

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**SANDRA BARBOSA NEDER AGOSTINI**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTENDO  
METOTREXATO COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA  
ARTRITE REUMATOIDE**

**Alfenas/MG**

**2020**

SANDRA BARBOSA NEDER AGOSTINI

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTENDO METOTREXATO  
COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA ARTRITE REUMATOIDE

Tese apresentada como parte dos requisitos para conclusão de curso de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Chiva Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

ALFENAS/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

A275d Agostini, Sandra Barbosa Neder.  
Desenvolvimento de sistemas de liberação contendo metotrexato como uma nova abordagem terapêutica da artrite reumatoide. / Sandra Barbosa Neder Agostini. -- Alfenas/MG, 2020.  
197f. il. –  
Orientadora: Flávia Chiva Carvalho.  
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Quitosana. 2. Derivados da Hipromelose. 3. Metotrexato. 4. Nanopartículas. 5. Hidrogéis. 6. Liberação Controlada de Fármacos. I. Carvalho, Flávia Chiva. II. Título.

CDD-615.5

SANDRA BARBOSA NEDER AGOSTINI

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTENDO METOTREXATO  
COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA ARTRITE REUMATOIDE

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 21 de agosto de 2020

Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira  
Instituição: Universidade de São Paulo - Campus de São Carlos

Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Mateus Freire Leite  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Miziara Barboza Ferreira, Usuário Externo**, em 20/08/2020, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Cancino Bernardi, Professor do Magistério Superior**, em 21/08/2020, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Magali Benjamim de Araújo, Professor do Magistério Superior**, em 21/08/2020, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mateus Freire Leite, Professor do Magistério Superior**, em 21/08/2020, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Chiva Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 21/08/2020, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0364150** e o código CRC **9DBB9F93**.

## AGRADECIMENTOS

Pai Nosso, Deus querido de Amor infinito, vos louvo e agradeço constantemente por tudo que existe, principalmente pela vida, que se renova a cada dia, repleta de aprendizados, os quais se tornam possíveis graças a vossos mensageiros que encontro pelo caminho. Portanto, neste momento, em que concluo meu doutorado, de forma especial, quero agradecer:

...à minha família querida - tanto os que me acompanham desde o princípio: meus pais, Pedro e Helena, minha irmã, Sarah, quanto aos que chegaram depois: meu marido, Mauro Junior, nossos filhos, Sofia e Nicolás. Não consigo imaginar como seria a jornada sem o amor, o estímulo, a força e os ensinamentos que neles encontro;

...à minha orientadora, profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho, que além de me transmitir muitos conhecimentos técnicos e profissionais, foi exemplo de postura ética, inteligência, paciência, respeito ao próximo, otimismo e muita garra;

...ao meu co-orientador, prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, pelos ensinamentos, pela solicitude, pela dedicação e determinação. Agradeço também a toda sua equipe, que contribuiu para os experimentos *in vivo*. Agradeço de forma especial aos colegas Iago Henrique Silva Malta e Rafaela Figueiredo Rodrigues;

...à profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira, por todos os ensinamentos, o apoio, a ajuda efetiva e a acolhida tão cordial. Embora oficialmente não tenha sido minha co-orientadora, na prática o foi certamente;

...à Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, e principalmente a seu Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade oferecida e por todo o conhecimento disponibilizado;

...a todos os colegas do Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos da UNIFAL, pela ajuda, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e apoio. Agradeço de forma especial às técnicas Neila Sena Ribeiro e Andréa Marques Roberto Passos, pela disposição, ajuda e carinho;

...a muitos outros professores, técnicos e colegas, que contribuíram para a realização desse trabalho, seja ensinando, analisando ou disponibilizando materiais, equipamentos ou instalações. Aqui se incluem membros dos laboratórios de: Fisioterapia Experimental,

Histologia do ICB, Centro de Microscopia (CEMIC - Finep 0179/12), Núcleo de Controle de Qualidade, Interdisciplinar de Química, Nutrição, Bioquímica Clínica e Experimental, Microbiologia e Imunologia Básicas, Pesquisa em Química Farmacêutica, Análise de Fármacos e Toxicantes, Cosmetologia, Bioquímica Básica, Biologia Molecular de Micro-organismos, todos da UNIFAL, e ao laboratório do Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi, da Universidade Estadual de Maringá;

...ao prof. Dr. Denismar Alves Nogueira, pelos ensinamentos e pela colaboração no tratamento estatístico dos resultados;

...aos demais professores que também contribuíram com sugestões e correções para este trabalho: o(a) avaliador(a) *ad-hoc* dos relatórios anuais, as que participaram da banca avaliadora do exame de qualificação: Dra. Juliana Cancino Bernardi e Dra. Aline Martins dos Santos, e os avaliadores da defesa, Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira, Dra. Magali Benjamim de Araujo, Dr. Mateus Freire Leite e, novamente, Dra. Juliana Cancino Bernardi;

Sendo assim, por tudo e a todos, muito reconhecimento, imensa gratidão e votos sinceros de luz, paz e bem.

Amém!

O presente trabalho foi realizado com o apoio: da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de sistemas de liberação de metotrexato (MTX) destinados à otimização do tratamento de artrite reumatoide. Foram propostos três sistemas: complexos polieletrólíticos (PECs), hidrogel termorresponsivo e a associação de ambos os sistemas. Os PECs foram constituídos por quitosana polimérica ou oligoquitosana com ftalato de hidroxipropilmetil celulose (HPMCp), carregados com MTX. O tamanho e a polidispersão dos PECs de quitosana foram ajustados por modificação da força iônica do meio, sendo que a formulação otimizada (QS-200) apresentou tamanho de partícula de  $345 \pm 79$  nm, índice de polidispersão (PdI) de  $0,285 \pm 0,067$ , potencial zeta de  $+19 \pm 2$  Mv em pH 5,5 e eficiência de encapsulação (EE) de  $29,5 \pm 24,2$  (%). Em virtude da estreita distribuição de tamanho, QS200 foi utilizado num estudo para seleção de crioprotetores, cujos resultados indicaram que manose, isolada ou associada a trealose, foi adequada para obtenção de PECs liofilizados com característica físico-químicas preservadas. Entre os PECs de oligoquitosana, a formulação com melhores características físico-químicas (OQ-7) apresentou tamanho de partícula de  $471 \pm 116$  nm, PdI de  $0,308 \pm 0,127$ , potencial zeta de  $+26 \pm 2$  mV em pH 5,9 e EE de  $74,3 \pm 5,8$ %. A formação dos PECs e a incorporação do fármaco em QS200 e OQ-7 foi comprovada por espectroscopia no infravermelho (IV) e análise térmica. QS200 e OQ-7 também foram caracterizados por microscopia de força atômica. Os hidrogéis foram obtidos a partir de uma combinação de poloxâmero 407 e poloxâmero 188 e carregados com MTX ou QS200 ou OQ-7. À temperatura ambiente os hidrogéis foram fluídos e apresentaram seringueabilidade adequada. Entre 36 e 37°C os hidrogéis adquiriram consistência suficiente para impedir o escoamento e o abrupto aumento da viscosidade em faixa de temperatura próxima à corporal foi confirmado por reometria oscilatória. Os sistemas desenvolvidos foram submetidos a estudo de liberação *in vitro*, no qual o hidrogel contendo PECs (OQ-7 ou QS200) apresentou liberação mais lenta do fármaco. Foram realizados testes pré-clínicos, onde avaliou-se o efeito da administração intra-articular, em dose única, de OQ-7, hidrogel contendo OQ-7 e hidrogel contendo MTX, sobre o limiar nociceptivo, o nível plasmático de IL-1 $\beta$  plasmática e a histologia da articulação de ratos Wistar com artrite induzida. Apesar do veículo ter apresentado um efeito irritativo, OQ-7 atenuou o processo inflamatório, revelando-se como o tratamento mais promissor. Desta maneira, PECs possuem grande potencial para administração intra-articular de MTX no tratamento de artrite reumatoide.

**PALAVRAS-CHAVE:** Quitosana. Ftalato de hipromelose. Metotrexato. Complexos polieletrólíticos. Hidrogel. Sistemas de liberação de fármaco.

## ABSTRACT

The goal of this work was to develop metotrexate (MTX)-loaded delivery systems in order to improve the rheumatoid arthritis therapy. Three kinds of MTX delivery systems were developed: polyelectrolyte complexes (PECs), thermosensitive hydrogel and association between PECs and hydrogel. The PECs were composed by polymeric chitosan or oligochitosan and hypromellose phtalate (HPMCp). Ionic strength adjustment was used in order to optimize the chitosan PECs size and polydispersity. The optimized chitosan PECs (QS 200) exhibited  $345\pm 79$  nm particle size (measured by dynamic light scattering technique),  $0.285\pm 0.067$  polydispersity index (PdI),  $+19\pm 2$  mV zeta potential at 5.5 pH and  $29.5\pm 24.2\%$  drug entrapment efficiency (EE). Because of its narrow size distribution, QS200 was used to select cryoprotectants, among them mannose was the most efficient to maintain the PECs physicochemical properties. Among the oligochitosan PECs, OQ-7 presented  $471\pm 116$  nm particle size,  $0.308\pm 0.127$  PdI,  $+26\pm 2$  mV at 5.9 pH and  $74.3\pm 5.8\%$  EE. The PECs formation and the MTX loading were proved by infrared spectroscopy and thermal analysis. QS200 and OQ-7 were also characterized by atomic force microscopy. The hydrogels were based on poloxamer 407 and poloxamer 188 mixture and were loaded with MTX, QS200 or OQ-7. At room temperature, the hydrogels were fluid and showed suitable syringability. Between  $36^\circ$  and  $37^\circ$  C, the hydrogels became thick and stopped flowing. The sharp elastic modulus increase at body temperature was observed by oscillatory rheometry technique. *In vitro* drug release assay was conducted and showed that the MTX release was slower from the PECs (OQ-7 or QS200) incorporated in hydrogel. The performance of OQ-7 and hydrogel loaded with OQ-7 or MTX, once administrated by intra-articular route, was evaluated in rats with rheumatoid arthritis induced. Although its vehicle had shown irritant effect, because of its anti-inflammatory effects on nociception, IL-1 $\beta$  plasmatic level and knee joint histology, OQ-7 was noted as the most promising treatment. Thus, PECs have great potential for treating rheumatoid arthritis.

**KEY WORDS:** Chitosan. Hypromellose phtalate. Methotrexate. Polyelectrolyte complexes. Hydrogel. Drug Delivery systems.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AIC</b>	- Critério de Informação de Akaike (do inglês <i>Akaike Information Criterion</i> )
<b>AICART</b>	- aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo transformilase
<b>ANOVA</b>	- Análise de variância
<b>A/O/A</b>	- Água/óleo/água
<b>AST</b>	- Aspartato aminotransferase
<b>ATR</b>	- Refletância total atenuada (do inglês <i>Attenuated Total Reflection</i> )
<b>CEUA</b>	- Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CFA</b>	- Adjuvante Completo de Freund (do inglês <i>Complete Freund's Adjuvant</i> )
<b>CLAE</b>	- Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>COX-2</b>	- Ciclo-oxigenase-2
<b>DHFR</b>	- di-hidrofolato redutase
<b>DLS</b>	- Espalhamento dinâmico de luz (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> )
<b>DMARD</b>	- Fármaco antirreumático modificador da doença (do inglês <i>disease-modifying antirheumatic drug</i> )
<b>DPR</b>	- Desvio padrão relativo
<b>DSC</b>	- calorimetria exploratória diferencial (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EE</b>	- Eficiência de encapsulação
<b>EL 6h</b>	- Eficiência de liberação em 6 h
<b>ELISA</b>	- Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>ERO</b>	- Espécie reativa de oxigênio
<b>f1</b>	- Fator de diferenciação
<b>f2</b>	- Fator de similaridade
<b>FDA</b>	- <i>Food and Drug Administration</i>
<b>G'</b>	- Módulo elástico
<b>G''</b>	- Módulo viscoso
<b>GD</b>	- Grau de desacetilação

<b>GEE</b>	- Equações de estimação generalizada (do inglês <i>Generalized Estimating Equation</i> )
<b>HPMC</b>	- Hidroxipropilmetilcelulose
<b>HPMCp</b>	- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose
<b>IL</b>	- Interleucina
<b>iNOS</b>	- Sintetase indutível de óxido nítrico (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
<b>LD</b>	- Limite de detecção
<b>LQ</b>	- Limite de quantificação
<b>m-PEG-PDL</b>	- Metoxi-poli(etileno glicol)- <i>b</i> -poli( $\delta$ -decalactona)
<b>MTX</b>	- Metotrexato
$\eta'$	- Viscosidade dinâmica
<b>NF</b>	- Fator de necrose (do inglês <i>necrosis factor</i> )
<b>NPs</b>	- Nanopartículas
<b>O/A</b>	- Óleo em água
<b>PCL</b>	- Poli(caprolactona)
<b>PCLA</b>	- Poli( $\epsilon$ -caprolactona-co-lactido)
<b>PECs</b>	- Complexos polieletrólíticos (do inglês <i>polyelectrolyte complexes</i> )
<b>PEG</b>	- Poli(etileno glicol)
<b>PEGMA</b>	- Poli(etileno glicol) metacrilato
<b>PEO</b>	- Poli(óxido de etileno)
<b>PdI</b>	- Índice de polidispersão (do inglês <i>Polydispersity Index</i> )
<b>PLA</b>	- Poli(ácido láctico)
<b>PLGA</b>	- Poli(ácido láctico-co-glicólico)
<b>PPO</b>	- Poli(óxido de propileno)
<b>QA</b>	- Densidade de número
$r$	- Coeficiente de correlação de Pearson
<b>SPIONs</b>	- Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (do inglês <i>superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i> )
<b>tan<math>\delta</math></b>	- Tangente de perda
<b>TG</b>	- Termogravimetria
<b>TNF</b>	- Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TPP</b>	- Tripolifosfato (do inglês <i>tripolyphosphate</i> )

- UV** - Ultra-violeta
- t<sub>30%</sub>** - Tempo necessário para liberação de 30% do fármaco
- t<sub>50%</sub>** - Tempo necessário para liberação de 50% do fármaco
- t<sub>80%</sub>** - Tempo necessário para liberação de 80% do fármaco
- TG** - Termogravimetria

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutura molecular de MTX.....	34
Figura 2	- Classificação dos sistemas de liberação contendo metotrexato para tratamento de artrite reumatoide, referenciados no MedLine até 24/06/20, segundo o tipo de carreador (A) e a via de administração pesquisada (B)....	47
Figura 3	- Formas farmacêuticas de metotrexato aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (A) e pelo U.S. Food and Drug Administration (B), disponíveis no mercado atualmente.....	49
Figura 4	- Estrutura química da quitosana.....	55
Figura 5	- Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose.....	59
Figura 6	- Etapas experimentais.....	68
Figura 7	- Aparato utilizado para determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana.....	73
Figura 8	- Caracterização de amostra de HG gelificada (B) e não gelificada (A), durante determinação da temperatura de gelificação pelo método de inversão do tubo.....	81
Figura 9	- Representação esquemática do texturômetro e do resultado gráfico.....	83
Figura 10	- Ilustração do teste de determinação da seringueabilidade.....	84
Figura 11	- Representação esquemática da célula de difusão utilizada para o teste de liberação <i>in vitro</i> .....	85
Figura 12	- Representação esquemática do conceito de eficiência de liberação no tempo de 6 h (EL6h) .....	86
Figura 13	- Representação esquemática do delineamento experimental.....	89
Figura 14	- Kit de filamentos de von Frey (A) e aplicação do teste de von Frey (B).....	90
Figura 15	- Perfil de absorção no UV de excipientes e PECs vazios (A) e cromatogramas de solução de MTX e PECs vazios (B).....	94
Figura 16	- Pureza do pico de MTX, após análise cromatográfica do sobrenadante de QS200, com detecção a 306 nm.....	95
Figura 17	- Plotagem das áreas de pico em função da concentração de soluções de MTX, analisadas por CLAE*.....	95

Figura 18	- Plotagem dos resíduos de y em torno do eixo x (A) e plotagem simultânea dos valores experimental e previsto de y (B).....	96
Figura 19	- Plotagem do volume de titulante em função de Y' para os dados obtidos a partir das titulações potenciométricas de quitosana segundo método proposto por Jiang, Chen e Zhong (2003).....	100
Figura 20	- Aspecto macroscópico de PECs de quitosana e HPMCP sem MTX (A) e PECs de oligoquitosana com MTX (B).....	102
Figura 21	- Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação dos PECs desenvolvidos.....	104
Figura 22	- Representação esquemática da definição de potencial zeta.....	107
Figura 23	- Variação de potencial zeta em função do pH apresentada por PECs de quitosana com diferentes concentrações de eletrólitos.....	107
Figura 24	- Variação de potencial zeta em função do pH apresentada por OQ-7.....	109
Figura 25	- Formas iônicas de metotrexato prevalentes nas diferentes faixas de pH.....	110
Figura 26	- Imagens* de PECs de quitosana (à esquerda) e oligoquitosana (à direita) carregados com MTX, obtidas por microscopia de força atômica.....	111
Figura 27	- Altura dos grãos acima de 10 nm, quando QS200 e OQ-7 foram observadas por microscopia de força atômica e submetidas a análise de grãos*.....	112
Figura 28	- Espectros de absorção no IV de QS200, QS200V, OQ-7, OQV, suas matérias primas de origem e os crioprotetores utilizados, obtidos em modo ATR.....	114
Figura 29	- Curvas obtidas por análise termogravimétrica (à direita) e calorimetria exploratória diferencial (à esquerda) de PECs de quitosana e seus materiais de partida.....	118
Figura 30	- Curvas obtidas por análise termogravimétrica (à direita) e calorimetria exploratória diferencial (à esquerda) de PECs de oligoquitosana e seus materiais de partida.....	120
Figura 31	- Aspecto macroscópico de amostras de PECs liofilizadas, vistas lateralmente e de cima para baixo.....	122

