposomes by transmission electron microscopy. *Em: Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1682, p. 73–88.

- BHAT, S. A.; AHMAD, S. Quantum chemical calculations and analysis of FTIR, FT-Raman and UV-Vis spectra of temozolomide molecule. **Journal of Molecular Structure**, v. 1099, p. 453–462, 14 jul. 2015.
- BITER, A. B. *et al.* A method to probe protein structure from UV absorbance spectra. **Analytical Biochemistry**, v. 587, p. 113450, dez. 2019.
- BLUME, A.; HUBNER, W.; MESSNER, G. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of  $^{13}\text{C}=0$ -Labeled Phospholipids Hydrogen Bonding to Carbonyl Groups. **Biochemistry**, v. 27, p. 8239–8249, 1988.
- BONACUCINA, G. *et al.* Thermosensitive Self-Assembling Block Copolymers as Drug Delivery Systems. **Polymers**, v. 3, n. 2, p. 779–811, 19 abr. 2011.
- BOWER, M. *et al.* Multicentre CRC phase II trial of temozolomide in recurrent or progressive high-grade glioma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 484–488, 4 set. 1997.
- BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, n. 1–3, p. 35–42, ago. 2011.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. **Liposomes as nanomedical devices** *International Journal of Nanomedicine* Dove Medical Press Ltd., 2 fev. 2015.
- BRANNIGAN, R. P.; KHUTORYANSKIY, V. V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. **Macromolecular Bioscience**, v. 19, n. 10, p. 1900194, 30 out. 2019.
- BRASIL, A. N. DE V. S. (ANVISA). **Validação de métodos analíticos. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166**. Brasília: Anvisa, 2017.
- BRIUGLIA, M.-L. *et al.* Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 3, p. 231–242, 17 jun. 2015.
- BROWN, T. D. *et al.* Effect of Nanoparticle Composition, Size, Shape, and Stiffness on Penetration across the Blood-Brain Barrier. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 6, n. 9, p. 4916–4928, 2020.
- BRUSCHI, M. L. *et al.* Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074–2089, 2007.
- BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O. DE. Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 293–310, 1 mar. 2005.
- BULBAKE, U. *et al.* Liposomal formulations in clinical use: An updated review. **Pharmaceutics**, 1 jun. 2017.
- BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**, v. 25, n. 3, p. 469–487, 1986.
- CALMETTES, C.; ALCANTARA, J.; YU, R. H.; *et al.* The structural basis of transferrin sequestration by transferrin-binding protein B. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 19, n. 3, p. 358–360, mar. 2012.

- CALZOLARI, A. *et al.* Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 39, n. 1, p. 82–91, jul. 2007.
- CALZOLARI, A. *et al.* Transferrin Receptor 2 Is Frequently and Highly Expressed in Glioblastomas. **Translational Oncology**, v. 3, p. 123–134, 2010a.
- CAMPOCCIA, D. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. **Biomaterials**, v. 19, n. 23, p. 2101–2127, dez. 1998.
- CAMPOS, E. *et al.* Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**. 2013
- CANDELARIA, P. V. *et al.* Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 17 mar. 2021.
- CASTILE, J. *et al.* Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys®, an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 5, p. 816–824, maio 2013.
- CHELU, M.; MUSUC, A. M. Polymer Gels: Classification and Recent Developments in Biomedical Applications. **Gels**, v. 9, n. 2, p. 161, 17 fev. 2023.
- CHEN, Y.-S. *et al.* Integration of PEG 400 into a self-nanoemulsifying drug delivery system improves drug loading capacity and nasal mucosa permeability and prolongs the survival of rats with malignant brain tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 3601–3613, maio 2019.
- CHILVERS, M. A. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. **Thorax**, v. 55, n. 4, p. 314–317, 1 abr. 2000.
- CHO, H.-Y. *et al.* Pharmacokinetic properties of the temozolomide perillyl alcohol conjugate (NEO212) in mice. **Neuro-Oncology Advances**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2020.
- CHOI, B.-M. *et al.* Novel temperature-responsive hydrogel injected to the incision site for postoperative pain relief in laparoscopic abdominal surgery: a single-blind, randomized, pivotal clinical trial. **Surgical Endoscopy**, v. 36, n. 8, p. 5794–5802, 12 ago. 2022.
- CHONKAR, A.; NAYAK, U.; UDUPA, N. Smart polymers in nasal drug delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 4, p. 367, 2015.
- COE, C. OF E. Chromatographic separation techniques. *Em*: **European Pharmacopeia 5.0**. 5. ed. European Pharmacopoeia, 2004. v. 1p. 69–73.
- COHEN, M. H.; JOHNSON, J. R.; PAZDUR, R. Food and drug administration drug approval summary: Temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 19 I, p. 6767–6771, 1 out. 2005.
- COMBS, J. D. Surface FTIR Techniques to Analyze the Conformation of Proteins/Peptides in H<sub>2</sub>O Environment. **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, v. 6, n. 1, 2016.
- CONE, R. A. Barrier properties of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 75–85, fev. 2009.
- CROUCH, S. P. M. *et al.* The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 1, p. 81–88, jan. 1993.

CURNUTT, A. *et al.* Chemical and Microstructural Characterization of pH and [Ca<sup>2+</sup>] Dependent Sol-Gel Transitions in Mucin Biopolymer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8760, 29 maio 2020.

CZAMARA, K. *et al.* Raman spectroscopy of lipids: A review. **Journal of Raman Spectroscopy**, John Wiley and Sons Ltd, 17 nov. 2015.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, dez. 2010.

DAVIS, S. S. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 11, p. 450–456, nov. 1999.

DELGADO-LÓPEZ, P. D.; CORRALES-GARCÍA, E. M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. **Clinical and Translational Oncology**. Springer-Verlag Italia, nov. 2016.

DELGADO-MARTÍN, B.; MEDINA, M. Á. Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment. **Advanced Science**, v. 7, n. 9, p. 1902971, 12 maio 2020.

DEMETZOS, C.; PIPPA, N. Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): A mini-review. **Drug Delivery**, v. 21, n. 4, p. 250–257, 2014.

DENNY, B. J. *et al.* NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. **Biochemistry**, v. 33, n. 31, p. 9045–9051, ago. 1994.

DEWAN, M. *et al.* Effect of gellan gum on the thermogelation property and drug release profile of Poloxamer 407 based ophthalmic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 258–265, set. 2017.

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.

DIEZ, B. D. *et al.* Evaluation of the exposure equivalence of oral versus intravenous temozolomide. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 727–734, 30 mar. 2010.

DIOS-PÉREZ, I. DE *et al.* Development of a thermosensitive hydrogel based on Polaxamer 407 and gellan gum with inclusion complexes (Sulfobutylated- $\beta$ -cyclodextrin–Farnesol) as a local drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 191, 1 dez. 2023.

DONNELLY, R. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89, 2011.

DUMORTIER, G. *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 29 nov. 2006.

DUPLESSIS, J. *et al.* The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 127, n. 2, p. 273–278, 17 fev. 1996.

- DUTRA, J. A. P. *et al.* Temozolomide: An Overview of Biological Properties, Drug Delivery Nanosystems, and Analytical Methods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 28, n. 25, p. 2073–2088, 6 jun. 2022.
- ELOY, J. O. *et al.* Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, nov. 2014.
- ERDŐ, F. *et al.* Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 155–170, out. 2018.
- ESSAGHIR, A.; DEMOULIN, J.-B. A Minimal Connected Network of Transcription Factors Regulated in Human Tumors and Its Application to the Quest for Universal Cancer Biomarkers. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39666, 25 jun. 2012.
- FABER, W. M. The nasal mucosa and the subarachnoid space. **American Journal of Anatomy**, v. 62, n. 1, p. 121–148, 22 nov. 1937.
- FDA, F. AND D. A. **Temodar for injection**. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2009/022277\\_temodar\\_toc.cf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022277_temodar_toc.cf). Acesso em: 9 jun. 2021.
- FDA, F. D. A. **Temodal**. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/21029\\_Temodar\\_clinphmr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/21029_Temodar_clinphmr.pdf). Acesso em: 16 jun. 2021.
- FILIPCZAK, N. *et al.* Recent advancements in liposome technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Elsevier, 1 jan. 2020.
- GADZIŃSKI, P. *et al.* Rheological and textural analysis as tools for investigation of drug-polymer and polymer-polymer interactions on the example of low-acyl gellan gum and mesalazine. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 8, p. 1400–1416, 7 mar. 2022.
- GALY, B.; CONRAD, M.; MUCKENTHALER, M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 2, p. 133–155, 2 fev. 2024.
- GANTAR, A. *et al.* Nanoparticulate bioactive-glass-reinforced gellan-gum hydrogels for bone-tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 43, p. 27–36, out. 2014.
- GAO, H. *et al.* Internalization and subcellular fate of aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles. **Journal of Drug Targeting**, v. 22, n. 5, p. 450–459, 2014.
- GAO, J. *et al.* Liposome encapsulated of temozolomide for the treatment of glioma tumor: preparation, characterization and evaluation. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 205–212, 2015.
- GAO, M.; SHEN, X.; MAO, S. Factors influencing drug deposition in the nasal cavity upon delivery via nasal sprays. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 50, n. 3, p. 251–259, 2020.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, R.; VALLET-REGÍ, M. Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance. **Nanomaterials**, v. 11, n. 4, p. 888, 31 mar. 2021.
- GAREWAL, M.; ZHANG, L.; REN, G. Optimized negative-staining protocol for examining lipid-protein interactions by electron microscopy. **Methods in Molecular Biology**, v. 974, p. 111–118, 2013.

- GHOSH, M. C. *et al.* Deletion of Iron Regulatory Protein 1 Causes Polycythemia and Pulmonary Hypertension in Mice through Translational Derepression of HIF2 $\alpha$ . **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 271–281, fev. 2013.
- GIBSON, W.; SANDERSON, G. R. Gellan gum. *Em*: IMESON, A. (Ed.). . **Thickening and Gelling Agents for Food**. Boston: Springer, Boston, MA, 1997. p. 119–143.
- GILANT, E. *et al.* Validated HPLC method for determination of temozolomide in human plasma. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 69, n. 6, p. 1347–55, 2012.
- GILBERT, M. R. *et al.* RTOG 0525: A randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15\_suppl, p. 2006–2006, maio 2011.
- GILBERT, M. R. *et al.* A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 8, p. 699–708, 20 fev. 2014.
- GILLET, E. *et al.* TP53 and p53 statuses and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, 4 mar. 2014.
- GIULIANO, E. *et al.* Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 159, 12 set. 2018.
- GOLDWIRT, L. *et al.* Development of a new UPLC-MSMS method for the determination of temozolomide in mice: application to plasma pharmacokinetics and brain distribution study. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 7, p. 889–893, jul. 2013.
- GONG, K. *et al.* Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 207, p. 113–125, 2002.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 25 dez. 2006.
- GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108–4116, 1 out. 1969.
- GROCHANS, S. *et al.* Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review. **Cancers**, v. 14, n. 10, p. 2412, 13 maio 2022.
- GUO, Q. *et al.* The Role of Iron in Cancer Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 10 nov. 2021.
- HADDEN, J. M. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry of transferrins: human serum transferrin, rabbit serum transferrin and human lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, p. 59–67, 1994b.
- HAERINGEN, B. VAN *et al.* Dynamic structure of human serum transferrin from transient electric birefringence experiments. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 23, n. 2, p. 233–240, 1995.
- HARIS, P. I.; CHAPMAN, D. The conformational analysis of peptides using fourier transform IR spectroscopy. **Biopolymers**, v. 37, n. 4, p. 251–263, 1995.