Figura 32	-	Influência dos diferentes crioprotetores sobre o tamanho de partícula, a polidispersão e a eficiência de encapsulação dos complexos polieletrólíticos.....	123
Figura 33	-	Distribuição de tamanho de partícula em função da intensidade de espalhamento dinâmico de luz, observada para os complexos polieletrólíticos, antes e após a liofilização.....	124
Figura 34	-	Imagens topográficas tridimensionais dos PECs, antes e após a liofilização, obtidas por microscopia de força atômica.....	125
Figura 35	-	Alturas observadas quando as imagens de microscopia de força atômica dos PECs foram submetidas a análise de grãos*.....	126
Figura 36	-	Perfis de liberação de MTX a partir de AF, M5, TM 10 e solução do fármaco.....	127
Figura 37	-	Hidrogéis de poloxâmero a temperatura ambiente (da esquerda para a direita: HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7).....	130
Figura 38	-	Hidrogéis de poloxâmero gelificados a 37°C (da esquerda para a direita: HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7).....	131
Figura 39	-	Variação de G' em função da temperatura em amostras de hidrogéis analisadas a uma frequência de 1 MHz, com incremento de 10°C/min.....	133
Figura 40	-	Variação de G', G'' e $\eta$ em função da temperatura em amostras de hidrogéis analisadas a uma frequência de 1 MHz, com incremento de 10°C/min.....	134
Figura 41	-	Variação de G''/G' em função da temperatura em amostras de hidrogéis analisadas a uma frequência de 1 MHz, com incremento de 10°C/min.....	135
Figura 42	-	Perfis de liberação de MTX <i>in vitro</i> , comparando-se, em relação à solução de fármaco livre, as diferentes partículas de quitosana e o uso ou não de hidrogel (A), a influência da adição de diferentes concentrações de eletrólitos (B) e o desempenho de diferentes crioprotetores em relação à amostra fresca (C).....	139
Figura 43	-	Tempos necessários para liberação de 30, 50 e 80% de MTX a partir das diferentes formulações (A) e a eficiência de liberação no decorrer de 6 h (EL 6h) (B).....	142

Figura 44	- Plotagem dos valores de fator de diferenciação ( $f_1$ ) e fator de similaridade ( $f_2$ ) das diferentes formulações, considerando-se como referência a solução aquosa de MTX.....	144
Figura 45	- Plotagem dos valores de fator de diferenciação ( $f_1$ ) e fator de similaridade ( $f_2$ ) para avaliação da influência da adição de eletrólitos (à esquerda) ou da liofilização (à direita) sobre o perfil de liberação.....	145
Figura 46	- Efeito dos diversos tratamentos sobre o limiar nociceptivo dos animais.....	147
Figura 47	- Efeito de diferentes tratamentos sobre a concentração plasmática de IL-1 $\beta$	148
Figura 48	- Efeitos dos tratamentos sobre a histologia da articulação tibiofemoral.....	150
Figura 49	- Imagens da cartilagem da articulação tibiofemoral de ratos sadios (A, exceto grupo AR) e ratos com artrite induzida (B), submetidos aos diversos tratamentos.....	151
Figura 50	- Imagens da sinóvia da articulação tibiofemoral de ratos sadios (A, exceto grupo AR) e ratos com artrite induzida (B), submetidos aos diversos tratamentos.....	152
Quadro 1	- Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide.....	26
Quadro 2	- Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20.....	39
Quadro 3	- Polímeros polissacarídicos utilizados para obtenção de NPs.....	54
Quadro 4	- Exemplos de sistemas de liberação desenvolvidos com quitosana e HPMC ou derivados.....	60
Quadro 5	- Fatores pesquisados durante o desenvolvimento dos PECs.....	76
Quadro 6	- Descrição dos grupos de animais.....	87
Quadro 7	- Amostras utilizadas no estudo de seleção de crioprotetores.....	122
Quadro 8	- Amostras avaliadas no teste de liberação de MTX <i>in vitro</i> , em células de difusão de Franz.....	138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Resultados para a determinação de exatidão e precisão intra e interdia do método de quantificação de MTX por CLAE.....	97
Tabela 2	- Dados obtidos pela titulação potenciométrica de quitosana segundo metodologia descrita por Jiang, Chen e Zhong (2003) .....	99
Tabela 3	- Resultados obtidos a partir das três titulações potenciométricas de quitosana segundo método desenvolvido por Jiang, Chen e Zhong (2003) .....	100
Tabela 4	- Valores de pH das suspensões frescas de PECs.....	102
Tabela 5	- Resultados da avaliação do perfil de textura dos hidrogéis.....	136
Tabela 6	- Esforço necessário para ejetar as diferentes formulações a partir de uma seringa de 1 mL acoplada a agulha 26G.....	137
Tabela 7	- Valores de coeficiente de determinação ajustado e Critério de Informação de Akaike (AIC) oriundos do ajuste dos dados experimentais de liberação <i>in vitro</i> a diferentes modelos matemáticos.....	140
Tabela 8	- Valores do expoente b oriundos do ajuste dos dados experimentais de liberação <i>in vitro</i> ao modelo matemático de Weibull.....	142

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
2.1	ARTRITE REUMATOIDE.....	21
2.2	MTX.....	34
2.3	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS..	49
<b>2.3.1</b>	<b>NPs poliméricas</b> .....	52
2.3.1.1	NPs polissacarídicas.....	53
2.4	SISTEMAS DE GELIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> .....	62
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	64
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	65
4.1	MATERIAIS.....	65
4.2	MÉTODOS.....	67
<b>4.2.1</b>	<b>Validação de metodologia analítica para quantificação de MTX</b> .....	68
4.2.1.1	Pesquisa da seletividade.....	69
4.2.1.2	Verificação da linearidade.....	69
4.2.1.3	Verificação da precisão.....	70
4.2.1.4	Verificação da exatidão.....	70
4.2.1.5	Determinação dos limites de quantificação e detecção.....	71
<b>4.2.2</b>	<b>Desenvolvimento dos PECs</b> .....	71
4.2.2.1	Caracterização da quitosana.....	71
4.2.2.1.1	<i>Determinação do grau de desacetilação</i> .....	72
4.2.2.1.2	<i>Determinação da massa molar viscosimétrica</i> .....	73
4.2.2.2	Obtenção dos PECs.....	74
4.2.2.3	Caracterização dos PECs.....	77
4.2.2.3.1	<i>Determinação de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta</i> .....	77
4.2.2.3.2	<i>Determinação da eficiência de encapsulação (EE)</i> .....	77
4.2.2.3.3	<i>Microscopia de força atômica</i> .....	80
4.2.2.3.4	<i>Espectroscopia de absorção no IV</i> .....	80
4.2.2.3.5	<i>Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial</i> .....	78
4.2.2.4	Seleção de crioprotetores.....	79
<b>4.2.3</b>	<b>Desenvolvimento dos hidrogéis</b> .....	80

4.2.3.1	Obtenção dos hidrogéis.....	80
4.2.3.2	Caracterização dos hidrogéis.....	81
4.2.3.2.1	<i>Determinação da temperatura de gelificação pelo método de inversão do tubo.....</i>	81
4.2.3.2.2	<i>Determinação da temperatura de gelificação por método reométrico oscilatório.....</i>	81
4.2.3.2.3	<i>Avaliação do perfil de textura.....</i>	82
4.2.3.2.4	<i>Determinação da seringueabilidade.....</i>	83
<b>4.2.4</b>	<b>Estudos de liberação <i>in vitro</i>.....</b>	84
<b>4.2.5</b>	<b>Prova de princípio em modelo animal.....</b>	86
4.2.5.1	Distribuição dos grupos experimentais.....	87
4.2.5.2	Protocolo experimental.....	88
4.2.5.3	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von Frey filamentos.....	89
4.2.5.4	Quantificação de IL-1 $\beta$ plasmática.....	90
4.2.5.5	Avaliação histológica da articulação tibiofemoral.....	91
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	93
5.1	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE MTX.....	93
5.2	DESENVOLVIMENTO DOS PECs.....	98
<b>5.2.1</b>	<b>Caracterização da quitosana.....</b>	98
5.2.1.1	Determinação do grau de desacetilação.....	99
5.2.1.2	Determinação da massa molar viscosimétrica.....	101
<b>5.2.2</b>	<b>Obtenção dos PECs.....</b>	101
<b>5.2.3</b>	<b>Caracterização dos PECs.....</b>	102
5.2.3.1	Determinação de tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta e EE..	103
5.2.3.1.1	<i>PECs de quitosana polimérica e estudo do efeito da adição de eletrólitos...</i>	104
5.2.3.1.2	<i>PECs de oligoquitosana.....</i>	108
5.2.3.1.3	<i>Seleção dos PECs com base no tamanho, polidispersão e EE.....</i>	109
5.2.3.2	Microscopia de força atômica.....	111
5.2.3.3	Espectroscopia de absorção no IV.....	113
5.2.3.4	Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.....	116
<b>5.2.4</b>	<b>Seleção de crioprotetores.....</b>	121
5.3	DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS.....	129

<b>5.3.1</b>	<b>Obtenção dos hidrogéis.....</b>	<b>129</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Caracterização dos hidrogéis.....</b>	<b>130</b>
5.3.2.1	Determinação da temperatura de gelificação pelo método de inversão do tubo.....	131
5.3.2.2	Determinação da temperatura de gelificação por método reométrico Oscilatório.....	132
5.3.2.3	Avaliação do perfil de textura.....	135
5.3.2.4	Determinação da seringueabilidade.....	137
5.4	ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	137
5.5	PROVA DE PRINCÍPIO EM MODELO ANIMAL.....	146
<b>5.5.1</b>	<b>Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von Frey filamentos.....</b>	<b>146</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Quantificação da IL-1<math>\beta</math> plasmática.....</b>	<b>148</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Avaliação histológica da articulação tibiofemoral.....</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>160</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>162</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Caracterizada por disfunção mecânica progressiva das articulações, a artrite reumatoide é uma doença auto-imune que causa dor acentuada e debilita imensamente os pacientes acometidos. Trata-se de um processo inflamatório intenso, localizado no espaço sinovial, que, quando não controlado, evolui para erosão da cartilagem e tecido ósseo (MCINNES; SCHETT, 2011), além de predispor a outras comorbidades (GUO *et al.*, 2018; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

Até o momento, não há cura para artrite reumatoide. Os recursos terapêuticos disponíveis conseguem modificar a progressão da patologia e aliviar os sintomas. O principal fármaco indicado é o MTX (CIPRIANI *et al.*, 2014a; GUO *et al.*, 2018), que embora seja eficaz possui estreita margem de segurança e pode desencadear reações adversas que inviabilizam o tratamento (SHINDE *et al.*, 2016a). Com as baixas doses e os esquemas posológicos (administração semanal) preconizados atualmente, a ocorrência de efeitos colaterais extremamente graves é rara entre os usuários de MTX (CONWAY; CAREY, 2017; LUCAS; DIMMITT; MARTIN, 2019; MAZAUD; FARDET, 2017), entretanto é mais provável que o tratamento com esse fármaco seja suspenso em virtude das reações adversas desencadeadas do que em decorrência de ineficiência terapêutica (GOMIDES *et al.*, 2019; LUCAS; DIMMITT; MARTIN, 2019; WANG; ZHOU; LIU, 2018). Além disso, o risco de toxicidade mesmo com baixas doses de MTX aumenta significativamente caso o paciente esteja com a função renal prejudicada (LUCAS; DIMMITT; MARTIN, 2019).

Num estudo realizado recentemente no Reino Unido, entre 606 pacientes portadores de artrite reumatoide, houve uma taxa de 26% de não adesão ao tratamento com MTX, devido principalmente à ocorrência de efeitos colaterais, os quais incluíram náusea, fadiga, dor de cabeça e tontura (HOPE *et al.*, 2020). Esses mesmos autores constataram que os pacientes com maior necessidade do tratamento (aqueles com alta atividade da doença, fadiga e com presença de múltiplas comorbidades) são os mais propensos a não aderir à terapia com MTX.

Distúrbios gastrointestinais são efeitos colaterais frequentes, podendo inclusive estar associados a baixas doses de MTX (AL-MALAQ; AL-ARFAJ; AL-ARFAJ, 2012; ASAI *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2017; GOMIDES *et al.*, 2019; MAZAUD; FARDET, 2017; SOLOMON *et al.*, 2020; WANG; ZHOU; LIU, 2018). A alteração hepática mais comum é a elevação de transaminases (CONWAY *et al.*, 2015; CONWAY; CAREY, 2017; MAZAUD; FARDET,

2017; WANG; ZHOU; LIU, 2018), sendo que quando os níveis das enzimas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) ficam duas vezes mais altos que os limites normais, a terapia com MTX deve ser interrompida (DUARTE *et al.*, 2017). Doses acumulativas de MTX, assim como a presença histórico familiar de doença hepática hereditária, consumo frequente de álcool, obesidade, diabetes mellitus, hiperlipidemia e falta de suplementação de folato podem elevar os riscos de dano hepático (LUCAS; DIMMITT; MARTIN, 2019; WANG; ZHOU; LIU, 2018).

As alterações hematológicas associadas ao MTX, embora não sejam frequentes podem ocorrer, com baixa incidência, mesmo na presença de suplementação de ácido fólico, como foi constatada numa meta-análise que incluiu a observação de 3858 pacientes com artrite reumatoide (VANNI; LYU; SOLOMON, 2020). Esses autores observaram que a incidência de anemia foi 2,55%, de leucopenia, 1,17%, de neutropenia, 1,77% e de trombocitopenia, 0,19%. A toxicidade pulmonar induzida por MTX também é considerada rara atualmente, entretanto é necessário cautela para se iniciar terapia de artrite reumatoide com tal fármaco em pacientes com doença pulmonar pré-existente (FRAGOULIS; CONWAY; NIKIPHOROU, 2019).

Além de tais riscos toxicológicos inerentes ao MTX, cumpre lembrar que a artrite reumatoide na maioria dos casos requer uso de politerapia, de uso contínuo, além de acometer pessoas idosas, que não raro convivem com outras patologias. O uso concomitante com outros fármacos pode aumentar os efeitos colaterais induzidos por MTX (WANG; ZHOU; LIU, 2018). Portanto, torna-se imprescindível o cuidado no sentido de tentar minimizar reações adversas.

Quando se pretende otimizar a atividade farmacológica de um princípio ativo muitos ganhos podem ser obtidos aplicando-se a nanotecnologia. A veiculação de fármacos por meio de um nanocarreador pode favorecer a transposição de membranas e sua internalização pelas células, controlar melhor a velocidade de liberação do ativo e melhorar sua estabilidade físico-química. Dessa forma, torna-se possível um incremento na biodisponibilidade, o qual consequentemente pode propiciar redução da dose (CANCINO-BERNARDI; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2017; PATRA *et al.*, 2018; SEVASTRE *et al.*, 2019; VENTOLA, 2012).

Além de favorecer a transposição de barreiras biológicas, os nanocarreadores podem transportar o fármaco de maneira direcionada para o sítio de ação. Isso pode ser conseguido, por exemplo, mediante funcionalização da partícula com moléculas ou fragmentos moleculares capazes de interagirem com receptores presentes nas membranas das células mais concentradas no sítio patológico (CANCINO-BERNARDI; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2017;

VENTOLA, 2012). Esse direcionamento sítio específico reduz a exposição sistêmica e atenua a ocorrência de efeitos colaterais.

Assim como os nanocarreadores, os polímeros “inteligentes” têm contribuído para o desenvolvimento de sistemas de liberação mais eficazes. Tais materiais poliméricos permitem a obtenção de hidrogéis que respondem a determinados estímulos, como variação de temperatura ou pH, e portanto, ficaram conhecidos como “*smart*” hidrogéis. A resposta dos hidrogéis pode ser em termos de gelificação *in situ*, por exemplo. Tais sistemas se mostram promissores para prolongar o tempo de residência da formulação em determinado local anatômico ou, talvez, controlar melhor a velocidade de liberação do fármaco (HRUBÝ; FILIPPOV; ŠTĚPÁNEK, 2015; JAMES *et al.*, 2014).

Com foco nas necessidades dos portadores de artrite reumatoide e nos benefícios que as nanopartículas e os polímeros inteligentes podem conferir aos sistemas de liberação, este trabalho visou propor formulações que propiciassem uma concentração adequada e uniforme do fármaco, localizada seletivamente nos sítios de inflamação, de forma a reduzir a manifestação de efeitos sistêmicos. Uma das estratégias propostas consistiu no desenvolvimento de hidrogéis injetáveis que se gelificassem dentro da articulação inflamada (YAPAR; INAL, 2012), pois tal recurso poderia reter o fármaco por mais tempo em seu local de ação, evitando sua rápida depuração. Também foram desenvolvidos PECs de quitosana e oligoquitosana (PATIL *et al.*, 2010), contendo MTX, os quais sendo nanocarreadores poderiam favorecer a internalização celular do fármaco e controlar melhor sua liberação. Ambos os sistemas foram caracterizados e avaliados, tanto isoladamente quanto associados entre si, quanto ao perfil de liberação *in vitro*. Pesquisou-se também a possível atividade biológica das formulações sobre os níveis plasmáticos de mediador inflamatório e a histologia da articulação do joelho de ratos com artrite induzida.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Buscando fornecer um panorama a respeito das manifestações patológicas e dos mecanismos que as desencadeiam, o primeiro enfoque desta seção será direcionado à artrite reumatoide. Também serão abordadas opções propostas para o tratamento intra-lesional desta patologia. Em seguida, serão apresentados aspectos inerentes ao fármaco em estudo, o MTX, e aos sistemas de liberação baseados em nanoestruturas e em hidrogéis destinados a gelificação *in situ*.

### 2.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada por: inflamação e hiperplasia sinovial, com consequente inchaço das articulações; produção exacerbada de anticorpos; destruição da cartilagem e ossos, o que acarreta o surgimento de deformidades (GUO *et al.*, 2018; MCINNES; SCHETT, 2011). É uma patologia mais prevalente entre mulheres e pessoas idosas. Seu desenvolvimento é atribuído sobretudo a fatores genéticos, mas também pode ser desencadeado pelo tabagismo (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

A falta de controle da doença resulta em dano articular, incapacidade, diminuição da qualidade de vida, comprometimento cardiovascular e outras comorbidades, como doença óssea e depressão. Podem surgir manifestações extra-articulares como: nódulos subcutâneos, síndrome de Sjögren, doença pulmonar intersticial, pericardite e pleurite, síndrome de Felty, amiloidose, vasculite reumatoide (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Também podem ocorrer fadiga e redução da função cognitiva. A taxa de mortalidade é mais alta entre pacientes com artrite reumatoide do que entre pessoas saudáveis (MCINNES; SCHETT, 2011).

A sinovite ocorre porque leucócitos migram e se infiltram no compartimento sinovial. Tal migração é decorrente de ativação endotelial em microvasos sinoviais, o que eleva a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. A produção de citocinas e a ocorrência de hipóxia local induzem a neoangiogênese, enquanto que a drenagem linfática torna-se insuficiente, implicando em acúmulo celular e ativação local de fibroblastos (MCINNES; SCHETT, 2011). A deterioração do tecido cartilaginoso está relacionada à sua invasão por fibroblastos (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Os fibroblastos produzem

metaloproteinases de matriz, as quais desagregam a rede de colágeno tipo II, o que altera o conteúdo de glicosaminoglicana e provoca retenção de água, levando diretamente à disfunção mecânica (MCINNES; SCHETT, 2011).

Na membrana sinovial, são encontrados macrófagos, mastócitos e células *natural killer*, enquanto os neutrófilos se localizam principalmente no fluido sinovial. Os macrófagos são os principais responsáveis pela sinovite, atuando por liberação de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL) 1, 6, 12, 15, 18 e 23, espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio. Também produzem prostanoídes e enzimas degradadoras de matriz extracelular, além de realizarem fagocitose e apresentação de antígenos. A contribuição dos neutrófilos para a sinovite consiste na síntese de prostaglandinas, proteases e EROs. Os mastócitos, por sua vez, produzem níveis elevados de aminas vasoativas, citocinas, quimiocinas e proteases, além de efetuarem ligação de receptores *toll-like*, os quais são ativadores de macrófagos (MCINNES; SCHETT, 2011).