- HEGDE, M. M. *et al.* Exploring anti-integrin  $\alpha 6$  antibody and transferrin-decorated dual drug-loaded liposomes as a promising nanoplatform for glioblastoma therapy: a preclinical approach. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, 2025.
- HERNANDEZ, A. K. *et al.* Intranasal pH and Olfactory Function Among Healthy Adults. **Laryngoscope**, v. 135, n. 11, p. 4317–4323, 1 nov. 2025.
- HIRUN, N.; KRAISIT, P.; TANTISHAIYAKUL, V. Thermosensitive Polymer Blend Composed of Poloxamer 407, Poloxamer 188 and Polycarbophil for the Use as Mucoadhesive In Situ Gel. **Polymers**, v. 14, n. 9, p. 1836, 29 abr. 2022.
- HODGES, L. C. *et al.* Prevalence of Glioblastoma Multiforme in Subjects with Prior Therapeutic Radiation. **Journal of Neuroscience Nursing**, v. 24, n. 2, p. 79–83, abr. 1992.
- HOLZWARTH, G.; DOTY, P. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides <sup>1</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 2, p. 218–228, 1 jan. 1965.
- HU, J. *et al.* Pharmacokinetics and antitumor efficacy of DSPE-PEG2000 polymeric liposomes loaded with quercetin and temozolomide: Analysis of their effectiveness in enhancing the chemosensitization of drug-resistant glioma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 3, p. 690–702, mar. 2016.
- HUSSAIN, S. F. *et al.* The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses<sup>1</sup>. **Neuro-Oncology**, v. 8, n. 3, p. 261–279, 1 jul. 2006.
- INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of Analytical Procedures Q2(R2)**: Guideline. [S. l.]: ICH, 30 nov. 2023. Disponível em: [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2\(R2\)\\_Guideline\\_2023\\_1130.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2(R2)_Guideline_2023_1130.pdf). Acesso em: 8 jan. 2026
- ILLUM, L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–18, jul. 2000.
- ISMAIL, M. *et al.* Targeted liposomes for combined delivery of artesunate and temozolomide to resistant glioblastoma. **Biomaterials**, v. 287, 1 ago. 2022.
- JANSSON, P.-E.; LINDBERG, B.; SANDFORD, P. A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, v. 124, n. 1, p. 135–139, dez. 1983.
- JARADAT, E.; MEZIANE, A.; LAMPROU, D. A. Conventional vs PEGylated loaded liposomal formulations by microfluidics for delivering hydrophilic chemotherapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 655, p. 124077, abr. 2024.
- JHAVERI, A. *et al.* Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. **Journal of Controlled Release**, v. 277, p. 89–101, maio 2018.
- JHAVERI, A.; LUTHER, E.; TORCHILIN, V. The effect of transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes on neurosphere cultures of glioblastoma: implications for targeting tumour-initiating cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, n. 5–6, p. 601–613, 3 jul. 2019.
- JIANG, C. *et al.* Hypofractionation in Glioblastoma: An Overview of Palliative, Definitive, and Exploratory Uses. **Cancers**, v. 15, n. 23, p. 5650, 29 nov. 2023.

- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural Analysis and Flow Rheometry of Novel, Biodhesive Antimicrobial Oral Gels. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, 1997.
- JOSE *et al.* Transferrin-Conjugated Docetaxel–PLGA Nanoparticles for Tumor Targeting: Influence on MCF-7 Cell Cycle. **Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1905, 19 nov. 2019.
- KAINA, B. Temozolomide in Glioblastoma Therapy: Role of Apoptosis, Senescence and Autophagy. Comment on Strobel et al., Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines* 2019, 7, 69. **Biomedicines**, v. 7, n. 4, p. 90, 11 nov. 2019.
- KAKUDO, T. *et al.* Transferrin-Modified Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fusogenic Peptide: An Artificial Viral-like Delivery System. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5618–5628, 1 maio 2004.
- KANG, T. *et al.* Enhancing Glioblastoma-Specific Penetration by Functionalization of Nanoparticles with an Iron-Mimic Peptide Targeting Transferrin/Transferrin Receptor Complex. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 2947–2961, 3 ago. 2015.
- KARAVANA, S. Y.; RENÇBER, S. Formulation and optimization of gellan gum-poloxamer based dexamethasone mucoadhesive in situ gel. **Journal of Research in Pharmacy**, v. 24, n. 4, p. 529–538, 16 jul. 2020.
- KATO, T. *et al.* Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. **Gene Therapy**, v. 17, n. 11, p. 1363–1371, 2010.
- KAVIRATNA, A. S.; BANERJEE, R. The effect of acids on dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) monolayers and liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 345, n. 1–3, p. 155–162, ago. 2009.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 10 ago. 2005.
- KENNEDY, L.; SUTHERLAND, I. W. Gellan lyases-novel polysaccharide lyases. **Microbiology**, v. 140, n. 11, p. 3007–3013, nov. 1994.
- KHAN, A. *et al.* Design of experiment based validated stability indicating RP-HPLC method of temozolomide in bulk and pharmaceutical dosage forms. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 402–408, dez. 2016.
- KHOSRAVANIZADEH, A.; SENS, P.; MOHAMMAD-RAFIEE, F. Role of particle local curvature in cellular wrapping. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 19, n. 196, 2 nov. 2022.
- KIM, H. K. *et al.* High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazene-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 703, n. 1–2, p. 225–233, dez. 1997.
- KUMARI, S. *et al.* Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- KUMARI, S.; MG, S.; MAYOR, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. **Cell Research**, v. 20, n. 3, p. 256–275, 2 mar. 2010.