Na cascata inflamatória ativa na artrite reumatoide, o TNF- $\alpha$  exerce papel fundamental por ativar a expressão de citocinas, como por exemplo IL-6, quimiocinas, moléculas de adesão endotelial, promover a angiogênese, suprimir células T reguladoras e induzir a dor. As IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 18 e 33 ativam leucócitos, células endoteliais, condrócitos e osteoclastos. Citocinas sinoviais, especificamente o fator estimulador de macrófagos e o fator ativador do receptor do ligante de NF- $\kappa\beta$  provocam a diferenciação de osteoclastos e a invasão da superfície periosteal adjacente à cartilagem articular. TNF- $\alpha$  e IL-1, 6 e 17 amplificam a diferenciação e ativação de osteoclastos. A destruição do tecido ósseo origina poços de reabsorção profunda que são preenchidos por tecido inflamatório (MCINNES; SCHETT, 2011).

A erosão óssea, além de ser desencadeada pelo aumento da ativação de osteoclastos, também é agravada por um declínio na lubrificação natural das articulações (ELSAID *et al.*, 2005; HUI *et al.*, 2012; KOSINSKA *et al.*, 2015). O fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide apresenta teores reduzidos de ácido hialurônico (glicosaminoglicana responsável por atribuir viscosidade e aumentar a retenção de água) e lubrificina (proteína condroprotetora) em relação ao de pacientes saudáveis. Além disso, o ácido hialurônico presente nos portadores de artrite apresenta menor massa molar que o normal. Tais desvios na composição do fluido sinovial podem comprometer a proteção contra o atrito entre as extremidades ósseas (HUI *et al.*, 2012; KOSINSKA *et al.*, 2015).

É necessário descobrir como resolver e restaurar a homeostasia imunológica, bem como reparar as articulações prejudicadas (MCINNES; SCHETT, 2011). O objetivo primordial do tratamento para artrite reumatoide é minimizar a atividade patológica (FIRTH; CRITCHLEY, 2011). Os agentes terapêuticos de primeira escolha são os fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), que englobam um conjunto heterogêneo de ativos capazes de reduzir o inchaço e a dor articular, diminuir os marcadores de fase aguda, limitar o dano articular progressivo e melhorar a função. O principal DMARD é o MTX, o qual deve ser introduzido logo que a patologia é diagnosticada. Outros representantes são a sulfasalazina, a leflunomida, a hidroxiquina, a cloroquina e o ouro (cujo uso é limitado por sua toxicidade). Os DMARDs podem desencadear reações adversas brandas, como náusea, ou severas, como hepatotoxicidade, discrasias sanguíneas e doença pulmonar intersticial (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

Quando os DMARDs não são suficientes para o controle da artrite reumatoide, podem ser utilizados os fármacos biológicos (PALMER; EL MIEDANY, 2014), os glicocorticoides (KISSIN, 2014) e analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Mas, tratam-se de opções terapêuticas de suporte, com várias contra-indicações (principalmente os biológicos) e que não raramente desencadeiam reações adversas consideráveis.

Cumprе ressaltar que os recursos terapêuticos disponíveis, até o momento, destinam-se ao controle da patologia e alívio dos sintomas. Portanto, os pacientes acometidos por artrite reumatoide permanecem sob tratamento contínuo e, muitas vezes, precisam ser submetidos a esquemas de fármaco associação. Em tais condições, torna-se comum a manifestação de efeitos colaterais a longo prazo, os quais podem inviabilizar o tratamento. Para amenizar tais problemas explorar vias alternativas de administração que permitam uma liberação do fármaco mais localizada, como a administração intra-articular, pode ser uma potencial alternativa para diminuição da dose, evitar efeitos sistêmicos indesejados e ter um tratamento mais eficaz.

#### ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR

A cavidade articular constitui um compartimento anatômico que permite a ação terapêutica local após injeção intra-articular, diminuindo a quantidade de fármaco em sítios não desejados. Além disso, pode constituir uma alternativa viável para administração de compostos químicos que apresentem problemas de biodisponibilidade se utilizados por via sistêmica (LARSEN *et al.*, 2008). Entretanto, oferece um desafio a ser superado: a rápida depuração tanto

de pequenas moléculas, pelos capilares sinoviais, quanto de macromoléculas, via sistema linfático (EVANS; KRAUS; SETTON, 2014).

Encontram-se disponíveis no mercado apresentações de corticosteroides destinadas a aplicação intra-articular. O primeiro anti-inflamatório esteroidal a ter comprovado seu benefício clínico para tratamento intra-articular de artrite reumatoide foi a hidrocortisona em 1951 (HOLLANDER *et al.*, 1951). No Brasil, destinadas à mesma via de administração, são comercializadas suspensões injetáveis de acetato de metilprednisolona e hexacetonido de triancinolona (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL), 2017). Administrados como suspensões microcristalinas os ésteres de esteroides são preferidos como agentes intra-articulares (KUMAR *et al.*, 2017a; ØSTERGAARD; HALBERG, 1998). Após injetados, os ésteres são hidrolisados pelas células sinoviais para liberação do ativo. A baixa solubilidade dos ésteres retarda sua captação pelos sinoviócitos e aumenta a duração do efeito (ØSTERGAARD; HALBERG, 1998).

Apesar da eficácia clínica comprovada das suspensões de corticosteroides para uso intra-articular, há algumas desvantagens. Em virtude de sua natureza cristalina, tais fármacos podem intensificar as condições inflamatórias após sua injeção no espaço sinovial, levando a artrite induzida por cristal, a qual pode ser observada em 10% dos pacientes, mas que normalmente regride em poucos dias (BUTOESCU; JORDAN; DOELKER, 2009). Sua implicação adversa mais severa é a artrite séptica, cuja incidência é de 0,01-0,03%. Também já foram relatados dano articular progressivo, atrofia tecidual local e ruptura de tendão (ØSTERGAARD; HALBERG, 1998).

Como na artrite reumatoide há um comprometimento de várias articulações, as injeções intra-articulares de corticosteroides são destinadas aos poucos sítios refratários onde a inflamação permanece ativa apesar da terapia sistêmica (KUMAR *et al.*, 2017a). Também há uma recomendação de que o intervalo mínimo entre duas injeções na mesma articulação seja de 6 semanas e que ao todo, não sejam feitas mais que quatro aplicações na mesma cavidade articular durante um ano. Apesar das inconveniências e riscos inerentes à terapia intra-articular com corticosteroides, a maioria dos estudos realizados em humanos indica que os benefícios superam os danos (ØSTERGAARD; HALBERG, 1998).

A administração intra-articular de agentes terapêuticos pode ser extremamente útil para minimizar ou prevenir a ocorrência de efeitos colaterais sistêmicos. Entretanto, o sucesso desta via alternativa depende de que concentrações adequadas do fármaco sejam mantidas dentro da

cavidade articular por tempo suficiente, o que constitui um grande desafio devido à rápida depuração dos compostos que chegam ao fluído sinovial. Tal problema pode ser contornado pela utilização de sistemas de liberação adequados (BUTOESCU; JORDAN; DOELKER, 2009).

No Quadro 1 encontram-se sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide. Nota-se que na maioria deles houve a preocupação em se prolongar o tempo de residência na articulação, pelo uso de uma matriz viscosa, e/ou veicular o fármaco nanocarreado

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

(continua)

Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Hidrogel termorresponsivo constituído por quitosana e plasma rico em plaquetas, contendo nanolâminas de fósforo negro, destinado a fototerapia	Em camundongos com artrite induzida por colágeno, o tratamento i.a. com a formulação completa, reduziu significativamente a hiperplasia sinovial e a degeneração da cartilagem e ossos (independentemente da ativação por fototerapia). Nos animais tratados apenas com associação da quitosana com as nanolâminas de fósforo negro, não houve reparo histológico.	PAN <i>et al.</i> , 2020
Nanopartículas de PLGA e ácido hialurônico contendo MTX e <sup>177</sup> Lu	A presença de ácido hialurônico aumentou significativamente a captação e internalização por células RAW 264,7. A viabilidade de tal linhagem celular foi notavelmente reduzida pelo sistema proposto.	TRUJILLO-NOLASCO <i>et al.</i> , 2019
Micropartículas de PLA/m-PEG-PDL, carregadas com triancionolona acetinado, incorporadas ou não a hidrogel termorresponsivo constituído por poli(PEGMA)	A presença do copolímero m-PEG-PDL reduziu o burst inicial de liberação de acetona <i>in vitro</i> e controlou melhor a inflamação <i>in vivo</i> , em relação a partículas constituídas apenas por PLA e fármaco. A incorporação das partículas no hidrogel sustentou ainda mais a liberação <i>in vitro</i> e controlou com maior eficácia a artrite induzida em animais.	ABOU-ELNOUR <i>et al.</i> , 2020 ABOU-ELNOUR <i>et al.</i> , 2019
Hidrogel formado <i>in situ</i> pelo entrecruzamento de ácido hialurônico modificado com tetrazina e ácido hialurônico modificado com trans-ciclo-octeno, carregado com MTX	O entrecruzamento do ácido hialurônico permitiu a formação de um depósito com características de maior gelificação do que o ácido hialurônico não entrecruzado. Por biodistribuição foi possível verificar que a partir da injeção da formulação, o MTX ficou retido na articulação por mais tempo e houve pouca distribuição para outros tecidos. A aplicação de MTX em solução ou veiculado em ácido hialurônico não entrecruzado resultou em rápida depuração. Além disso, o hidrogel entrecruzado foi mais eficaz para reverter a artrite reumatoide induzida em ratos.	SEO <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas de sílica mesoporosa co-funcionalizadas com manganês-ferrita e cério, contendo MTX	Devido a um sinergismo entre manganês-ferrita e cério, a formulação propiciou produção de O <sub>2</sub> e captura de EROs o que provocou a polarização de macrófagos pró-inflamatórios M1 em macrófagos anti-inflamatórios M2. Tal efeito anti-inflamatório foi observado <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Em modelo animal de artrite, a aplicação da formulação proporcionou alívio da hipóxia, inflamação e características patológicas da articulação.	KIM <i>et al.</i> , 2019

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Agregados de nanodiamantes funcionalizados com octadecilamina, contendo dexametasona adsorvida	Os carreadores vazios usados em alta dose apresentaram efeitos pró-inflamatórios. Os carreadores vazios em baixa dose e os carreadores carregados proporcionaram resultados equivalentes: embora tenham diminuído a presença de macrófagos na articulação e os níveis de iNOS e TNF- $\alpha$ , não foram capazes de reduzir significativamente o score artrítico, o qual foi aliviado por dexametasona livre.	PENTECOST <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas lipídicas poliméricas híbridas contendo PLGA, carregadas com siRNA de TNF	O sistema proposto apresentou EE= 93,3 $\pm$ 5,7% e reduziu o escore artrítico em animais com a mesma magnitude obtida pelo ativo injetado na forma livre. O desempenho da formulação foi inferior ao proporcionado pelo tratamento com dexametasona, adotado como controle positivo.	JANSEN <i>et al.</i> , 2019
Hidrogel formado <i>in situ</i> constituído por copolímero tribloco PCLA-PEG-PCLA funcionalizado com grupo propila, contendo celecoxib	Após administração i.a. dose única, o fármaco foi encontrado no fluído sinovial por no mínimo 14 dias, chegando a 30 dias, dependendo da concentração utilizada. Não foram observados efeitos anti-inflamatórios gerais. Os autores consideraram que a sinovite induzida foi de grau baixo a moderado.	COKELAERE <i>et al.</i> , 2018
PEC constituído por copolímero dibloco (mPEG-PCL)-PLA, contendo grupos carboxílicos pendentes, complexado com minociclina	A formulação possibilitou uma liberação <i>in vitro</i> gradativa do fármaco, a qual se prolongou por 30 dias. Observou-se <i>in vitro</i> , supressão do crescimento de células RAW 264,7 e nenhuma alteração para células sinoviais. <i>In vivo</i> constatou-se diminuição de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ , reparação da cartilagem e controle eficaz da artrite induzida.	PARK <i>et al.</i> , 2018
Hidrogel de monoestearato de triglicerol contendo triancinolona acetona	Ensaio <i>in vitro</i> demonstraram que a presença de metaloproteinases de matriz ou o fluído sinovial de pacientes com artrite estimulam a liberação do ativo encapsulado pelo hidrogel. Isso foi confirmado <i>in vivo</i> por imageamento. Animais com artrite induzida tratados com a formulação apresentaram redução do escore artrítico e do volume de pata. O tratamento com triancinolona acetona livre, em dose equivalente, não propiciou benefício clínico.	JOSHI <i>et al.</i> , 2018
Hidrogel de sericina contendo siRNA de NF-kappa $\beta$	Observou-se 40% de liberação <i>in vitro</i> em 50 dias. Por imageamento foi possível visualizar a formulação retida na articulação dos animais até 14 dias após a injeção i.a. A formulação diminuiu a incidência de artrite em animais e controlou eficazmente o escore artrítico, sendo que o ativo livre não alcançou tal desempenho.	KANAZAWA <i>et al.</i> , 2017

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

		(continuação)
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Lipossomas de fosfatidilcolina ou dipalmitoilfosfatidilcolina e colesterol contendo acetato de hidrocortisona e hemissuccinato de prednisolona	O tratamento com os lipossomas constituído por dipalmitoilfosfatidilcolina proporcionou efeito anti-inflamatório em coelhos com artrite induzida por 8 a 7 dias, enquanto o tratamento com os fármacos livres, numa dose 10 vezes maior, aliviou a inflamação por 1 dia. Os lipossomas de fosfatidilcolina apresentaram ação anti-inflamatória por 2 dias.	ROSENBERG <i>et al.</i> , 2017
Hidrogel à base de submucosa de intestino delgado modificada e entrecruzada, carregado com MTX	O entrecruzamento da submucosa evitou a rápida depuração articular <i>in vivo</i> e prolongou efetivamente a liberação de MTX <i>in vitro</i> (50% em 12 h, quase 60% em 2 dias e cerca de 95% em 40 dias). A partir da submucosa não entrecruzada, 90% do MTX foi liberado em 2 dias. A formulação proporcionou um reparo efetivo da artrite induzida em animais, demonstrando desempenho superior em relação ao fármaco livre ou carregado por submucosa não entrecruzada.	KIM <i>et al.</i> , 2016
Nanopartículas de quitosana, reticuladas com glutaraldeído e carregadas com clodronato, incorporadas a hidrogel de poloxâmero	A liberação de clodronato <i>in vitro</i> foi mais lenta a partir da associação das nanopartículas ao hidrogel do que a partir de hidrogel ou nanopartículas isoladamente. A incorporação em nanopartículas inibiu o aumento da expressão de mRNA para IL-1 $\beta$ e IL-8 provocado pelo clodronato em células THP1 estimuladas com lipopolissacarídeo.	RUSSO <i>et al.</i> , 2016
Hidrogel de poloxâmeros contendo carreador lipídico nanoestruturado carregado com MTX	A formulação propiciou uma liberação <i>in vitro</i> bem mais lenta do que a partir de MTX em solução e também foi mais efetiva para controlar o intumescimento articular em ratos com artrite induzida.	SHINDE <i>et al.</i> , 2016
Microsfersas de alginato, contendo diclofenaco de sódio, incorporadas a hidrogel de quitosana e $\beta$ -glicerofosfato	A incorporação das microesferas ao hidrogel liberou o fármaco, <i>in vitro</i> , de forma mais lenta do que a partir de microesferas ou hidrogel separados. Em animais com artrite induzida, o carregamento por microesferas associadas a hidrogel diminuiu o inchaço articular, em comparação ao fármaco livre.	QI <i>et al.</i> , 2016
Conjugado de metotrexato com ácido hialurônico	Num modelo animal de artrite induzida por antígeno, a injeção i.a. foi tão eficaz quanto MTX oral para controlar o inchaço articular, sendo que tal efeito não foi observado após injeção de mistura de ácido hialurônico e MTX ou MTX livre. A C <sub>max</sub> de MTX após tratamento oral foi 40x maior que após a injeção da formulação conjugada. Além disso, no primeiro caso observou-se hemotoxicidade e no segundo, não.	TAMURA <i>et al.</i> , 2016

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

		(continuação)
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Nanopartículas catiônicas de PLGA contendo piroxicam	A C <sub>max</sub> de piroxicam após administração i.a. da formulação foi 60% da observada após injeção do fármaco em solução. Além disso, a concentração articular de piroxicam, 24 h após o tratamento com as nanopartículas catiônicas, foi 3,2 vezes e 1,8 vezes aquelas produzidas pelo fármaco livre ou veiculado em partículas neutras, respectivamente.	KIM <i>et al.</i> , 2016b
Cristal líquido contendo cloridrato de sinomenina	O cristal líquido permitiu que o cloridrato de sinomenina permanecesse na articulação por mais que 7 dias, evitando um pico plasmático elevado, e reduziu eficazmente a concentração de IL-1 a partir de 12h, efeitos que não foram obtidos pela injeção de solução do fármaco livre.	CHEN <i>et al.</i> , 2015 LI <i>et al.</i> , 2018 LIANG <i>et al.</i> , 2019
Hidrogel de ácido hialurônico contendo MTX, microcápsulas de PLGA contendo dexametasona e associação de ambos.	A associação do hidrogel com as microcápsulas formou um depósito na articulação, que foi visualizado 24 dias após a injeção e o depósito formado pelas formulações separadas foi visualizado por 8 dias. Associação também foi mais efetiva que as formulações isoladas para reparar a artrite induzida em animais.	SON <i>et al.</i> , 2015
Lipossomas contendo paclitaxel	Em animais com artrite induzida, o tratamento i.a. com a formulação demonstrou melhor desempenho no reparo da cartilagem e redução de TNF- $\alpha$ que o paclitaxel livre, administrado por via endovenosa.	DYONDI; SARKAR; BANERJEE, 2015
Microsfersas de PCL e MPEG-PCL-MPEG contendo etanercept	Houve menor adsorção de proteínas em microsfersas de MPEG-PCL-MPEG do que em microsfersas de PCL, quando incubadas em fluido sinovial. A liberação <i>in vitro</i> de etanercept foi mais rápida a partir de microsfersas de MPEG-PCL-MPEG do que de PCL. O fármaco veiculado nas microsfersas reduziu de forma mais acentuada a liberação de citocinas inflamatórias e metaloproteinases de matriz <i>in vitro</i> , em comparação ao fármaco livre.	ERDEMLI <i>et al.</i> , 2014
Microsfersas de policaprolactona contendo triancinolona e/ou raloxifeno	A encapsulação conjunta dos fármacos aumentou a liberação <i>in vitro</i> de ambos em comparação aos fármacos encapsulados separadamente. As microsfersas contendo ambos os fármacos produziram uma melhora efetiva da artrite induzida em animais, a nível histológico, sendo que tal efeito não foi obtido com o tratamento com os fármacos livres ou carreados separadamente.	OCAL <i>et al.</i> , 2014