- KUNIMATSU, K. *et al.* ATR-FTIR Study of Water in Nafion Membrane Combined with Proton Conductivity Measurements during Hydration/Dehydration Cycle. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 15, p. 4315–4321, 21 abr. 2011.
- KURANO, T. *et al.* Nose-to-brain/spinal cord delivery kinetics of liposomes with different surface properties. **Journal of Controlled Release**, v. 344, p. 225–234, abr. 2022.
- LAM, F. C. *et al.* Enhanced efficacy of combined temozolomide and bromodomain inhibitor therapy for gliomas using targeted nanoparticles. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018a.
- ARGE, D. E. *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 176, art. 113851, p. 1–23, 1 set. 2021.
- LASKE, D. W.; YOULE, R. J.; OLDFIELD, E. H. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. **Nature Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1362–1368, dez. 1997.
- LAU, D.; MAGILL, S. T.; AGHI, M. K. Molecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: current and future targets. **Neurosurgical Focus**, v. 37, n. 6, p. E15, dez. 2014.
- LAUKO, A. *et al.* Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. **Seminars in Cancer Biology**, v. 82, p. 162–175, jul. 2022.
- LAZAROS, G.; ANTONATOU, K.; VASSILOPOULOS, D. The Therapeutic Role of Interleukin-1 Inhibition in Idiopathic Recurrent Pericarditis: Current Evidence and Future Challenges. **Frontiers in Medicine**, v. 4, 12 jun. 2017.
- LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198–210, 1 set. 2016.
- LI, L. *et al.* Dual-targeting liposomes modified with BTP-7 and pH A for combined delivery of TCPP and TMZ to enhance the anti-tumour effect in glioblastoma cells. **Journal of Microencapsulation**, v. 41, n. 6, p. 419–433, 30 ago. 2024.
- LI, Q.; LI, X.; ZHAO, C. Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 13 maio 2020.
- LI, T.; TAKEOKA, S. Enhanced cellular uptake of maleimide-modified liposomes via thiol-mediated transport. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2849, jun. 2014.
- LI, W. *et al.* The Fabrication of a Gellan Gum-Based Hydrogel Loaded With Magnesium Ions for the Synergistic Promotion of Skin Wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 13 set. 2021.
- LIM, S. B.; BANERJEE, A.; ÖNYÜKSEL, H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 1, p. 34–45, out. 2012.
- LIN, S. *et al.* Prognosis Analysis and Validation of m6A Signature and Tumor Immune Microenvironment in Glioma. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 5 out. 2020.
- LIU, D. *et al.* The enhancement of siPLK1 penetration across BBB and its anti glioblastoma activity in vivo by magnet and transferrin co-modified nanoparticle.

**Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 991–1003, abr. 2018.

LIU, G.-X.; FANG, G.-Q.; XU, W. Dual Targeting Biomimetic Liposomes for Paclitaxel/DNA Combination Cancer Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15287–15303, 29 ago. 2014.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 614–628, 2012.

LOCKMAN, P. R. *et al.* Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. **Journal of Drug Targeting**, v. 12, n. 9–10, p. 635–641, 2004.

LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. **Pharmaceutics**, Basel, v. 14, n. 3, art. 543, p. 1-29, 27 fev. 2022.

LOMBARDO, S. M. *et al.* Key for crossing the BBB with nanoparticles: The rational design. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, Frankfurt am Main, v. 11, p. 866–883, 4 jun. 2020

LOPES, I. C.; OLIVEIRA, S. C. B. DE; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide - Electrochemical study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 704, p. 183–189, 2013.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2 ago. 2021.

LUNGARE, S. *et al.* Development and evaluation of a novel intranasal spray for the delivery of amantadine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 105, n. 3, p. 1209-1220, mar. 2016.

MACARTHUR, F. J. D.; MCGARRY, G. W. The arterial supply of the nasal cavity. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 274, n. 2, p. 809–815, 1 fev. 2017.

MACGILLIVRAY, R. T. A. *et al.* Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release. **Biochemistry**, v. 37, n. 22, p. 7919–7928, 1 jun. 1998.

MACKIE, A. R. *et al.* Innovative Methods and Applications in Mucoadhesion Research. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 8, 5 ago. 2017.

MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. Sustainable technologies for liposome preparation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, p. 104984, nov. 2020.

MALEŠ, P. *et al.* New spirit of an old technique: Characterization of lipid phase transitions via UV/Vis spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 272, p. 121013, maio 2022.

MALTA, T. M. *et al.* Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. 5, p. 608–620, 9 abr. 2018.

MARANDI, M. F. *et al.* Poloxamer407/gellan gum-based in situ hydrogels for ocular co-delivery of antibiotics and corticosteroids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 213, 1 ago. 2025.

MARINO, A. *et al.* Multifunctional temozolomide-loaded lipid superparamagnetic nanovectors: Dual targeting and disintegration of glioblastoma spheroids by synergic chemotherapy and hyperthermia treatment. **Nanoscale**, v. 11, n. 44, p. 21227–21248, 28 nov. 2019.

MARKIEWICZ-ZUKOWSKA, R. *et al.* Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 27 fev. 2013.

MARTINS, B. A. *et al.* Baicalein Interactions with Lipid Membrane Models: Implications for Its Protective Role against Respiratory Viral Infections. **Langmuir**, v. 41, n. 14, p. 9377–9385, 15 abr. 2025.

MARTINS, C. *et al.* Glioblastoma immuno-endothelial multicellular microtissue as a 3D in vitro evaluation tool of anti-cancer nano-therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 353, p. 77–95, jan. 2023.

MAZURIER, J.; SPIK, G. Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins I: complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 629, n. 2, p. 399–408, 1980.

MCKENZIE, B. *et al.* The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 1–8, 26 maio 2015.

MEANY, H. J. *et al.* Pharmacokinetics of temozolomide administered in combination with O6-benzylguanine in children and adolescents with refractory solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 137–142, 9 dez. 2009.

MEBRATU, Y.; TESFAIGZI, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? **Cell Cycle**, v. 8, n. 8, p. 1168–1175, 15 abr. 2009.

MELDRUM, O. W. *et al.* Mucin gel assembly is controlled by a collective action of non-mucin proteins, disulfide bridges, Ca<sup>2+</sup>-mediated links, and hydrogen bonding. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5802, 11 abr. 2018.

MESQUITA, B. S. *et al.* The Impact of Nanobody Density on the Targeting Efficiency of PEGylated Liposomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14974, 29 nov. 2022.

MIRZA, A. Z.; SIDDIQUI, F. A. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. **International Nano Letters**, v. 4, n. 1, mar. 2014.

MIRZAEI, S.; KHALILIAN, M. H.; TAHERPOUR, A. A. Mechanistic study of the hydrolytic degradation and protonation of temozolomide. **RSC Advances**, v. 5, n. 51, p. 41112–41119, 2015.

MIYOSHI, E.; NISHINARI, K. Rheological and thermal properties near the sol-gel transition of gellan gum aqueous solutions. *Em*: NISHINARI, K. (Ed.). **Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum**. 144. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 68–82.

MOODY, C. L.; WHEELHOUSE, R. T. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 7, p. 797–838, 10 jul. 2014.

- MUKHTAR, M. *et al.* Nanomaterials for Diagnosis and Treatment of Brain Cancer: Recent Updates. **Chemosensors**, v. 8, n. 4, p. 117, 20 nov. 2020.
- 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**, v. 122, p. 54–61, jan. 2018.
- MUTO, Y. *et al.* Essential role of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis in maintenance of hematopoietic stem cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 16114, 17 jul. 2017.
- NAHARROS-MOLINERO, A. *et al.* Direct and Reverse Pluronic Micelles: Design and Characterization of Promising Drug Delivery Nanosystems. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2628, 28 nov. 2022.
- NELE, V. *et al.* Effect of Formulation Method, Lipid Composition, and PEGylation on Vesicle Lamellarity: A Small-Angle Neutron Scattering Study. **Langmuir**, v. 35, n. 18, p. 6064–6074, 7 maio 2019.
- NEVES, A. R. *et al.* Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery. **Journal of Biotechnology**, v. 331, p. 108–117, abr. 2021.
- NEWLANDS, E. S. *et al.* Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–61, 1997.
- NUNES, C. *et al.* Lipid–Drug Interaction: Biophysical Effects of Tolmetin on Membrane Mimetic Systems of Different Dimensionality. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 43, p. 12615–12623, 3 nov. 2011.
- OLIVEIRA CARDOSO, V. M. DE; GREMIÃO, M. P. D.; CURY, B. S. F. Mucin-polysaccharide interactions: A rheological approach to evaluate the effect of pH on the mucoadhesive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 234–245, 15 abr. 2020.
- OLMSTED, S. S. *et al.* Diffusion of Macromolecules and Virus-Like Particles in Human Cervical Mucus. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 4, p. 1930–1937, out. 2001.
- OMURO, A. M. P.; FAIVRE, S.; RAYMOND, E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 7, p. 1909–1919, 1 jul. 2007.
- ONG, S. G. M. *et al.* Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 4, 21 dez. 2016.
- ORAIPOULOU, M.-E. *et al.* *In Vitro/In Silico* Study on the Role of Doubling Time Heterogeneity among Primary Glioblastoma Cell Lines. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- ORLIKOWSKA-RZEZNIK, H. *et al.* Cholesterol Changes Interfacial Water Alignment in Model Cell Membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 146, n. 19, p. 13151–13162, 15 maio 2024.
- ORTAN, A. *et al.* Rheological Study of a Liposomal Hydrogel Based On Carbopol. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 16, n. 1, p. 47-57, 2011.
- OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. Supplement\_3, p. iii1–iii105, 5 out. 2021.

OWUSU, S. B. *et al.* Gallium Uncouples Iron Metabolism to Enhance Glioblastoma Radiosensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 18, 1 set. 2024.

PALCHETTI, S. *et al.* The protein corona of circulating PEGylated liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 2, p. 189–196, 1 fev. 2016.

PANTOPOULOS, K. Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, n. 1, p. 1–13, 12 mar. 2004.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252–264, 22 abr. 2012.

PASARIN, D. *et al.* Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes. **Polymers**, Basel, v. 15, n. 4, art. 850, p. 1–28, 9 fev. 2023

PATEL, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1396–1401, 20 jun. 2014.

PATRA, S.; BHUTIA, S. K. Lysosomes in autophagy induction and cellular homeostasis. *Em: Autophagy Processes and Mechanisms*. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 133–152.

PAULUK, D. *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 411–417, set. 2019.

PAYNE, M. J.; PRATAP, S. E.; MIDDLETON, M. R. Temozolomide in the treatment of solid tumours: current results and rationale for dosing/scheduling. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 53, n. 3, p. 241–252, mar. 2005.

PERRIN, S. L. *et al.* Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 2, p. 625–638, 30 abr. 2019.

PETTERSSON, T. *et al.* The Effect of Salt Concentration and Cation Valency on Interactions Between Mucin-Coated Hydrophobic Surfaces. *Em: Surface and Interfacial Forces – From Fundamentals to Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 1–10.