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

		(continuação)
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Nanocomplexo eletrostático de quitosana e ácido hialurônico com calcitonina de salmão	Os nanocomplexos foram mais eficazes que a calcitonina de salmão isoladamente, ambos administrados i.a., e equivalente a dexametasona intra-peritoneal, para redução do volume do joelho e da expressão do marcador inflamatório NR4A2, em modelo animal de artrite. A análise histológica apontou os nanocomplexos como o mais efetivo dos três tratamentos, preservando ossos, cartilagem e controlando a inflamação sinovial.	RYAN <i>et al.</i> , 2013
Nanoemulsão lipídica contendo MTX esterificado a brometo de dodecila	A formulação reduziu significativamente o infiltrado leucocitário sinovial e o extravasamento de proteínas <i>in vivo</i> , em comparação ao controle artrítico não tratado. Tais efeitos não foram obtidos com a administração de formulação comercial de MTX.	MELLO <i>et al.</i> , 2013
Microesferas de quitosana, contendo brucina, incorporadas a hidrogel de quitosana/glicerol/bórax	A incorporação das microesferas no hidrogel prolongou a liberação <i>in vitro</i> , em comparação às microesferas isoladamente. O sistema apresentou biocompatibilidade sinovial e foi detectado na articulação 7 dias após a injeção i.a.	CHEN <i>et al.</i> , 2012
Microesferas de PLGA contendo siRNA anti-TNF- $\alpha$	Após 24 h da injeção i.a., a formulação foi visualizada na articulação e em células sinoviais adjacentes. A formulação reduziu <i>in vivo</i> a expressão de TNF- $\alpha$ e o escore de inflamação sinovial, em comparação a seu veículo (outros controles não foram apresentados).	PRÉSUMEY <i>et al.</i> , 2012
Coloide de SnF contendo $^{90}\text{Y}$	A formulação permaneceu estável quando incubada com soro humano e fluido sinovial, a 37° C por 7 dias. O extravasamento de $^{90}\text{Y}$ da articulação foi de 1,96%, 96 h após a aplicação, indicando uma boa retenção no espaço sinovial.	JANKOVIC <i>et al.</i> , 2012
Hidrogel de ácido hialurônico modificado com tiramina, carregado ou não com dexametasona	Tanto o hidrogel contendo dexametasona quanto isento de fármaco reduziram <i>in vivo</i> a secreção de prostaglandina E2 e IL-6, comparados ao controle negativo de tratamento.	KIM <i>et al.</i> , 2011
Hidrogel termorresponsivo à base de PCL-PEG-PCL contendo MTX	A Cmax i.a. única de MTX livre foi 3x maior que após administração da formulação. Além disso, a detecção de MTX plasmático foi possível até 8 h e 24 h após a aplicação, para MTX livre e MTX em hidrogel, respectivamente.	MIAO; SONG; MA, 2011

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

		(continuação)
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Microsfersas de PLGA contendo lornoxicam	Após injeção i.a. da formulação em coelhos, a $C_{max}$ de lornoxicam foi $31,61 \text{ ng.mL}^{-1}$ e foi observada em 60 h, sendo que o fármaco pode ser detectado até 96 h. Após injeção de solução de lornoxicam, a $C_{max}$ foi $400,79 \text{ ng.mL}^{-1}$ e ocorreu em 3 h, sendo que após 24 h não houve mais detecção do fármaco.	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
Microsfersas de PCL contendo quercetina	A formulação demonstrou biocompatibilidade <i>in vitro</i> , com células sinoviais de coelho, e <i>in vivo</i> , em ratos Wistar. Houve liberação <i>in vitro</i> por mais de 30 dias.	NATARAJAN <i>et al.</i> , 2011
Nanopartículas PLA ou PLGA revestidas com hialuronato anfifílico	Os carreadores desenvolvidos demonstraram boa compatibilidade com a articulação de animais, após injeção i.a., sendo observada uma fraca hiperplasia sinovial. A resposta inflamatória foi investigada e constatou-se que não houve aumento da expressão de mRNA para TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .	ZILLE <i>et al.</i> , 2010
Micropartículas de PLGA contendo em seu núcleo SPIONs, carregadas com acetato de dexametasona	As micropartículas apresentaram biocompatibilidade com sinoviócitos e foram internalizadas por fagocitose. Por análise histológica constatou-se que a formulação não induziu qualquer reação inflamatória na articulação.	BUTOESCU <i>et al.</i> , 2009
Microsfersas de PLA contendo MTX	Não foi possível observar efeitos farmacológicos após tratamento com as microsfersas de MTX ou MTX livre em coelhos com artrite induzida, em comparação a tratamento com tampão fosfato.	LIANG <i>et al.</i> , 2009
Lipossomas contendo diclofenaco de sódio, incorporados em gel de carbopol 940	O tratamento i.a. com a formulação inibiu a hiperplasia sinovial, a infiltração leucocitária e a erosão de cartilagem e ossos em animais com artrite induzida. Além disso, a formulação foi mais efetiva para o controle do inchaço articular do que uma preparação comercial, destinada a aplicação tópica, contendo concentração 10x maior de diclofenaco de sódio.	TÜRKER <i>et al.</i> , 2008
Micelas poliméricas baseadas em polifosfazenos anfifílicos, carregadas com indometacina	As micelas demonstraram melhor controle do inchaço articular em animais com artrite induzida quando comparadas a tratamento com indometacina livre.	ZHANG <i>et al.</i> , 2007
Lipossomas contendo lactoferrina	Em modelo animal de artrite, tanto a lactoferrina lipossomada quanto livre foram efetivas para reduzir o escore artrítico. <i>In vitro</i> , os lipossomas foram mais eficientes em reduzir a produção de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ . Além disso os lipossomas contendo lactoferrina estimularam a produção de citocinas anti-inflamatórias.	TRIF <i>et al.</i> , 2007

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Microesferas de gelatina contendo flubiprofeno	Após administração i.a. da formulação o tempo de residência médio foi prolongado e a C <sub>max</sub> de flubiprofeno foi 2x menor, em comparação à aplicação do fármaco livre.	LU <i>et al.</i> , 2007
Hidrogel de polipeptídeos semelhantes a elastina, com propriedades de auto-aglomeração	Demonstrou-se que após 48 h da aplicação i.a., 80% da formulação permaneceu na articulação, percentual que caiu para menos que 10% em 14 dias e que após 28 dias, ainda era maior que 1%. Quando foram injetados polipeptídeos sem a propriedade de auto-aglomeração, em 15 h, 60% da formulação estava distribuída no sangue e menos de 1% restava na articulação.	BETRE <i>et al.</i> , 2006
Lipossomas e niossomas contendo diclofenaco de sódio, livres ou incorporados a hidrogel de Carbopol	Os lipogelossomas e niogelossomas prolongaram significativamente a liberação de diclofenaco <i>in vitro</i> , em comparação aos lipossomas e niossomas.	TÜRKER <i>et al.</i> , 2005
Microesferas de PLGA peguiladas contendo indometacina	A formulação liberou indometacina por 21 dias <i>in vitro</i> , de forma mais lenta nos 9 primeiros dias. A formulação carregada, testada em cultura de esplenócitos, resultou em uma viabilidade celular entre 69 e 82%, e as microesferas vazias, praticamente 100%.	PUEBLA <i>et al.</i> , 2005
Microesferas de quitosana contendo celecoxibe	A inclusão de celecoxibe em microesferas permitiu uma concentração 10x maior do fármaco no fluído sinovial, 24 h após injeção i.a., e menor distribuição para outros órgãos, em comparação à solução do fármaco. A avaliação histológica da articulação dos animais demonstrou ausência de reações inflamatórias, indicando boa compatibilidade da formulação.	THAKKAR <i>et al.</i> , 2004
Microesferas de PLA contendo MTX	A C <sub>max</sub> de MTX resultante da injeção i.a. de solução do fármaco foi 10x superior à observada após aplicação do fármaco veiculado pelas microesferas.	LIANG <i>et al.</i> , 2004
Complexo de quitosana contendo <sup>166</sup> Ho	Nesse estudo clínico, realizado com 16 pacientes portadores de artrite, constatou-se que após 24 h da injeção i.a. da formulação, houve pouco extravasamento da articulação, sendo detectados os seguintes níveis de <sup>166</sup> Ho: 0,3% no cérebro, 0,6% no pulmão, 0,7% no abdome e 0,8% na pelve. Os principais efeitos colaterais foram dor transitória no joelho, pós-injeção e inchaço.	SONG <i>et al.</i> , 2001
Microesferas de albumina contendo diclofenaco de sódio	A formulação, quando comparada a microesferas vazias ou a diclofenaco de sódio em solução, promoveu uma redução significativa na detecção cintilográfica de lesões artríticas, após 30 dias de injeção i.a. em animais.	TUNÇAY <i>et al.</i> , 2000

Quadro 1 - Sistemas de liberação investigados como alternativas para administração intralesional no tratamento da artrite reumatoide

(conclusão)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referência
Microesferas de gelatina/sulfato de condroitina contendo albumina ou catalase	Demonstrou-se que as microesferas são degradadas, liberando 100% das proteínas, quando em presença de metaloproteases. A formulação não apresentou citotoxicidade quando incubada com fibroblastos sinoviais e não provocou resposta inflamatória <i>in vivo</i> .	BROWN <i>et al.</i> , 1998
Coloide sulfuroso contendo <sup>188</sup> Re	Constatou-se que 48 h após a aplicação i.a., 87% da formulação permaneceu retida na articulação e que as maiores atividades detectadas fora do joelho foram no fígado e nos rins.	WANG <i>et al.</i> , 1995
Lipossomas contendo clodronato	Demonstrou-se que <i>in vitro</i> o clodronato lipossomado afetou macrófagos de forma mais rápida e efetiva do que na forma livre. Lipossomas constituídos por fosfatidilglicerol (25-100%), os quais apresentaram potencial zeta altamente negativo e pressão osmótica interna elevada, propiciaram rápida liberação <i>in vitro</i> . Lipossomas com carga neutra e iso-osmóticos (constituídos por 100% de fosfatidilcolina) não liberaram.	MÖNKKÖNEN <i>et al.</i> , 1995
Macroagregados de hidróxido férrico contendo <sup>165</sup> Dy	De um total de 93 pacientes portadores de artrite, 63 puderam ser reavaliados 1 ano após a administração i.a. da formulação, dos quais 61% apresentaram alívio completo ou quase completo dos sintomas, pouco ou nenhum derrame articular e manutenção da capacidade motora. Resultados moderados foram observados em 23% e 16% apresentaram dor contínua, derrame articular e limitação da mobilidade.	SLEDGE <i>et al.</i> , 1986
Lipossomas contendo <sup>177</sup> Lu	Em coelhos com artrite induzida, 47 dias após o tratamento i.a. constatou-se que a perda média de radioatividade foi menor que 1% ao dia. Houve melhora clínica e histológica dependendo da dose administrada.	BARD; KNIGHT; PAGE- THOMAS, 1985

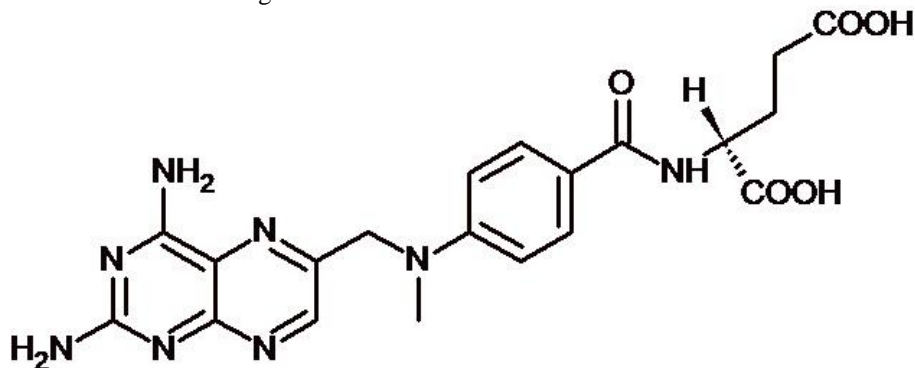
Legenda: i.a.= intra-articular; EROs= espécies reativas de oxigênio; PEGMA= poli(etileno glicol) metacrilato; m-PEG-PDL= metoxi-poli(etileno glicol)-*b*-poly( $\delta$ -decalactona); MTX= metotrexato; PLGA= poli(ácido lático-co-ácido glicólico); PCL= policaprolactona; PCLA= poli( $\epsilon$ -caprolactona-co-lactido); MPEG= metoxipoli(etileno glicol); PEG= poli(etileno glicol); PEC= complexo polieletrólítico; PLA= poli(ácido lático); NF= fator de necrose; iNOS= sintetase indutível de óxido nítrico; SPIONS= nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas; siRNA= ácido ribonucleico silenciador; mRNA= ácido ribonucleico mensageiro; TNF= fator de necrose tumoral; Cmax= concentração plasmática máxima

Fonte: DO AUTOR (2020)

## 2.2 MTX

Em 1950 o MTX (FIGURA 1) foi introduzido na terapêutica para câncer (MEYER *et al.*, 1950) e na década de 70 surgiram indicações para outras patologias. Em 1988 foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de artrite reumatoide (CRONSTEIN; BERTINO, 2000). De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica o MTX é classe III, sendo uma molécula hidrofílica com baixa permeabilidade ( $\log P = -1,85$ ) (HANSCH; LEO, 1995). É praticamente insolúvel em água, etanol, clorofórmio e éter, levemente solúvel em ácido clorídrico diluído e solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos e carbonatos (LEWIS, 1997). Portanto, sua solubilidade é pH dependente.

Figura 1 - Estrutura molecular de MTX



Fonte: EUROPEAN Pharmacopoeia (2008)

Classificado como DMARD, o MTX é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento de artrite reumatoide, em virtude de apresentar favorável relação risco/benefício e baixo custo. Pode ser utilizado como monoterapia ou em associação com outros DMARDs e/ou com algum agente biológico se for necessário (CIPRIANI *et al.*, 2014b). MTX é um antagonista de ácido fólico. O ácido fólico é reduzido a dihidrofolato e, posteriormente, a tetrahydrofolato, por atividade da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). A participação dos folatos reduzidos é crucial em vias metabólicas que originam ácido inosínico, um precursor de purinas, e ácido timidílico, nucleotídeo específico para ácido desoxirribonucleico (DNA). MTX se liga à DHFR e, portanto, prejudica a biossíntese de DNA e ácido ribonucleico (RNA). Altas doses de MTX, como as que são utilizadas na terapia do câncer, comprometem em maior extensão a síntese de DNA pelas células que se encontram na fase S do ciclo celular, por isso tecidos onde a

renovação celular ocorre com maior rapidez são mais suscetíveis à ação citotóxica desse fármaco (SEGAL; YARON; TARTAKOVSKY, 1990). Além da DHFR, o MTX também pode inibir outras enzimas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos como a timidilato sintetase, a aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo transformilase (AICART) e a amido fosfo-ribosil transferase. Embora o mecanismo da ação anti-inflamatória de MTX permaneça controverso, AICART tem sido apontada como potencial alvo de MTX para tratamento de artrite reumatoide (INOUE; YUASA, 2014). A ação benéfica de MTX em artrite reumatoide, a qual é observada com dosagens mais baixas, está mais relacionada à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias do que à interferência na divisão celular. A inibição de DHFR por MTX, impede reações de transmetilação que são fundamentais para a síntese de poliaminas, compostos comprovadamente envolvidos na patogênese de artrite reumatoide. Além disso, MTX provoca um aumento na liberação de adenosina no meio extracelular o que reduz a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, eleva a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 e prejudica a adesão celular (CRONSTEIN, 1996).

A dose de MTX deve sempre ser ajustada de acordo com as características físicas do paciente, o grau da doença estabelecida e sua evolução. Pode ser administrado semanalmente por via oral, subcutânea ou intramuscular (CIPRIANI *et al.*, 2014).

Após a administração oral o MTX é rapidamente absorvido na extremidade proximal do jejuno. Como tal processo de absorção é ativo, pode ser saturado (INOUE; YUASA, 2014; ROON; LAAR, 2010), o que faz com que a biodisponibilidade a partir de doses mais altas de MTX seja menor em relação à obtida com doses menores, pela via oral (BIANCHI *et al.*, 2016; KHAN; TRIPATHI; MISHRA, 2012; ROON; LAAR, 2010). A extensão de absorção do MTX é altamente variável entre os indivíduos (INOUE; YUASA, 2014; LEBBE *et al.*, 1994) ao contrário da variabilidade intra-individual na biodisponibilidade, que é pequena (ROON; LAAR, 2010). O MTX oral está sujeito ao metabolismo de primeira passagem, por ação das enzimas aldeído oxidase e xantino oxidase, originando o metabólito 7-hidroxi-MTX (ROON; LAAR, 2010). Tal metabólito possui uma atividade anti-folato reduzida em relação a MTX (FIEHN, 2010). De 5 a 7% da dose de MTX é excretada pela urina na forma hidroxilada. Menos de 5% da dose administrada de MTX é metabolizado a ácido 4-amino-desoxi-N10-metilpteroico pela flora intestinal (KHAN; TRIPATHI; MISHRA, 2012; ROON; LAAR, 2010). Mais do que 80% do MTX administrado é excretado na forma intacta, preferencialmente na urina (CIPRIANI *et al.*, 2014; INOUE; YUASA, 2014).

Normalmente, a meia vida sérica do MTX é de 6 a 9 horas (CIPRIANI *et al.*, 2014). O fármaco presente no plasma pode se ligar às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina e assim ser transportado. A ligação entre a albumina e os fármacos baseia-se em interação entre partes hidrofóbicas (forças de Van der Waals) e interações eletrostáticas, por isso o complexo proteína-ligante, o qual é capaz de atravessar o endotélio capilar, se desfaz quando entra em contato com uma célula, propiciando a internalização do fármaco (FIEHN, 2010).

O MTX pode ser transportado ativamente para o interior de eritrócitos, leucócitos, hepatócitos e sinoviócitos. A internalização pode se realizar por carreadores que são expressos em muitas partes do corpo como o carreador de folato reduzido (CIPRIANI *et al.*, 2014b; FIEHN, 2010; INOUE; YUASA, 2014). Pode ocorrer também por meio do receptor de folato (FC)  $-\alpha$ ,  $-\beta$ , ou  $-\gamma$ , os quais em células não ativadas possuem baixa afinidade por MTX. Entretanto, FC- $\beta$  glicosilado, o qual está presente em monócitos ativados e macrófagos da membrana sinovial de pacientes com artrite reumatoide, possui maior capacidade de ligação a MTX e folatos (FIEHN, 2010; INOUE; YUASA, 2014).

No meio intracelular, por ação da enzima folil-poliglutamato sintetase, o MTX pode receber a adição de um a seis resíduos de glutamato (INOUE; YUASA, 2014; ROON; LAAR, 2010). O MTX poliglutamato constitui forma mais ativa para inibição da enzima AICART (DERVIEUX; ZABLOCKI; KREMER, 2010; INOUE; YUASA, 2014) e não pode sofrer efluxo celular, a menos que seja clivado gama-glutamil-hidrolase. O acúmulo intracelular de MTX-poliglutamato permite uma presença intracelular prolongada de MTX após administração semanal (ROON; LAAR, 2010). Níveis mais altos de MTX acoplados a cadeias mais longas de glutamato podem ser obtidos em função da dose, do tempo de exposição ou da via de administração, como por exemplo, pela administração parenteral ao invés de oral (DERVIEUX; ZABLOCKI; KREMER, 2010).

A via oral é fortemente preferida em decorrência do conforto propiciado e de seu custo mais acessível (CIPRIANI *et al.*, 2014). Constatou-se que a divisão da dose oral semanal, com alguns dias de intervalo entre as administrações, produz resultados mais eficazes do que o uso de dose única semanal (DHAON *et al.*, 2018). Entretanto, valores séricos mais altos, os quais só são obtidos por administração parenteral, estão associados com melhor resposta clínica em indivíduos com artrite reumatoide (CIPRIANI *et al.*, 2014). Vários trabalhos reportaram uma maior disponibilidade de MTX quando administrado parenteralmente (GOODMAN; CRONSTEIN; BYKERK, 2015; ROON; LAAR, 2010; YAZICI; BATA, 2013), seja por via intra-muscular (JUNDT *et al.*, 1993) ou subcutânea (BIANCHI *et al.*, 2016; HOEKSTRA *et*

*al.*, 2004; JAY, 2015; JUNDT *et al.*, 1993; LI *et al.*, 2016; SHARMA; SCOTT, 2015). Vinte e quatro horas após administração intra-muscular, foram encontrados níveis de MTX dez vezes maiores na articulação do que no plasma (BOLOGNA *et al.*, 1994; WIGGINTON *et al.*, 1980). Em termos de biodisponibilidade as vias intra-muscular e subcutânea foram consideradas intercambiáveis (BROOKS *et al.*, 1990; STAMP *et al.*, 2006).

A administração parenteral de MTX também tem sido associada a uma maior eficácia clínica para tratamento de artrite reumatoide (BIANCHI *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2008; HAZLEWOOD *et al.*, 2016; JAY, 2015; LI *et al.*, 2016; WEGRZYN; ADELEINE; MIOSSEC, 2004; YAZICI; BATA, 2013) e menor ocorrência de efeitos colaterais (BIANCHI *et al.*, 2016; BRANCO *et al.*, 2016; JAY, 2015; LI *et al.*, 2016; SHARMA; SCOTT, 2015; WEGRZYN; ADELEINE; MIOSSEC, 2004; YAZICI; BATA, 2013), principalmente gastrointestinais, em comparação à administração oral. Entretanto, alguns autores não encontraram diferença quanto a frequência de reações adversas quando as vias parenteral e oral foram comparadas (BRAUN *et al.*, 2008; HAZLEWOOD *et al.*, 2016).

A manifestação de toxicidade relacionada ao uso de MTX pode ser mais prevalente quando associada a fatores de risco como: ingestão de álcool, função renal prejudicada, hipalbuminemia, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), hepatite B, anormalidades pulmonares, obesidade e diabetes (AL-MALAQ; AL-ARFAJ; AL-ARFAJ, 2012; STAMP *et al.*, 2006). Os efeitos colaterais relatados com maior frequência são distúrbios gastrointestinais (AL-MALAQ; AL-ARFAJ; AL-ARFAJ, 2012; ASAI *et al.*, 2019; KHAN; TRIPATHI; MISHRA, 2012; KINDER *et al.*, 2005; STAMP *et al.*, 2006; TILLING; TOWNSEND; DAVID, 2006), como vômito, náusea, úlcera na boca, diarreia, indigestão, dor abdominal, diverticulite e anormalidades da função hepática. O aumento das enzimas hepáticas ALT e AST é comum durante a terapia com MTX, e a duplicação de seus níveis em relação aos valores normais, constitui motivo para suspensão do fármaco e realização de biópsia hepática (STAMP *et al.*, 2006).

Distúrbios pulmonares também são reportados (KHAN; TRIPATHI; MISHRA, 2012; KIM; SONG; RYU, 2009; KINDER *et al.*, 2005; SALEHI; MILLER; KHAING, 2017; STAMP *et al.*, 2006; SUEMORI *et al.*, 2015) e incluem tosse improdutiva, dispneia, febre, nódulos pulmonares, pneumonia intersticial, asma e fibrose pulmonar. A ocorrência de pneumonia também é indicativo para retirada do MTX (STAMP *et al.*, 2006) e já levou a desfecho fatal (KINDER *et al.*, 2005). Também podem ocorrer alterações hematológicas (AL-MALAQ; AL-ARFAJ; AL-ARFAJ, 2012; KHAN; TRIPATHI; MISHRA, 2012; KINDER *et*

*al.*, 2005; STAMP *et al.*, 2006) como anemia, neutropenia, plaquetopenia e pancitopenia. A pancitopenia severa associada a baixa dose de MTX é uma complicação potencialmente grave, que pode ocorrer a qualquer momento durante a terapia e já levou paciente de artrite reumatoide a óbito (CALVO-ROMERO, 2001).

Podem ocorrer ainda efeitos colaterais cutâneos (KHAN; TRIPATHI; MISHRA, 2012; KINDER *et al.*, 2005; STAMP *et al.*, 2006) como rash, prurido, alopecia e dermatite. Também já houve relatos de leucoencefalopatia (GONZÁLEZ-SUÁREZ *et al.*, 2014; WORTHLEY; MCNEIL, 1995), dano renal decorrente de infiltração neutrofílica e stress oxidativo (KOLLI *et al.*, 2009) e de meningite asséptica (HAWBOLDT; BADER, 2007)

A administração intra-articular de MTX, embora menos explorada, representa uma alternativa para tentar minimizar a exposição sistêmica. Tal via de aplicação já foi avaliada clinicamente para o tratamento de pacientes com artrite reumatoide e resultou na diminuição de sinais inflamatórios sistêmicos e locais, após aplicação no joelho, na dose de 10 mg e com frequência semanal (IAGNOCCO *et al.*, 2006). A mesma dosagem também já foi aplicada em articulações de tamanho médio (tornozelo, pulso e cotovelo) e propiciou a diminuição do grau de sinovite (MORTADA; ABDELWHAB; ELGAWISH, 2018).

Uma outra alternativa pra se otimizar a eficácia clínica do MTX é o desenvolvimento de sistemas de liberação, destinados a uma ação farmacológica mais restrita ao sítio inflamatório. Em pesquisa na base de dados MedLine, realizada no dia 24/06/20, utilizando-se os termos “methotrexate” AND “rheumatoid arthritis” AND “drug carriers” OR “drug delivery systems” OR “dosage forms” OR “drug administration routes”, foram encontrados 46 sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide, os quais encontram-se relacionados e referenciados no Quadro 2.

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continua)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
Nanopartículas de PEG-PLGA, contendo MTX, revestidas com filme de Au	A liberação de MTX pelas partículas foi acelerada pela geração local de calor após irradiação com infravermelho próximo. Observou-se acúmulo da liberação em sítios inflamados, após administração endovenosa. O tratamento com a formulação associado a aplicação de infravermelho promoveu recuperação da artrite induzida em animais, a nível de histologia e de citocinas inflamatórias plasmáticas, equivalente ao controle positivo de tratamento.	(HA <i>et al.</i> , 2020)
Lipossomas contendo MTX e catalase, constituídos por monoestearato de PEG conjugado com folato	Estudos <i>in vitro</i> mostraram que a formulação apresentou liberação de fármaco sensível a EROs, aumento na internalização celular por endocitose mediada por folato e alta citotoxicidade frente a células RAW 264,7 ativadas. As análises <i>in vivo</i> revelaram um tempo de circulação prolongado, aumento do acúmulo de MTX em sítios de inflamação em animais com artrite, eficácia terapêutica reforçada e toxicidade mínima em outros órgãos, após administração endovenosa.	(CHEN <i>et al.</i> , 2019)
Nanopartículas com capacidade de auto-montagem, constituídas por quitosana glicólica modificada com ácido esteárico, carregadas com MTX	Constatou-se <i>in vitro</i> uma alta captação da formulação por células RAW264,7. Em modelo animal de artrite, houve alto acúmulo da formulação em articulações inflamadas, após administração sistêmica. A formulação apresentou eficácia terapêutica maior em relação a MTX livre.	(LI <i>et al.</i> , 2019)
Micelas híbridas constituídas por polímero conjugado a MTX, contendo micro RNA124	Constatou-se <i>in vitro</i> que a captação da formulação por células RAW264,7 foi mediada por receptor de folato. O micro RNA foi liberado do endossoma e hiporregulou o fator nuclear de células T citoplasmáticas 1 ativadas. A formulação se acumulou em articulações inflamadas de ratos com artrite e exerceu efeito anti-inflamatório e protetor ósseo.	(HAO <i>et al.</i> , 2019)
Lipossomas duplos conjugados a folato, contendo prednisolona e MTX	Os lipossomas funcionalizados com folato foram mais eficientes do que lipossomas simples e do que solução dos fármacos livres para controle do edema de pata em ratos com artrite induzida. A presença do folato aumentou o direcionamento para os sítios de inflamação, após administração endovenosa.	(VERMA <i>et al.</i> , 2019)

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
Lipossomas deformáveis contendo MTX, dispersos em hidrogel de hidroxietil celulose	A formulação não apresentou qualquer sinal de irritação ou toxicidade dérmica. Houve liberação sustentada por até 48 h, com baixo acúmulo no fígado, rins e intestino. O tratamento transdérmico com o nanogel melhorou significativamente o edema de pata, o score de artrite e o dano articular (avaliado por histologia e radiologia) em ratos com artrite induzida. Houve redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ e IL-6.	(SADARANI <i>et al.</i> , 2019)
Micelas poliméricas constituídas por PCL-PEG e PEI-PEG, carregadas com MTX e siRNA para a proteína Notch-1	Após administração endovenosa em ratos, a formulação propiciou AUC e $t_{1/2}$ 4 e 6 vezes maiores, respectivamente, em comparação a MTX livre. Em animais com artrite induzida houve redução significativa do edema de pata, diminuição do score de artrite e retardo na evolução da doença.	(ZHAO; ZHANG, 2018)
Nanopartículas lipídicas poliméricas peguizadas compostas por PLGA e poliactal PK3, carregadas com MTX e funcionalizadas com ácido fólico e ácido esteárico-octa-arginina	As nanopartículas desenvolvidas foram mais eficazes que MTX livre para melhorar os índices de artrite, normalizar os índices séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 e reparar as alterações histológicas da articulação em ratos com artrite induzida, após administração subcutânea. Estudos <i>in vitro</i> demonstraram maior liberação de MTX em ambiente ácido e internalização por macrófagos mediada por receptores de folato.	(ZHAO <i>et al.</i> , 2018b)
Micelas constituídas por um conjugado de ácido siálico, dextrana e ácido octadecanoico, carregadas com MTX	Em ratos com artrite induzida tratados endovenosamente com a formulação houve inibição significativa da resposta inflamatória concomitante com níveis reduzidos de ALT, AST, creatinina e uréia. Tais animais também apresentaram densidade óssea significativamente maior do que os receberam MTX livre.	(XU <i>et al.</i> , 2018a)
MTX e nanopartículas de fosfato de cálcio contendo siRNA para NF-kB foram encapsulados em lipossoma peguizado funcionalizado com folato	Em camundongos com artrite induzida tratados com a formulação por via endovenosa, houve uma redução significativa do edema de pata, dos índices de artrite e dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ e IL-1. A formulação não reduziu o número de leucócitos, ao contrário do que ocorreu com MTX livre, indicando menor toxicidade. Estudos com células RAW 264,7 mostraram que a formulação foi mais internalizada por células inflamadas do que não inflamadas e que a presença do folato aumentou a internalização.	(DUAN; LI, 2018)

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
Nanopartículas de hidroxiapatita carregadas com MTX, teriflunomida ou com MTX+teriflunomida	Em ratos com artrite induzida tratados com nanopartículas carregadas com MTX+teriflunomida, houve redução no diâmetro do tornozelo e do <i>score</i> de artrite. A microarquitetura do tornozelo foi restaurada e não se observou hepatotoxicidade.	(PANDEY <i>et al.</i> , 2018)
Lipossomas ultradeformáveis contendo MTX, incorporados a hidrogel de carbopol	A formulação, aplicada topicamente no joelho, aliviou significativamente a severidade da inflamação por reduzir o edema, as alterações histológicas e o acúmulo de neutrófilos em ratos com artrite induzida. Houve redução dos níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ . A permeação <i>in vitro</i> foi 2,5 vezes maior que a de hidrogel contendo MTX livre.	(ZEB <i>et al.</i> , 2017)
Nanopartículas de quitosana carregadas com MTX ou dexametasona	As nanopartículas demonstraram alta biocompatibilidade em ensaio de atividade hemolítica <i>ex vivo</i> . A administração intraperitoneal das nanopartículas em ratos promoveu melhor controle dos índices de artrite, diâmetro de tornozelo e edema de pata, em comparação aos fármacos livres.	(KUMAR <i>et al.</i> , 2017b)
Nanoemulsão lipídica de MTX e etanercept conjugada com albumina	Após administração endovenosa em ratas, a formulação completa foi significativamente mais efetiva que uma solução dos fármacos livres ou uma emulsão contendo os fármacos não acoplada a albumina para controle da artrite. Observou-se redução no <i>score</i> de artrite, nos níveis de citocinas inflamatórias e nas alterações histológicas (infiltrados de células inflamatórias, hiperplasia sinovial, erosão óssea e cartilaginosa e estreitamento do espaço sinovial).	(LI <i>et al.</i> , 2017)
Aspassomas de MTX incorporados em hidrogel de Carbopol 940	A aplicação transdérmica da formulação em ratos com artrite reduziu o diâmetro de pata, os níveis de AST, ALT, TNF $\alpha$ e IL $\beta$ , o dano à cartilagem, a inflamação, a formação de panus e a reabsorção óssea.	(GHOSH <i>et al.</i> , 2017)
MTX incorporado em carreador constituído por um núcleo hidrofóbico de PLGA e poli(ciclohexano-1,4-diilacetona dimetileno acetal), revestido por lecitina e funcionalizado com PLGA peguilado acoplado a folato	A funcionalização com folato aumentou a internalização e a citotoxicidade do carreador frente a macrófagos ativados (RAW 264,7). Os carreadores funcionalizados com folato foram mais efetivos que MTX livre e carreadores não funcionalizados para controle dos índices clínicos de artrite, alterações histológicas sinoviais e redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ e IL-6 em ratos, após tratamento endovenoso.	(ZHAO <i>et al.</i> , 2017)

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
Nanopartículas peguilladas de ácido hialurônico carregadas com MTX e mineralizadas com fosfato de cálcio	Constatou-se que a peguilação foi eficiente para evitar o direcionamento das partículas para o fígado e, portanto, propiciar entrega seletiva do fármaco no sítio de inflamação. Observou-se que o sistema foi internalizado por endocitose envolvendo várias hialaderinas, inclusive CD44, estabilina 2 e RHAMM.	(ALAM <i>et al.</i> , 2017)
Agregado de proteína ligante de folato contendo MTX	Em concentrações terapeuticamente relevantes, o agregado proteico contendo MTX é transportado de maneira similar à proteína nativa	(MERZEL <i>et al.</i> , 2017)
Submucosa de intestino delgado entrecruzada, carregada com MTX	Após administração intra-articular em ratos, constatou-se que a formulação persistiu na articulação dos animais por mais que 40 dias. Houve reparo efetivo da artrite, com ampla regeneração de condrócitos e restauração do conteúdo de glicosaminoglicanas, em relação ao grupo tratado com o veículo	(KIM <i>et al.</i> , 2016a)
Carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com MTX incorporados a hidrogel de carbopol, contendo promotor de absorção ( $\alpha$ -terpineol 2%)	A formulação promoveu redução de inflamação e apoptose em modelo de artrite experimental <i>in vitro</i> , via regulação por NF-kB e FOXO1. A aplicação transdérmica da formulação contendo o promotor de absorção foi superior para diminuição dos níveis de artrite, redução dos níveis plasmático e sinovial de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e metaloproteinase 1 e iNOS sinovial. Também houve melhora na histologia articular.	(GARG <i>et al.</i> , 2016a) (GARG <i>et al.</i> , 2016b)
Conjugado de MTX com ácido hialurônico	Em ratos, o tratamento intra-articular com a formulação aliviou a artrite tão potentemente quanto o tratamento com MTX oral, contudo, não induziu toxicidade hematológica, como ocorreu com o fármaco livre. A concentração máxima de MTX plasmático foi 40 vezes maior após administração oral de MTX do que após administração intra-articular da formulação.	(TAMURA <i>et al.</i> , 2016b)
Dendrímeros contendo MTX e/ou ácido fólico conjugados	Após o tratamento endovenoso de ratos artríticos, os grupos que receberam dendrímeros conjugados com MTX ou com MTX+ácido fólico apresentaram redução no volume de pata e diâmetro do tornozelo, com atividade equivalente à de MTX livre. Para o controle das alterações histológicas, o dendrímero contendo apenas MTX foi equivalente ao MTX livre e superior ao dendrímero contendo MTX+ácido fólico. Ambos os dendrímeros mostraram-se menos tóxicos para o baço do que o MTX livre.	(QI <i>et al.</i> , 2015)