PONKA, P.; LOK, C. N. The transferrin receptor: role in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 10, p. 1111–1137, out. 1999.

POON, M. T. C. *et al.* Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines – a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

PORTNOW, J. *et al.* The Neuropharmacokinetics of Temozolomide in Patients with Resectable Brain Tumors: Potential Implications for the Current Approach to Chemoradiation. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 7092–7098, 15 nov. 2009.

PRAKASH, S. *et al.* Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2041, maio 2013.

- PRESTWICH, G. D. *et al.* Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 53, n. 1–3, p. 93–103, abr. 1998.
- PUCCI, C. *et al.* Hybrid Magnetic Nanovectors Promote Selective Glioblastoma Cell Death through a Combined Effect of Lysosomal Membrane Permeabilization and Chemotherapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 26, p. 29037–29055, 1 jul. 2020.
- QIAN, Z. M. Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 561–587, 1 dez. 2002.
- RABANEL, J. M. *et al.* Drug-Loaded Nanocarriers: Passive Targeting and Crossing of Biological Barriers. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 19, n. 19, p. 3070–3102, 2012.
- RABANEL, J.-M.; HILDGEN, P.; BANQUY, X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 71–87, jul. 2014.
- RAJPOOT, K. *et al.* Principles and concepts in toxicokinetic. *Em: Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 1–26.
- RAMALHO, M.; COELHO, M. A. N.; PEREIRA, M. C. Nanocarriers for the delivery of temozolomide in the treatment of glioblastoma. *Em: Design and Development of New Nanocarriers*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 687–722.
- RAO, J. U. *et al.* Temozolomide arrests glioma growth and normalizes intratumoral extracellular pH. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7865, 11 dez. 2017.
- REARDON, D. A. *et al.* Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma. **JAMA Oncology**, v. 6, n. 7, p. 1003, 1 jul. 2020.
- REJMAN, J. *et al.* Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 377, n. 1, p. 159–169, 1 jan. 2004.
- RIBEIRO, D. L. *et al.* Temozolomide resistance mechanisms: unveiling the role of translesion DNA polymerase kappa in glioblastoma spheroids in vitro. **Bioscience Reports**, v. 44, n. 5, 2024.
- RICCARDI, A. *et al.* Pharmacokinetics of temozolomide given three times a day in pediatric and adult patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 52, n. 6, p. 459–464, 1 dez. 2003.
- RIDOLFO, R.; WILLIAMS, D. S.; HEST, J. C. M. VAN. Influence of surface charge on the formulation of elongated PEG- *b* -PDLLA nanoparticles. **Polymer Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2775–2780, 2020.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A Simple Equation For Description Of Solute Release I. Fickian And Non-Fickian Release From Non-Swellable Devices In The Form Of Slabs, Spheres, Cylinders Or Discs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 23–36, jun. 1987.
- ROBINSON, T. E.; MOAKES, R. J. A.; GROVER, L. M. Low Acyl Gellan as an Excipient to Improve the Sprayability and Mucoadhesion of Iota Carrageenan in a Nasal Spray to Prevent Infection With SARS-CoV-2. **Frontiers in Medical Technology**, v. 3, 16 jun. 2021.

- ŞAHİN, Ş. *et al.* Preparation and evaluation of temozolomide loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma multiforme. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, 1 dez. 2025.
- SAKPAKDEEJAROEN, I. *et al.* Transferrin-bearing liposomes entrapping plumbagin for targeted cancer therapy. **Journal of Interdisciplinary Nanomedicine**, v. 4, n. 2, p. 54–71, 26 jun. 2019.
- SALVATI, A. *et al.* Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 137–143, 2013.
- SALZANO, G. *et al.* Transferrin-Targeted Nanoparticles Containing Zoledronic Acid as a Potential Tool to Inhibit Glioblastoma Growth. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 811–830, 1 abr. 2016.
- SAMPSON, J. H. *et al.* Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 1, p. 12–25, 5 jan. 2020.
- SANDHANAM, K. *et al.* Exploring miRNA therapies and gut microbiome–enhanced CAR-T cells: advancing frontiers in glioblastoma stem cell targeting. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 398, n. 3, p. 2169–2207, 9 mar. 2025.
- SANITÀ, G.; CARRESE, B.; LAMBERTI, A. Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 26 nov. 2020.
- SCHERM, A. *et al.* Targeted therapies in patients with newly diagnosed glioblastoma—A systematic meta-analysis of randomized clinical trials. **International Journal of Cancer**, v. 152, n. 11, p. 2373–2382, 30 jun. 2023.
- SCHMOLKA, I. R. Physical Basis for Poloxamer Interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 720, n. 1, p. 92–97, 17 maio 1994.
- SENAPATI, S. *et al.* Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, 1 dez. 2018.
- SEPÚLVEDA, J. M. *et al.* Dacomitinib: an investigational drug for the treatment of glioblastoma. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 27, n. 10, p. 823–829, 3 out. 2018.
- SHAIKH, R. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89, 2011.
- SHAKERI, S. *et al.* Multifunctional Polymeric Nanoplatfoms for Brain Diseases Diagnosis, Therapy and Theranostics. **Biomedicines**, v. 8, n. 1, p. 13, 13 jan. 2020.
- SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 5, 3 dez. 2014.
- SHELKE, S. *et al.* Poloxamer 407-based intranasal thermoreversible gel of zolmitriptan-loaded nanoethosomes: formulation, optimization, evaluation and permeation studies. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 4, p. 313–323, 1 out. 2016.
- SHEN, Z. M. *et al.* Conformational stability of porcine serum transferrin. **Protein Science**, v. 1, n. 11, p. 1477–1484, 16 nov. 1992.