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
Nanocápsulas lipídicas contendo MTX	Após administração intra-peritoneal em ratos com artrite induzida, a formulação resultou em redução mais precoce da artrite, em comparação a MTX livre, além de redução mais efetiva dos níveis de TNF- $\alpha$ e PCR. Após incubação com células mononucleares sinoviais, houve redução mais significativa da produção de citocinas pró-inflamatórias e citocinas derivadas de células T (IFN- $\gamma$ e IL-17).	(BOECHAT <i>et al.</i> , 2015)
Lipossomas contendo um fragmento hidrofóbico de proteína surfactante conjugado a um ligante e folato, carregados com MTX	Os lipossomas apresentaram direcionamento seletivo para receptores de folato presentes em macrófagos ativadas. Em camundongos artríticos, o tratamento intraperitoneal com a formulação reduziu a expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73, o que foi correlacionado a menores índices de artrite.	(NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2015)
Ácido hialurônico carregado com MTX (Met-HA); microcápsulas de PLGA carregadas com dexametasona (Dex-M); Dex-M dispersas em Met-HA (Met-HA/DEX-M)	Ratos tratados intra-articularmente com Met-HA/Dex-M apresentaram uma recuperação da artrite mais significativa e mais rápida do que os animais tratados com Met-HA e Dex-M separadamente (segundo avaliação de eritema e edema de pata e avaliação histológica da articulação).	(SON <i>et al.</i> , 2015)
Lipossomas catiônicos contendo MTX	Em camundongos com artrite a administração endovenosa da formulação reduziu significativamente a interação celular endotelial com plaquetas e leucócitos, a densidade capilar funcional e o diâmetro do joelho. A redução da densidade capilar funcional também foi significativa em relação ao fármaco livre e aos lipossomas vazios.	(GOTTSCHALK <i>et al.</i> , 2015)
Lignina impregnada com MTX (MTX-L), sílica-gel impregnada com MTX (MTX-SiO <sub>2</sub> ) e nanocompósito de sílica e ferro impregnado com MTX (MTX-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> )	Os três sistemas propostos, quando administrados por via intraperitoneal em ratos, foram eficazes para suprimir os sinais clínicos de inflamação severa na articulação metatársica, o que não foi observado para MTX livre. Além disso, reduziram a expressão de RNAm para INF- $\gamma$ e IL-17. MTX-SiO <sub>2</sub> foi o sistema que melhor recuperou as características histológicas do joelho, embora os outros dois sistemas também tenham sido benéficos neste aspecto. Animais tratados com MTX livre apresentaram alterações histológicas no baço, fígado e testículos. MTX-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> preservou a histologia do baço, MTX-L a hepática, e todos os três, a dos testículos.	(WAHBA <i>et al.</i> , 2015)

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continuação)		
Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
Nanopartículas lipídicas sólidas funcionalizadas com anticorpo anti-CD4, contendo MTX e SPIONs	Constatou-se baixa toxicidade frente a linhagem celular de monócitos humanos (THP-1).	(ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2015)
Nanopartículas peguilladas de PLGA carregadas com MTX parcialmente recobertas por camadas de ouro e ferro, conjugadas a ácido aspártico-glicina-arginina	Em camundongos com artrite induzida, a administração endovenosa das nanopartículas, combinada à exposição a radiação IV, resultou em eficácia terapêutica evidenciada por redução do score de artrite e melhora das alterações histológicas. A associação de um campo magnético potencializou ainda mais o tratamento e favoreceu o direcionamento e retenção da formulação nos sítios inflamados. Não foram detectados sinais de toxicidade.	(KIM <i>et al.</i> , 2015)
MTX esterificado a ácido hialurônico	Em ratos com artrite induzida, a administração endovenosa da formulação foi mais efetiva do que MTX livre na redução de índices artríticos, de edema de pata e de alterações histológicas (infiltrado de células inflamatórias, formação de pano e destruição da cartilagem articular). Também houve redução significativa de citocinas séricas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-2) e dos marcadores de progressão de artrite IgG1 e IgG2a. Por imageamento de fluorescência no IV próximo foi possível constatar acúmulo seletivo da formulação nos sítios inflamados.	(SHIN <i>et al.</i> , 2014)
Nanopartículas de trimetil-quitosana contendo MTX e dexametasona, funcionalizadas com ácido polissilícico	O efeito das nanopartículas carregadas sobre os níveis de IL-6 e IL-8 em cultura de células SW-982 estimuladas por IL-1 foi equivalente ao dos fármacos livres. No mesmo estudo <i>in vitro</i> , as nanopartículas vazias elevaram o nível de fator estimulante de colônia de granulócitos .	(ZHANG; WARDWELL; BADER, 2014)
MTX incorporado a microsferas compostas por albumina e PLGA	Verificou-se que o aumento da proporção de albumina no carreador reduziu o efeito <i>burst</i> observado na liberação <i>in vitro</i> e aumentou a viabilidade de células RAW 264,7.	(MISAK <i>et al.</i> , 2014)
Co-associação de MTX e SPIONs veiculados por nanopartículas de PLGA funcionalizadas com anticorpos anti-CD64	O sistema proposto mostrou-se mais tóxico para células RAW 264,7 do que MTX livre. O sistema não carregado com MTX apresentou-se seguro para a mesma linhagem celular até a concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .	(MOURA <i>et al.</i> , 2014)

Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

(continuação)		
Sistemas de Liberação	Principais resultados	Referências
Nanoemulsão lipídica contendo MTX esterificado a brometo de dodecila	A administração intra-articular da formulação em coelhos com artrite induzida reduziu significativamente a infiltração leucocitária sinovial e o extravasamento de proteínas plasmáticas para o líquido sinovial. Em animais tratados com MTX comercial ou com o veículo da formulação proposta não foram observados efeitos anti-inflamatórios.	(MELLO <i>et al.</i> , 2013)
Nanopartículas de PLGA contendo MTX, parcialmente recobertas com Au e funcionalizadas com o peptídeo RGD	Após administração endovenosa em ratos, as nanopartículas se acumularam seletivamente no sítio de inflamação. Mediante radiação com IV próximo, o tratamento com as nanopartículas proporcionou efeitos terapêuticos maiores sobre a artrite induzida, em comparação a solução de fármaco livre, embora a concentração de MTX nas nanopartículas fosse 1/930 do que o MTX em solução.	(LEE <i>et al.</i> , 2013)
MTX incorporado a diferentes matrizes mesoporosas: MgAl-LDH (hidróxido de dupla camada); SBA-15 e MCM-41 (sílicas mesoporosas) e MC (carbono mesoporoso)	As matrizes MgAl-LDH e SBA-15 se mostraram capazes de controlar melhor a liberação de MTX em tampão fosfato, em relação a solução de fármaco livre.	(ALEXA <i>et al.</i> , 2013)
Lipossomas peguilados e lipossomas convencionais revestidos com quitosana, ambos contendo MTX	O revestimento com quitosana aumentou a estabilidade física e a eficiência de encapsulação. Tanto os lipossomas peguilados quanto os revestidos com quitosana propiciaram liberação mais sustentada de MTX do que lipossomas não revestidos. Os lipossomas peguilados e os revestidos com quitosana foram igualmente eficientes e superiores a MTX livre para controle do edema de pata em ratos com artrite induzida, os quais foram tratados por via endovenosa.	(PRABHU <i>et al.</i> , 2012)
MTX conjugado ao peptídeo cIBR	A administração endovenosa do conjugado a ratos suprimiu a artrite nos joelhos e preveniu a inflamação periarticular e a reabsorção óssea, na maior dose testada (5,0 mg.kg <sup>-1</sup> ). Sua eficácia <i>in vivo</i> foi considerada baixa, o que foi atribuído à baixa estabilidade do conjugado no plasma.	(MAJUMDAR <i>et al.</i> , 2012)

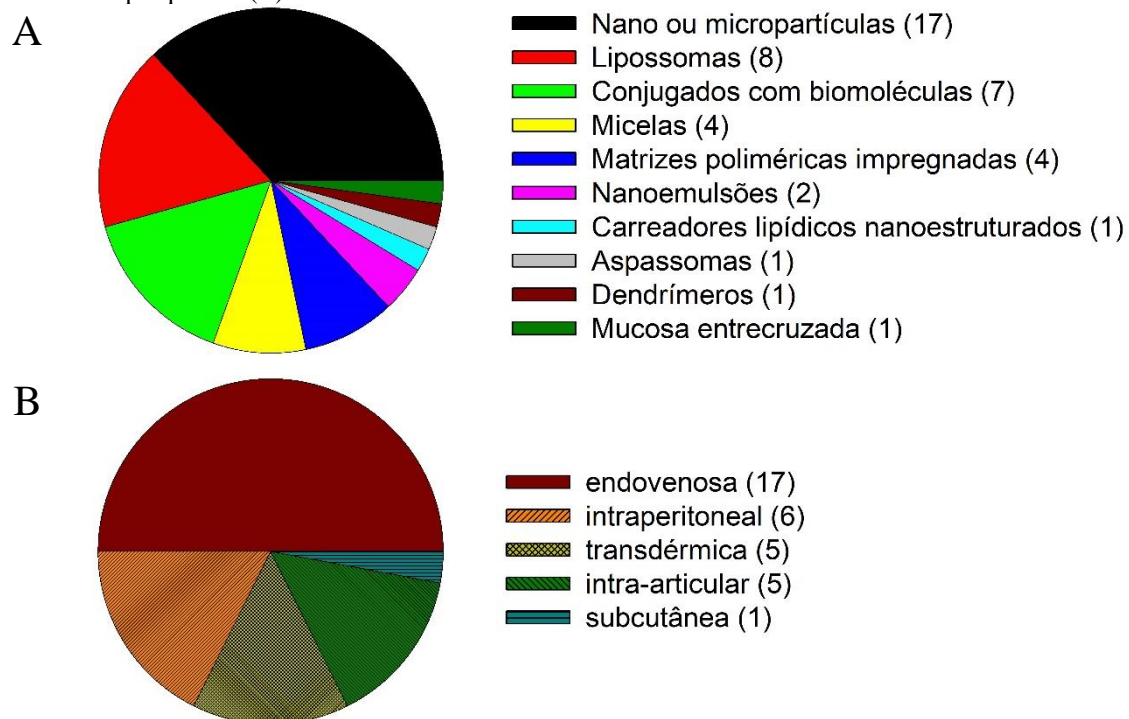
Quadro 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destinados ao tratamento de artrite reumatoide referenciados no MedLine até 24/06/20

Sistemas de liberação	Principais resultados	Referências
MTX conjugado ao domínio de transdução da proteína humana Hph-1	Em camundongos com artrite induzida, o tratamento com o conjugado, por via transcutânea reduziu significativamente o infiltrado celular inflamatório, a hiperplasia sinovial, a destruição óssea e os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS e COX-2. Não foi detectada toxicidade sistêmica, mediante monitoramento da contagem de leucócitos e plaquetas, quantificação de hemoglobina, AST, ALT, nitrogênio sanguíneo e creatinina.	(LEE <i>et al.</i> , 2012)
Microsfersas contendo MTX	Nem as microsferas carregadas com MTX e nem o fármaco livre, administrados intra-articularmente, foram capazes de controlar as alterações histológicas na articulação do joelho de coelhos com artrite induzida.	(LIANG <i>et al.</i> , 2009)
MTX acoplado a albumina endógena	O conjugado foi tão eficaz na supressão de artrite quanto MTX livre, apesar de possuir 20% do teor da solução de fármaco, quando administrados endovenosamente em ratos com artrite no estágio inicial. Quando os tratamentos foram aplicados num estágio tardio da patologia, apenas o conjugado apresentou atividade terapêutica.	(FIEHN <i>et al.</i> , 2008)
Filmes poliméricos de HPMC carregados com MTX	Os estudos de liberação <i>in vitro</i> indicaram que os patches desenvolvidos seriam adequados para liberação transdérmica. Essa indicação foi confirmada pela avaliação de parâmetros farmacocinéticos após aplicação dos patches no dorso de coelhos saudáveis.	(CHANDAK; VERMA, 2008)
Microsfersas de poli(ácido L-lático) carregadas com MTX	A injeção intra-articular da formulação em coelhos resultou em uma concentração plasmática de MTX dez vezes menor que a observada com o fármaco livre administrado pela mesma via.	(LIANG <i>et al.</i> , 2004)
MTX covalentemente acoplado a albumina	O conjugado, administrado por via intraperitoneal, foi significativamente mais efetivo que MTX livre para a supressão do início da artrite em ratos.	(WUNDER <i>et al.</i> , 2003)

Legenda: MTX= metotrexato; TNF= fator de necrose tumoral; IL= interleucina; PCL= poli(caprolactona); PEG= poli(etilenoglicol); PEI= poli(etilenoimina); AUC= área sob a curva;  $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida plasmática; PLGA= poli(ácidos lático e glicólico); ALT= alanina aminotransferase; AST= aspartato aminotransferase; siRNA= ácido ribonucleico silenciador; NF-kB= fator de necrose kappa beta; FOXO1= *Fork Head Box* 01; iNOS= sintetase indutível de óxido nítrico; PCR= proteína C reativa; IFN= interferon; IgG= imunoglobulina G; SPIONs= nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas; COX= ciclo-oxigenase. Fonte: DO AUTOR (2020)

Pela análise dos dados reportados no Quadro 2 verifica-se que as nano ou micropartículas tem sido os sistemas de liberação contendo MTX (ALAM *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2019; DUAN; LI, 2018; HA *et al.*, 2020; HAO *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2017b; LEE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2019; LIANG *et al.*, 2004, 2009; MERZEL *et al.*, 2017; MISAK *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2014; PANDEY *et al.*, 2018; ZHANG; WARDWELL; BADER, 2014; ZHAO *et al.*, 2017, 2018b) mais explorados como alternativa terapêutica para artrite reumatoide (FIGURA 2). Na maioria dos ensaios *in vivo* para pesquisa de atividade biológica empregou-se a via endovenosa para administração (CHEN *et al.*, 2019; DUAN; LI, 2018; FIEHN *et al.*, 2008; GOTTSCHALK *et al.*, 2015; HA *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2019; MAJUMDAR *et al.*, 2012; PRABHU *et al.*, 2012; QI *et al.*, 2015; SHIN *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2018a; ZHAO; ZHANG, 2018; ZHAO *et al.*, 2017).

Figura 2 - Classificação dos sistemas de liberação contendo metotrexato para tratamento de artrite reumatoide, referenciados no MedLine até 24/06/20, segundo o tipo de carreador (A) e a via de administração pesquisada (B)



Fonte: DO AUTOR (2020)

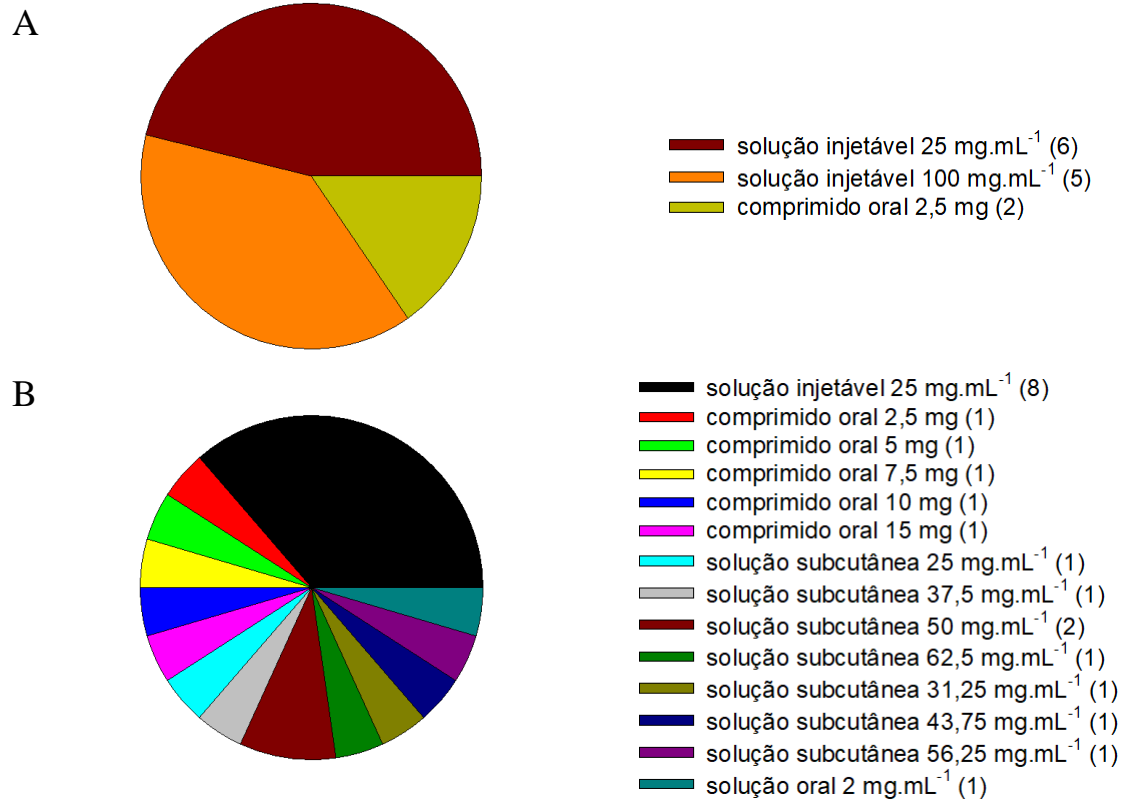
Houve a intenção de se promover direcionamento para sítios de inflamação em 26% dos sistemas reportados, sendo que para isso o recurso utilizado com maior frequência foi a funcionalização com folato (DUAN; LI, 2018; MERZEL *et al.*, 2017; NOGUEIRA *et al.*, 2015; VERMA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2017, 2018b). Outras estratégias voltadas para entrega

seletiva consistiram na associação a nanopartículas de ferro superparamagnéticas (SPIONs) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2014) ou no revestimento da partícula com ferro e ouro (KIM *et al.*, 2015), de forma que a formulação pudesse ser atraída para o local de interesse mediante aplicação de radiação externa, ou no acoplamento a anticorpo (MOURA *et al.*, 2014), peptídeos (LEE *et al.*, 2013; MAJUMDAR *et al.*, 2012) ou fragmento de domínio proteico (LEE *et al.*, 2012), os quais teriam afinidade por células envolvidas no processo inflamatório.

A associação de nanocarreadores particulados contendo MTX a hidrogel, como possível alternativa terapêutica para artrite reumatoide, também foi investigada por outros autores (GARG *et al.*, 2016b; GHOSH *et al.*, 2017; SADARANI *et al.*, 2019; ZEB *et al.*, 2017). Entretanto, em nenhum dos trabalhos encontrados foram utilizadas matrizes com propriedade de gelificação *in situ*.

Embora desde 2003 sistemas para liberação seletiva de MTX, destinados ao tratamento de artrite reumatoide, estejam sendo relatados (WUNDER *et al.*, 2003), até o momento apenas formulações tradicionais estão disponíveis no mercado (FIGURA 3), com predomínio das soluções injetáveis tanto no Brasil (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL), 2019), quanto nos Estados Unidos (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2019).

Figura 3 - Formas farmacêuticas de metotrexato aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (A) e pelo U.S. Food and Drug Administration (B), disponíveis no mercado atualmente



Fonte: DO AUTOR (2019)

### 2.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Os sistemas nanoestruturados permitem que o ativo neles incorporado seja absorvido através das barreiras biológicas, seja a barreira hemato-encefálica, as mucosas ou a pele, atingindo a corrente sanguínea, e podem ainda direcionar o transporte do fármaco pelo organismo. Tais sistemas podem oferecer inúmeras vantagens: aumento da estabilidade físico-química; melhora da solubilidade; maior carregamento de fármaco, seja por interações físicas ou adsorção; possibilidade de incorporação de moléculas bioativas altamente instáveis (como macromoléculas e peptídeos); promoção do transporte através das barreiras biológicas; atribuição de especificidade, liberando o fármaco no seu local de ação; prevenção da degradação do fármaco antes que seu alvo seja atingido; melhor controle em relação ao tempo de distribuição no organismo; maior biodisponibilidade; diminuição da toxicidade; redução da

dose; menor incidência de efeitos adversos (ARACHCHIGE; RESHETNYAK; ANDREEV, 2015; BREGOLI *et al.*, 2016; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016).

### DIRECIONAMENTO PASSIVO

O direcionamento de fármacos proporcionado pela nanotecnologia pode ocorrer de forma passiva ou ativa. A condução passiva decorre primeiramente do tamanho reduzido, o que permite atravessar os vasos sanguíneos. Além disso, no caso de cânceres, também é propiciada pelo efeito de permeação e retenção aumentada, observado principalmente em tumores, onde ocorre um aumento do extravasamento dos vasos sanguíneos somado à função linfática comprometida, resultando num acúmulo do fármaco no sítio patológico.

Independente da presença de ligantes que direcionem seletivamente para um determinado sítio, os nanocarreadores por si só já apresentam potencial para serem reconhecidos e internalizados, principalmente pelas células do sistema imunológico, a exemplo dos macrófagos. Uma vez presentes nos fluidos extracelulares, ocorre uma adesão de proteínas e outras macromoléculas à superfície da nanoestrutura, fenômeno conhecido como opsonização (GUSTAFSON *et al.*, 2015). A partir do momento em que tais proteínas integram a coroa proteica, seu reconhecimento pelo sistema fagocítico assim como sua participação em eventos intracelulares pode ser diferente em relação à sua forma livre (BERTOLI *et al.*, 2016). Isso ocorre porque dependendo da curvatura da superfície do nanomaterial e de suas características topológicas, há uma alteração conformacional da proteína. Devido à mudança de conformação proteica, epítomos inicialmente protegidos pelo enovelamento podem ficar expostos e ativar a resposta dos macrófagos estimulando a internalização celular (GUSTAFSON *et al.*, 2015).

### DIRECIONAMENTO ATIVO

A superfície dos nanocarreadores é passível de funcionalização com ligantes que possam ser reconhecidos por receptores super expressos nas células alvo, o que caracteriza o direcionamento ativo (BREGOLI *et al.*, 2016). Na artrite reumatoide, por exemplo, os monócitos/macrófagos são considerados excelentes alvos terapêuticos uma vez que encontram-se massivamente infiltrados nas articulações inflamadas e produzem TNF- $\alpha$ , o principal mediador da inflamação na mencionada doença (DAVIGNON *et al.*, 2013). Sabe-se que ocorre uma elevada expressão de receptores para manose e fucose em macrófagos, mediante a presença de determinados estímulos (STAHL; GORDON, 1982). Entre esses estímulos estão as infecções, situações nas quais as células de defesa apresentam um maior número do mencionado receptor com o intuito de favorecer a captura do micro-organismo, o qual possui sacarídeos em

sua parede celular. A funcionalização de nanocarreadores com moléculas de manose comprovadamente aumenta sua internalização por macrófagos infectados via transporte ativo (ASTHANA *et al.*, 2015). Embora artrite reumatoide não seja um processo infeccioso, já foi constatada a expressão de receptores de manose por macrófagos *in vitro* e *in vivo*, no fluido sinovial de patas inflamadas de animais com artrite induzida, enquanto que sua expressão foi relativamente baixa em outros tecidos (PUT *et al.*, 2013).

A internalização celular ativa pode ocorrer por quatro mecanismos distintos: fagocitose, pinocitose, endocitose mediada por clatrina e endocitose mediada por caveolina, sendo que a predominância de determinado(s) mecanismo(s) se dará em virtude do tipo celular (KUHN *et al.*, 2014) e das características do nanocarreador. Por exemplo, o potencial de membrana, decorrente do gradiente iônico, pode interferir na internalização. Observou-se que uma diminuição no potencial de membrana reduz a captação de nanopartículas (NPs) aniônicas, enquanto sua elevação provoca o efeito inverso. As NPs catiônicas, por sua vez, como interagem com as proteínas da superfície celular, não tem sua internalização afetada significativamente pelo potencial de membrana (SHIN *et al.*, 2013). Quanto aos aspectos relacionados ao carreador, o tamanho da nanoestrutura é um dos principais fatores que interferem no processo de internalização (BARAR, 2015), sendo que há um tamanho ótimo para que ocorra endocitose eficaz, o qual pode variar de acordo com o tipo celular e com as características de superfície do nanomaterial. NPs de tamanho muito reduzido apresentam uma probabilidade mais alta de serem internalizadas de forma passiva (SHANG; NIENHAUS; NIENHAUS, 2014) e só são submetidas a endocitose quando se acumulam na membrana plasmática (SHANG *et al.*, 2014). O estado de aglomeração é outro fator que interfere no mecanismo de endocitose (HALAMODA-KENZAOU *et al.*, 2017). A rigidez da NP também influencia o processo de internalização. É mais fácil ocorrer endocitose de NPs rígidas do que macias, pois nas últimas pode haver deformações superficiais induzidas por revestimento ou distribuição não uniforme de ligantes (LI; ZHANG; CAO, 2015).

Há uma diversidade de nanomateriais aplicáveis ao desenvolvimento de medicamentos, sendo os mais explorados os lipossomas, os conjugados polímero-fármaco, as micelas, as nanoemulsões e microemulsões, os nanocristais e as NPs, as quais podem ser metálicas, poliméricas ou lipídicas sólidas. (BREGOLI *et al.*, 2016). As NPs poliméricas serão um dos focos de estudo do presente trabalho.

### 2.3.1 NPs poliméricas

As NPs poliméricas são compostas por polímeros biocompatíveis, que podem ser naturais, representados por proteínas ou polissacarídeos, ou sintéticos, como poliésteres alifáticos, derivados do ácido acrílico e metacrílico, derivados do cianoacrilato de alquila, policaprolactona (PCL), poli(ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA) e PLAcOPLGA. Sua estrutura pode ser tanto do tipo nanocápsula, em que há um invólucro polimérico ao redor do núcleo, ou do tipo nanosfera, formada por uma matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Há várias técnicas de preparo de NPs poliméricas (RAO; GECKELER, 2011). Algumas iniciam com a obtenção de uma emulsão, seja ela simples O/A (óleo em água), normalmente para veiculação de um fármaco lipofílico, ou múltipla A/O/A, quando se pretende carrear um ativo hidrofílico. Também pode-se obter uma microemulsão, a qual se forma espontaneamente e possui estabilidade termodinâmica, ao contrário das demais. O polímero pode encontrar-se na fase interna ou na externa, ou ainda podem ser utilizados monômeros que se polimerizem *in situ*, na interface das gotículas dispersas. Em seguida, o sistema emulsionado é submetido a moinhos coloidais ou homogeneização a alta pressão com o objetivo de reduzir a fase dispersa a escala nanométrica. A última etapa é a eliminação do solvente, o que pode ser feito através de evaporação sob pressão reduzida ou deslocamento do solvente por meio da sua difusão provocada por uma diluição do sistema ou da adição de sais hidrofílicos (*salting out*). Embora obtenham-se NPs com dimensões adequadas e uniformes, a alta energia gasta no processo e a necessidade de equipamentos de alto custo representam as desvantagens das técnicas que envolvem emulsificação (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Um método mais simples e fácil é a nanoprecipitação, pela qual um polímero disperso é precipitado na forma nanoparticulada quando exposto a um solvente no qual seja insolúvel. Consiste num preparo que não requer energia e nem equipamentos especiais. O uso de tensoativos também não é necessário. Porém, empregando-se tal técnica não é possível prever o tamanho e o formato das partículas, além disso a posterior remoção de alguns solventes pode ser difícil (PEPTU *et al.*, 2014).

Quando o polímero apresenta grupos ionizáveis, ou seja, é um eletrólito, é possível aproveitar tal característica para se obter NPs de forma simples e limpa, em meio aquoso, por meio de gelificação ionotrópica ou de complexação polieletrólítica. Quando o pH do meio

favorece a ionização de grupamentos do polímero sua cadeia permanece estirada e, portanto, dispersa devido à repulsão eletrostática. Quando a dispersão polimérica é colocada em contato com uma solução contendo íons de carga oposta, a interação iônica promove a neutralização de cargas que resulta na contração da cadeia polimérica a qual se enovela na forma de NP. Tal técnica denomina-se gelificação ionotrópica (PATIL, 2010). Como íons negativos normalmente se utilizam sulfato de sódio e tripolifosfato (TPP) de sódio (AHMED; ALJAEID, 2016), como positivos, cálcio, na forma de cloreto ou carbonato.

Caso as cargas poliméricas sejam neutralizadas não por íons, mas pela interação com outro polímero de carga oposta, o método é conhecido por complexação polieletrólítica, pelo qual são obtidas NPs com carga superficial negativa ou positiva, dependendo de qual polímero for utilizado em excesso. A carga superficial das NPs influencia sua estabilidade, na medida em que previne a agregação e também interfere na interação entre a NP e as células. Pela complexação polieletrólítica é possível combinar características favoráveis de pelo menos dois polímeros polieletrólitos. Além disso, o processo ocorre sob condições brandas, possibilitando a incorporação de fármacos e macromoléculas termolábeis e evita a toxicidade conferida por solventes orgânicos. Outra vantagem é a possibilidade de se ajustarem parâmetros físico-químicos como o tamanho de partícula e a carga superficial (BOURGANIS *et al.*, 2017).

Quanto ao aspecto cinético, pode-se considerar que a complexação polieletrólítica possui dois estágios. Inicialmente, há uma difusão rápida entre os emaranhados poliméricos, levando à formação de partículas primárias, o que depende sobretudo da diferença de peso molecular e da velocidade de colisão entre as cadeias polieletrólíticas. A etapa seguinte é mais lenta, caracterizada por rearranjos termodinâmicos pelos quais as cadeias poliméricas se redistribuem para alcançarem uma conformação mais próxima do equilíbrio. A formação e o estado termodinâmico dos complexos são determinados por fatores como a força e localização dos domínios iônicos, o peso molecular e a rigidez dos polieletrólitos, a carga e a curvatura dos polímeros, o pH, a força iônica do meio e a temperatura (BOURGANIS *et al.*, 2017). Entre os polímeros capazes de serem submetidos a gelificação ionotrópica ou estabelecerem PECs estão os de natureza polissacarídica.

### 2.3.1.1 NPs polissacarídicas

As NPs produzidas a partir de polissacarídeos são bastante exploradas como carreadores de fármacos devido principalmente à baixa toxicidade e biodegradabilidade. Outras vantagens associadas são a alta disponibilidade, fácil obtenção e, conseqüentemente, o baixo custo. Além disso, os polímeros polissacarídicos apresentam abundância de grupos funcionais como hidroxila, amino e carboxila, pelos quais é possível realizar modificação química visando melhorar suas propriedades físico-químicas ou acoplar resíduos que promovam o direcionamento para células alvo (WEN; OH, 2014). O Quadro 3 apresenta exemplos de polissacarídeos utilizados na produção de NPs.

Quadro 3 - Polímeros polissacarídicos utilizados para obtenção de nanopartículas

Polímero	Unidades monoméricas	Distribuição	Referências
quitosana	N-acetil-D-glicosamina D-glicosamina	derivada da quitina presente no exoesqueleto de artrópodes	AHMED; ALJAEID, 2016 LI; XIONG; ZHANG, 2017
alginato	ácido $\beta$ -D-manurônico ácido $\alpha$ -L-glicurônico	componente da parede celular de Phaeophyta	LOPES <i>et al.</i> , 2016 GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; DA SILVA, 2008
carragenina	D-galactose 3- $\beta$ -D-galactopiranosose 4- $\alpha$ -D-galactopiranosose	componente da parede celular de diferentes espécies de Rodophyta	LI <i>et al.</i> , 2014 RODRIGUES; COSTA; GRENHA, 2012
ácido hialurônico	N-acetil-D-glicosamina ácido D-glicurônico	componente da matriz extracelular dos tecidos de vertebrados	VAFAEI <i>et al.</i> , 2016 CHOI <i>et al.</i> , 2012
pullulan	maltotriose	produto da fermentação do amido por <i>Aureobasidium pullulans</i>	DIONÍSIO <i>et al.</i> , 2013 GRENHA; RODRIGUES, 2013
dextrana	D-glicopiranosose	exopolissacarídeo bacteriano	BANERJEE; BANDOPADHYAY, 2016 WASIAK <i>et al.</i> , 2016

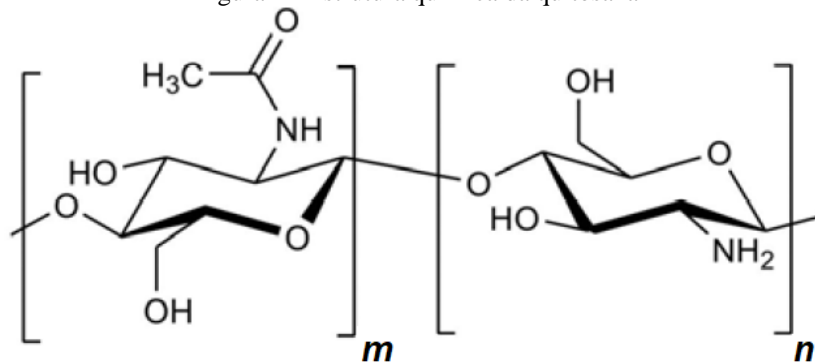
Fonte: DO AUTOR (2017)

## QUITOSANA

Um dos polissacarídeos mais explorados para a obtenção de nanopartículas é a quitosana. A quitosana (FIGURA 4) é um polímero proveniente da desacetilação da quitina,

principal componente do exoesqueleto de crustáceos e presente também em paredes celulares fúngicas. É o segundo amino polissacarídeo natural mais abundante, após a celulose (ALI; AHMED, 2018; AZUMA *et al.*, 2015; SHARIATINIA, 2019). A quitosana é constituída por mais que 80% de  $\beta$ -(1,4)-2-amino-D-glicopiranosose e menos que 20% de  $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-D-glicopiranosose (LIANG; SUN; DAI, 2018; ZOU *et al.*, 2016), embora alguns autores considerem que um grau de desacetilação (GD) superior a 60% é suficiente para designar o polímero como quitosana (KUMIRSKA *et al.*, 2010). Suas propriedades físico-químicas podem ser afetadas por: GD, processo de obtenção, peso molecular (AHMED *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2016), cristalinidade (AHMED *et al.*, 2018), distribuição de carga (ZOU *et al.*, 2016) e grau de substituição (ZHANG *et al.*, 2019).

Figura 4 - Estrutura química da quitosana



Fonte: adaptado de KUMIRSKA *et al.*, 2010

A quitosana só se solubiliza em solução ácida diluída, e não em pH neutro, tal característica constitui o principal desafio a sua aplicação (ADHIKARI; YADAV, 2018; MOHAMMED *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018a). A quitosana possui grupos amina primária cujo valor de pKa é 6,3. Em meio ácido, as amins livres encontram-se protonadas, o que leva a uma repulsão entre as cadeias poliméricas e favorece a solvatação do polímero, com o estabelecimento de ligações de hidrogênio com o meio aquoso e possibilitando a dispersão da quitosana. Em pH acima de 6, ocorre a desprotonação dos grupos amina o que ocasiona a perda de solubilidade. Além do pH, a solubilidade da quitosana também depende do GD, da massa molar e da força iônica do meio (CASADIDIO *et al.*, 2019; HEMBRAM *et al.*, 2016; KUMIRSKA *et al.*, 2010).

Os numerosos grupamentos amina na estrutura da quitosana, representam sítios aptos a serem modificados quimicamente com intuito de melhorar a solubilidade ou introduzir funcionalidades, como por exemplo, fragmentos que favoreçam o direcionamento do fármaco

carreado para um determinado tipo de célula (KUMIRSKA *et al.*, 2010; MOHAMMED *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). A quaternização, a introdução de grupos tióis ou carboxilas, a funcionalização com agentes quelantes, polietilenoglicol (PEG), ou açúcares são alguns exemplos de modificações químicas que podem conferir propriedades especiais à quitosana (MOHAMMED *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2018a).

Os grupos amina primária da quitosana lhe conferem natureza catiônica e propriedades de mucoadesão, gelificação *in situ*, efeito antimicrobiano e incrementador de absorção. Tais características aliadas a seu perfil de atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade tornaram a quitosana de grande interesse principalmente na área farmacêutica, na qual vem sendo explorada como carreador de fármacos (ADHIKARI; YADAV, 2018; ALI; AHMED, 2018; MOHAMMED *et al.*, 2017; ND; GIMBUN; AKMM, 2019; SHARIATINIA, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018a) e na área biomédica, para a produção de matérias implantáveis, utilizados como suportes versáteis na engenharia de tecidos (AHMED *et al.*, 2018; SHARIATINIA, 2019; ZHAO *et al.*, 2018a).

Diversos tipos de sistemas de liberação podem ser desenvolvidos com quitosana, como microesferas, comprimidos, nanopartículas, nanofibras, grânulos, hidrogéis e conjugados. Também é utilizada na forma de nanocompósitos, associada, por exemplo, a nanopartículas magnéticas ou nanotubos de carbono (ALI; AHMED, 2018). Sua grande aplicabilidade como carreador de fármacos, além da biocompatibilidade, provém de sua natureza catiônica, que a faz interagir com as superfícies celulares e mucosas, por interação eletrostática, melhorando a internalização do fármaco pelas células e também permite sua complexação com macromoléculas aniônicas, tornando-a interessante para terapia gênica, por exemplo. A massa molar, o GD e o tipo de substituição da quitosana e seus derivados impactam notavelmente a eficácia das nanopartículas (ZHANG *et al.*, 2019).

A oligoquitosana, também conhecida por quitosana oligomérica ou quito-oligômero, é definida como uma quitosana com um grau de polimerização  $\leq 20$  e um peso molecular inferior a 3900 Da (geralmente 0,3-3,0 kDa) (LIANG; SUN; DAI, 2018; PHIL *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2019). O grau de despolimerização, que determina o peso molecular, influencia as propriedades físico-químicas da oligoquitosana e está correlacionado a suas atividades biológicas (ZOU *et al.*, 2016). A grande vantagem do oligômero em relação à quitosana polimérica é a melhor solubilidade em água (LIANG; SUN; DAI, 2018; YUAN *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2016). O GD é o parâmetro mais importante para conferir solubilidade. Como a oligoquitosana possui maior teor de grupos amina livres, apresenta mais cargas positivas em

solução, tornando-se mais hidrossolúvel. O aumento do teor de resíduos acetilados aumenta também a interação com as células, consequentemente influencia a adesão e a proliferação celular (ZOU *et al.*, 2016).

A forma oligomérica pode ser obtida a partir da quitosana por quatro processos diferentes: degradação química, degradação física, degradação enzimática ou degradação eletroquímica. A degradação química pode ser ácida ou oxidativa e é relativamente fácil de ser conduzida, entretanto seu produto é de difícil purificação. O produto da degradação física, normalmente realizada com o uso de ultrassom ou micro-ondas, é pouco contaminado, porém o processo apresenta baixa produtividade. A degradação enzimática e a eletroquímica originam composto isentos de contaminação, porém são operações associadas a alto custo (LIANG; SUN; DAI, 2018; YUAN *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2016).