- SILVA, A. M. N. *et al.* Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 449, p. 214186, dez. 2021.
- SILVA, C. N. *et al.* Analysis of the Epidemiological Profile of Glioblastomas in Brazil Between 2012 and 2021: evidence and challenges for public health. **JBNC - Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 35, n. 1, p. 66–74, 2024.
- SINGH, A. *et al.* Multifunctional nanosystems for cancer therapy. *Em: Biomaterials for Cancer Therapeutics: Diagnosis, Prevention and Therapy*. [s.l.] Elsevier Ltd, 2013. p. 387–413.
- SINGH, P. *et al.* Enhancing temozolomide in vivo stability and efficacy through hybrid nanoconjugate approach for improved glioblastoma multiforme treatment. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 3, 1 jun. 2025.
- SINGH, S. Nanomedicine–Nanoscale Drugs and Delivery Systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 7906–7918, 1 dez. 2010.
- SIPOS, B. *et al.* Gellan Gum-Based In Situ Hydrogels for Nasal Delivery of Polymeric Micelles Loaded with Risperidone. **Gels**, v. 11, n. 6, p. 404, 28 maio 2025.
- SLIKA, H. *et al.* Preclinical Models and Technologies in Glioblastoma Research: Evolution, Current State, and Future Avenues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 22, p. 16316, 14 nov. 2023.
- SOANE, R. J. *et al.* Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, n. 1, p. 55–65, fev. 1999.
- SONAWANE, S.; SHELKE, H.; BONDE, S. A comprehensive review on natural polysaccharides based in situ gels for nasal drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 320, p. 145987, ago. 2025.
- SPINELLI, L. *et al.* PEGylation-Driven Remodeling of the Protein Corona on PLGA Nanoparticles: Implications for Macrophage Recognition. **Biomacromolecules**, v. 26, n. 12, p. 8522–8534, 8 dez. 2025.
- STEERE, A. N. *et al.* Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 326–333, mar. 2012.
- STEILING, W. *et al.* The HET–CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375–384, abr. 1999.
- STÉPHANOU, A.; BALLESTA, A. pH as a potential therapeutic target to improve temozolomide antitumor efficacy : A mechanistic modeling study. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 7, n. 1, 28 fev. 2019.
- STUPP, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–996, 10 mar. 2005.
- STUPP, R.; BENT, M. J. VAN DEN; HEGI, M. E. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 5, n. 3, p. 198–206, maio 2005.
- SUK, J. S. *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 99, pt. A, p. 28-51, 1 abr. 2016.

- SUN, B.-L. *et al.* Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 163–164, p. 118–143, abr. 2018.
- SUN, T. *et al.* Targeting transferrin receptor delivery of temozolomide for a potential glioma stem cell-mediated therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 74451–74465, 26 set. 2017.
- TACCHINI, L. *et al.* Transferrin Receptor Induction by Hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 24142–24146, ago. 1999.
- TAMURA, R. *et al.* Histopathological investigation of glioblastomas resected under bevacizumab treatment. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52423–52435, 9 ago. 2016.
- TAN, S. L. J.; BILLA, N. Improved bioavailability of poorly soluble drugs through gastrointestinal muco-adhesion of lipid nanoparticles. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, n. 11, art. 1817, p. 1-28, 31 out. 2021.
- TANG, X. *et al.* Magnetically manipulated and transferrin-modified liposomes for efficient brain delivery of harmine and glioblastoma therapy. **Nano Research**, v. 18, n. 10, 1 out. 2025.
- THAKKAR, J. P. *et al.* Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n. 10, p. 1985–1996, 1 out. 2014.
- THORNE, R. G. *et al.* Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. **Neuroscience**, v. 127, n. 2, p. 481–496, jan. 2004.
- TSUJI, T.; YOSHITOMI, H.; USUKURA, J. Endocytic mechanism of transferrin-conjugated nanoparticles and the effects of their size and ligand number on the efficiency of drug delivery. **Journal of Electron Microscopy**, v. 62, n. 3, p. 341–352, jun. 2013.
- URBANČIČ, I. *et al.* Nanoparticles Can Wrap Epithelial Cell Membranes and Relocate Them Across the Epithelial Cell Layer. **Nano Letters**, v. 18, n. 8, p. 5294–5305, 8 ago. 2018.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter, 1092: The Dissolution Procedure: Development and Validation. *In*: **United States Pharmacopeia-National Formulary** (USP-NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2020. Disponível em: [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/gc\\_1092.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/gc_1092.pdf). Acesso em: 1 ago. 2024
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter, 621 > : Chromatography. *In*: **United States Pharmacopeia and National Formulary** (USP 40–NF 35). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2017. v. 1.
- VANZA, J. *et al.* Formulation and statistical optimization of intravenous temozolomide-loaded PEGylated liposomes to treat glioblastoma multiforme by three-level factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 6, p. 923–933, 2018.
- VERDUGO, P. Goblet cells secretion and mucogenesis. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 157–176, out. 1990. Disponível em: [annualreviews.org](http://annualreviews.org). Acesso em: 1 ago. 2024.

- VOGT, A.-C. S. *et al.* On Iron Metabolism and Its Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4591, 27 abr. 2021.
- VOTH, B. *et al.* Transferrin receptors and glioblastoma multiforme: Current findings and potential for treatment. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1071–1076, jul. 2015.
- WALLY, J. *et al.* The Crystal Structure of Iron-free Human Serum Transferrin Provides Insight into Inter-lobe Communication and Receptor Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24934–24944, ago. 2006.
- WANG, H. F.; RYDER, A. G. Real-time monitoring of protein–liposome interaction kinetics using absorption, polarized intrinsic emission, and scattering (APIES): insights into protein corona formation. **Nanoscale**, 2026.
- WANG, K. *et al.* Protein liposomes-mediated targeted acetylcholinesterase gene delivery for effective liver cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 31, 22 dez. 2021.
- WANG, Q. *et al.* Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 32, n. 1, p. 42–56.e6, jul. 2017.
- WANG, X. *et al.* Transferrin-conjugated drug/dye-co-encapsulated magnetic nanocarriers for active-targeting fluorescent/magnetic resonance imaging and anti-tumor effects in human brain tumor cells. **RSC Advances**, v. 6, n. 107, p. 105661–105675, 2016.
- WANG, X.; LI, L.; SONG, F. Interplay of nanoparticle properties during endocytosis. **Crystals**, Basel, v. 11, n. 7, art. 728, p. 1–13, 24 jun. 2021
- WANG, Y.; FENG, Y. The efficacy and safety of radiotherapy with adjuvant temozolomide for glioblastoma: A meta-analysis of randomized controlled studies. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, Amsterdam, v. 196, art. 105890, p. 1–8, set. 2020. Disponível em: doi.org.
- WASHINGTON, N. *et al.* Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, n. 2, p. 139–146, abr. 2000.
- WAYS, T. M. M. *et al.* Silica Nanoparticles in Transmucosal Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 751, p. 1–24, 2020.
- WEAVER, M.; LASKE, D. W. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 65, n. 1, p. 3–14, 2003.
- WEBER, C. *et al.* Functionalization of Liposomes with Hydrophilic Polymers Results in Macrophage Uptake Independent of the Protein Corona. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 8, p. 2989–2999, 12 ago. 2019.
- WEI, X. *et al.* Liposome-based glioma targeted drug delivery enabled by stable peptide ligands. **Journal of Controlled Release**, v. 218, p. 13–21, nov. 2015.
- WEI, X. Q. *et al.* Improving the Stability of Liposomal Curcumin by Adjusting the Inner Aqueous Chamber pH of Liposomes. **ACS Omega**, v. 5, n. 2, p. 1120–1126, 21 jan. 2020.
- WEI, Y.; THYPARAMBIL, A. A.; LATOUR, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to

230nm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2331–2337, dez. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Target product profiles for paediatric formulations of priority cancer medicines**: Target Product Profile for a paediatric formulation of temozolomide. Geneva: WHO, 2024. Disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ncds/mnd/cancer-programme/temozolomide\\_v1.pdf?sfvrsn=d8433253\\_3](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ncds/mnd/cancer-programme/temozolomide_v1.pdf?sfvrsn=d8433253_3). Acesso em: 12 maio 2026.

WILHELM, L. P. *et al.* Intracellular and plasma membrane cholesterol labeling and quantification using filipin and GFP-D4. *Em: Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 1949p. 137–152.

WILHELM, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 5, p. 16014, 26 abr. 2016.

WONG, H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 64, n. 7, p. 686-700, 15 maio 2012.

WU, M. *et al.* Vincristine and temozolomide combined chemotherapy for the treatment of glioma: a comparison of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for dual drugs delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 8, p. 2720–2725, 12 out. 2016.

WU, M. *et al.* Self-healing hydrogels based on reversible noncovalent and dynamic covalent interactions: A short review. **Supramolecular Materials**, v. 2, p. 100045, dez. 2023.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, 1 dez. 2006.

XIE, X. *et al.* The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

XU, S. *et al.* Obesity Boosts the Tumor Delivery and Anticancer Effects of Liposomal Doxorubicin by an Apolipoprotein E-Mediated Mechanism. **Molecular Pharmaceutics**, v. 23, n. 1, p. 196–208, 5 jan. 2026.

YANG, H. *et al.* Impact of protein corona and PEGylation on the accumulation and efficacy of lysosome-disrupting lipid nanoparticles in KRAS-mutated cancer. **Nano Today**, v. 56, p. 102307, jun. 2024.

YANG, N. *et al.* **Diferriic bound human serum transferrin**: PDB 3QYT. Worldwide Protein Data Bank, 14 mar. 2012. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/3qyt>. Acesso em: 20 jan. 2026.

YAO, Y. *et al.* Water-lipid interface in lipidic mesophases with excess water. **Faraday Discussions**, v. 249, p. 469–484, 29 jun. 2023.

YOM-TOV, O.; SELIKTAR, D.; BIANCO-PELED, H. PEG-Thiol based hydrogels with controllable properties. **European Polymer Journal**, v. 74, p. 1–12, jan. 2016.

YUNG, W. K. A. *et al.* Multicenter Phase II Trial of Temozolomide in Patients With Anaplastic Astrocytoma or Anaplastic Oligoastrocytoma at First Relapse. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 9, p. 2762–2771, 1999.

ZALESKI, M. H. *et al.* Conjugation Chemistry Markedly Impacts Toxicity and Biodistribution of Targeted Nanoparticles, Mediated by Complement Activation. **Advanced Materials**, v. 37, n. 5, 11 fev. 2025.

ZHANG, H. *et al.* Ligand Size and Conformation Affect the Behavior of Nanoparticles Coated with in Vitro and in Vivo Protein Corona. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 10, p. 9094–9103, 14 mar. 2018.

ZHANG, R. X. *et al.* Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks. **Nanoscale**, v. 9, n. 4, p. 1334–1355, 2017.

ZHENG, H. *et al.* p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1129–1133, out. 2008.

ZHOU, J. *et al.* Highly penetrative, drug-loaded nanocarriers improve treatment of glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 29, p. 11751–11756, 16 jul. 2013.

ZHOU, S. *et al.* Liposome Loaded Ion/Temperature Dual Responsive Gellan Gum Hydrogel as Potential Nasal-To-Brain Delivery System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 18, n. 2, p. 571–580, 1 fev. 2022.

ZIA, K. M. *et al.* Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 109, p. 1068-1087, 1 abr. 2018.