A oligoquitosana vem sendo aplicada em diversas áreas, como alimentos, agricultura, farmácia, meio-ambiente (LIANG; SUN; DAI, 2018; LIAQAT; ELTEM, 2018; YUAN *et al.*, 2019) e cosméticos (CASADIDIO *et al.*, 2019). No ramo agrícola, demonstrou-se a utilidade da quitosana oligomérica para induzir a resistência a fitopatógenos, promover o crescimento e desenvolvimento vegetal e melhorar a qualidade e produtividade (YUAN *et al.*, 2019).

Além de ser biodegradável, biocompatível e atóxica como a quitosana, a oligoquitosana apresenta melhor solubilidade. Também possui propriedade anti-inflamatória, antitumoral, imunomoduladora e efeitos neuroprotetores (ANRAKU *et al.*, 2018; AZUMA *et al.*, 2015; LIANG; SUN; DAI, 2018; YUAN *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2016). Ao contrário das demais propriedades biológicas, as quais são intensificadas com a redução da massa molar e o aumento da desacetilação e, consequentemente tornam-se mais pronunciadas na oligoquitosana do que na quitosana, a capacidade de mucoadesão é maior na forma polimérica (CASADIDIO *et al.*, 2019).

A oligoquitosana apresenta atividade antioxidante (ANRAKU *et al.*, 2018; CASADIDIO *et al.*, 2019; LIANG; SUN; DAI, 2018; LIAQAT; ELTEM, 2018; ZOU *et al.*, 2016), devido a seu alto poder redutor e capacidade de capturar radicais hidroxila e ânions superóxido. Como nas cadeias mais curtas, os grupos hidroxila e amino estão mais expostos, são facilmente ativados e mais disponíveis para interagir com os radicais livres (CASADIDIO *et al.*, 2019; LIANG; SUN; DAI, 2018). Acredita-se que os radicais livres instáveis interajam com os grupos amina e hidroxila nas posições C-2, C-3 e C-6 do anel piranose para formarem radicais macromoleculares estáveis (ZOU *et al.*, 2016). A capacidade de reverter condições de

desequilíbrio redox, de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, e de diminuir a expressão de enzimas como a sintetase indutível de óxido nítrico (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) confere à quitosana oligomérica efeito anti-inflamatório (AZUMA *et al.*, 2015; PHIL *et al.*, 2018).

Outra propriedade biológica é o efeito antitumoral, o qual parece ser favorecido pela presença de carga iônica e pelo tamanho da cadeia de oligômeros (LIANG; SUN; DAI, 2018; LIAQAT; ELTEM, 2018; PHIL *et al.*, 2018; ZOU *et al.*, 2016). Devido a sua natureza catiônica, a oligoquitosana interage com glicoproteínas negativas presentes nas membranas celulares. Na superfície de células tumorais há uma maior densidade de cargas negativas em comparação às células normais, portanto a condição oncológica favorece a interação com o oligômero catiônico. A alteração de cargas na membrana celular altera suas funções e prejudica processos de sinalização importantes para a proliferação celular. A angiogênese também é reduzida devido à inibição da expressão de metaloproteinase-9 pela oligoquitosana. Além disso, a atividade antitumoral está relacionada a imunomodulação (ZOU *et al.*, 2016). A quitosana oligomérica apresenta efeito imunomodulador, manifestado pela promoção da proliferação de células da medula e aumento da atividade fagocitária de macrófagos. A ação imunomoduladora parece estar relacionada ao GD (AZUMA *et al.*, 2015; LIANG; SUN; DAI, 2018; LIAQAT; ELTEM, 2018; PHIL *et al.*, 2018).

A atividade antimicrobiana da quitosana oligomérica também é notável, sendo ativa contra uma variedade de patógenos, de natureza bacteriana e viral. A inibição do crescimento de micro-organismos deve-se à presença das cargas positivas, as quais favorecem a ligação da oligoquitosana à parede celular microbiana, alterando sua permeabilidade (CASADIDIO *et al.*, 2019; MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017; PHIL *et al.*, 2018; SAHARIAH; MÁSSON, 2017; ZOU *et al.*, 2016). A menor massa molar e o maior GD fazem com que o efeito antimicrobiano do oligômero seja maior em comparação ao polímero porque permitem que a oligoquitosana permeie e estabeleça interações eletrostáticas mais intensas com a membrana bacteriana (CASADIDIO *et al.*, 2019; LIAQAT; ELTEM, 2018). Outros benefícios farmacológicos atribuídos à oligoquitosana incluem: efeito neuroprotetor, possivelmente útil no combate à Doença de Alzheimer, anti-obesidade e hipocolesterolêmico (LIANG; SUN; DAI, 2018; PHIL *et al.*, 2018).

Entre os desafios do uso de quitosana, polimérica ou oligomérica, nos sistemas de liberação de fármacos estão a falta de estudos clínicos de segurança a longo prazo e a falta de

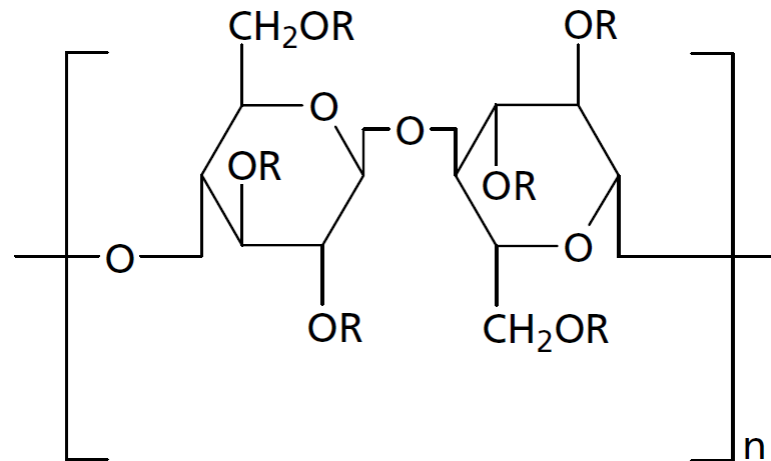
padronização do peso molecular e do GD, que repercute em variação no desempenho como excipiente farmacêutico (LIANG; SUN; DAI, 2018).

### HIDROXIPROPILMETILCELULOSE

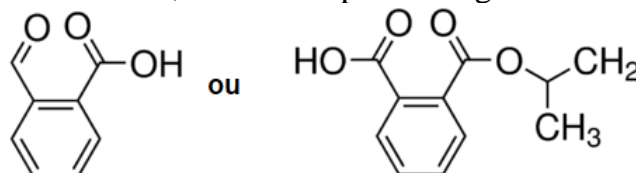
A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), também conhecida por hipromelose, é o derivado celulósico mais frequentemente usado para fabricação de matrizes hidrofílicas para uso oral. É um polímero de natureza não iônica, hidrofílica e hidrossolúvel. Apresenta estabilidade na faixa de pH de 3 a 11, é resistente a enzimas e possui capacidade de gelificação. Possibilita o controle na liberação de fármacos, aumentando efetivamente a duração da liberação para prolongar seu efeito terapêutico (LI *et al.*, 2005).

A HPMC é obtida a partir do tratamento da polpa de celulose com NaOH, seguido por reação com cloreto de metila e óxido de propileno, o que possibilita a substituição com o grupo hidroxipropil nas unidades anidras de glicose (FIGURA 5).

Figura 5 - Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose



Se for ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, além das possibilidades acima, R também pode ser igual a:



Fonte: adaptado de LI *et al.*, 2005

As características da HPMC, como a viscosidade de sua dispersão, dependem da proporção entre os grupos substituintes hidroxipropila e metila (LI *et al.*, 2005). A esterificação

de HPMC com anidrido ftálico origina o ftalato de HPMC (HPMCp), o qual possui grupos carboxila (SHUKLA; TIWARI, 2012). O grau de substituição ftálica determina o pH no qual o polímero se dispersa. HPMCp é insolúvel em meio ácido, por isso previne que fármacos sejam absorvidos no estômago. O peso molecular também é um parâmetro importante a ser considerado no desenvolvimento de formas farmacêuticas. Geralmente quanto maior o peso molecular de um polímero, maior é a resistência do revestimento com ele obtido (MEEHAN, 2006).

HPMC tem sido associada a quitosana para composição de diversos sistemas de liberação: hidrogéis (AKILO *et al.*, 2019; FREAG; SALEH; ABDALLAH, 2018; MURA *et al.*, 2018; PANDEY *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017); micelas (JALEH *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2015); microsferas (ARTHANARI *et al.*, 2014; FILIPOVIC-GRCIC *et al.*, 2003); nanossuspensão (AMBHORE; DANDAGI; GADAD, 2016), coevaporado (FERRARI *et al.*, 2009), cápsula (VERMA *et al.*, 2017); comprimido oral (BHISE *et al.*, 2007; NUNTHANID *et al.*, 2008; RUIZ-CARO *et al.*, 2012) e comprimido vaginal (NOTARIO-PÉREZ *et al.*, 2018). Tais sistemas encontram-se descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Exemplos de sistemas de liberação desenvolvidos com quitosana e HPMC ou derivados

(continua)

Sistemas propostos	Referência
Filme composto por quitosana entrecruzada com HPMC, contendo óleo de Neem	(HERNÁNDEZ-VAENCIA <i>et al.</i> , 2019)
Gel mucoadesivo eletroresponsivo e termossensível constituído por quitosana, HPMC, poloxâmero 407 e polianilina contendo nanocomplexos carregados com carmustina	(AKILO <i>et al.</i> , 2019)
Micelas poliméricas de quitosana e HPMC contendo sinvastatina	(JALEH <i>et al.</i> , 2018)
Esponja bucal composta por quitosana e HPMC	(FREAG; SALEH; ABDALLAH, 2018)
PECs de quitosana, ácido hialurônico e HPMCP, carregados com metotrexato	(BONI <i>et al.</i> , 2018a)
Hidrogel termorresponsivo constituído por cloridrato de quitosana, $\beta$ -glicerofosfato e HPMC contendo lipossomas peguillados carregados com opiorfina	(MURA <i>et al.</i> , 2018)
Comprimidos vaginais mucoadesivos à base de quitosana e HPMC, contendo tenofovir	(NOTARIO-PÉREZ <i>et al.</i> , 2018)
Nanoplexos ternários de curcumina, quitosana e HPMC	(LIM <i>et al.</i> , 2018)

Quadro 4 - Exemplos de sistemas de liberação desenvolvidos com quitosana e HPMC ou derivados  
(conclusão)

Sistemas propostos	Referência
Cápsulas de quitosana e hipromelose contendo cloridrato de moxifloxacina	(VERMA <i>et al.</i> , 2017)
Hidrogéis de poloxâmero 407, quitosana e HPMC destinados a entrega nasal de fosfato de dexametasona	(PANDEY <i>et al.</i> , 2017)
Nanossuspensão oftálmica de oligoquitosana e HPMC contendo esparfloxacina	(AMBHORE; DANDAGI; GADAD, 2016)
Hidrogel termorresponsivo composto por quitosana, HPMC e glicerol	(WANG <i>et al.</i> , 2016)
PECs de quitosana e HPMCP carregados com zidovudina	(PEDREIRO; CURY; GREMIÃO, 2016)
Hidrogel de quitosana entrecruzada com succinato de HPMC, contendo sulfato de gentamicina	(JIANG <i>et al.</i> , 2016)
Hidrogéis de quitosana contendo HPMC e azul de toluidina	(PENG <i>et al.</i> , 2016)
Filme adesivo constituído por mistura de quitosana e HPMC para liberação transdérmica de extrato de <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.	(SUKSAEREE <i>et al.</i> , 2015)
PECs de carboximetilcelulose com conjugado de quitosana e HPMCP, carregados com fuorato de mometasona, azul de metileno, cloridrato de tetraciclina ou metronidazol	(LAI; SHUM, 2015)
Nanopartículas de PMMA encapsuladas em microsferas de quitosana e HPCM, revestidas ou não com Eudragit S100	(MA <i>et al.</i> , 2015)
Filme adesivo de quitosana e HPMC destinado a liberação transdérmica de glimepirida	(AHMED <i>et al.</i> , 2014)
Microsferas de quitosana e hipromelose carregadas com toxina tetânica	(ARTHANARI <i>et al.</i> , 2014)
Comprimidos de quitosana e HPMC contendo aciclovir	(RUIZ-CARO <i>et al.</i> , 2012)
PECs de quitosana e HPMCP carregados com insulina	(MAKHLOF; TOZUKA; TAKEUCHI, 2011)
Coevaporados de quitosana, HPMCP, metronidazol, com/sem acetato ftalato de celulose	(FERRARI <i>et al.</i> , 2009)
Comprimidos de ácido 5 amino-salicílico revestidos com uma combinação de quitosana e HPMC	(NUNTHANID <i>et al.</i> , 2008)
Comprimidos de quitosana e HPMC contendo naproxeno sódico	(BHISE <i>et al.</i> , 2007)
Microsferas de quitosana e HPMC contendo carbamazepina	(FILIPOVIC-GRCIC <i>et al.</i> , 2003)

Legenda: HPMC= hidroxipropilmetilcelulose; HPMCP= ftalato de hidroxipropilmetilcelulose; PEC= complexo polieletrólítico; CMC= carboximetilcelulose; PMMA= polimetacrilato  
Fonte= DO AUTOR (2019)

A presença de carboxilas na estrutura de HPMCP permite a complexação polieletrólítica com a quitosana, dando origem a carreadores particulados que podem ser obtidos facilmente, em meio aquoso, os PECs (BONI *et al.*, 2018b; LAI; SHUM, 2015; LIM *et al.*, 2018; MAKHLOF; TOZUKA; TAKEUCHI, 2011; PEDREIRO; CURY; GREMIÃO, 2016), uma das estratégias que foi explorada neste trabalho.

## 2.4 SISTEMAS DE GELIFICAÇÃO *IN SITU*

Hidrogéis são sistemas constituídos por uma rede polimérica tridimensional, entrecruzada, a qual é capaz de absorver grande quantidade de água. Desde que a estrutura tridimensional da matriz polimérica seja conservada, o intumescimento de equilíbrio do gel aumenta à medida em que aumenta a distância entre os pontos de entrecruzamento. Quando esse entrecruzamento é mantido por forças fracas como ligações de hidrogênio ou interações iônicas, a gelificação normalmente é reversível. As soluções poliméricas, fluídas, são chamadas fase sol. A fase gel é caracterizada pelo inchaço do polímero, o que leva a uma apresentação sólida ou semissólida. Os hidrogéis reversíveis apresentam uma transição mais baixa, quando sol é convertido em gel, e uma transição mais alta, quando a matriz polimérica retrai ou colapsa e expulsa quase todo o conteúdo líquido por ela absorvido. A transição sol-gel reversível pode ser induzida por fatores ambientais como temperatura, pH, força iônica, separação de fase, comprimento de onda de radiação incidente, etc. Quando uma pequena alteração em tais condições é capaz de provocar uma nítida transição sol-gel e tal modificação pode ser induzida *in situ*, após aplicação em um organismo vivo, são chamados hidrogéis inteligentes, ou pela expressão mais conhecida em inglês “*smart hydrogels*” (JAGUR-GRODZINSKI, 2010).

Os *smart* hidrogéis, os quais possuem extremo potencial de aplicação para liberação controlada de fármacos ou para reconstituição de tecidos, podem ser injetáveis desde que atendam a alguns pré-requisitos: seus polímeros constituintes e seus respectivos produtos de degradação devem ser biocompatíveis; sua viscosidade deve ser suficientemente baixa antes da gelificação, permitindo a dispersão homogênea dos fármacos ou células e a fácil injeção; sua gelificação deve ocorrer em velocidade adequada, para que não ocorra extravasamento, e sob condições brandas, para evitar reações adversas, como por exemplo, um aquecimento elevado decorrente de uma reação química.; o gel formado *in vivo* deve apresentar estabilidade e tenacidade suficientes para sustentar os fármacos ou células neles incorporados, evitando

liberações iniciais exageradas (LI; RODRIGUES; TOMÁS, 2012). Formulações poliméricas que se gelificam *in situ* após serem injetadas, são especialmente interessantes para o tratamento de artrite reumatoide, pois permitem que por administração intra-articular, o fármaco fique depositado por tempo suficiente em seu sítio de ação, não sendo rapidamente extravasado (BUTOESCU; JORDAN; DOELKER, 2009).

A origem dos *smart* polímeros pode ser natural ou sintética. Entre os polímeros naturais estão quitosana, ácido hialurônico, alginato, pectina, heparina, sulfato de condroitina, etc. (LI; RODRIGUES; TOMÁS, 2012). Uma grande vantagem de alguns polímeros naturais é a capacidade de gelificar a baixas concentrações (em torno de 2%), característica favorável quanto ao perfil toxicológico (SHAIKH *et al.*, 2012). A goma gelana é um biopolímero, secretado por *Sphingomonas elodea*, constituído por unidades tetrassacarídicas repetidas de glicose, ácido glicurônico e ramnose, numa proporção de 2:1:1. Em meio aquoso, as cadeias poliméricas de goma gelana se gelificam com a redução de temperatura e se entrecruzam na presença de cátions mono ou divalentes (PATIL *et al.*, 2010). Hidrogéis à base de goma gelana tem demonstrado muita eficiência tanto para a entrega de fármacos (DUAN *et al.*, 2015; POSADOWSKA; BRZYCHCZY-WLOCH; PAMULA, 2016), quanto para a engenharia de tecidos (BELLINI *et al.*, 2015; KHANG *et al.*, 2015), inclusive para recuperação de cartilagem (GONG *et al.*, 2009).

Os poloxâmeros, ou Pluronic®, são exemplos de polímeros sintéticos termorresponsivos constituídos por poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO), organizados em triblocos do tipo PEO-PPO-PEO. Os pesos moleculares e a proporção óxido de etileno:óxido de propileno variam de 1100 a 14000 e 1:9 a 8:2, respectivamente (SHAIKH *et al.*, 2012). As soluções de poloxâmeros são fluídas a baixa temperatura, apresentando micelas dispersas, as quais mediante aquecimento se ordenam levando à gelificação. Embora a maioria dos poloxâmeros tenham a menor temperatura crítica de solução (LCST) bem acima da temperatura corporal normal, eles gelificam à temperatura corporal quando em soluções concentradas (acima de 16%) (KUMBHAR; RAKDE; CHAUDHARI, 2013).

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação contendo metotrexato, baseados em hidrogel termorresponsivo e/ou PECs de quitosana e HPMCP, com finalidade de serem administrados por via intra-articular para tratamento de artrite reumatoide.

Objetivos específicos foram:

- a) desenvolver um veículo que promovesse a retenção e prolongasse a ação do MTX via intra-articular;
- b) desenvolver PECs com carga de superfície positiva e faixa de tamanho entre 200-1000 nm, características conhecidas por promover o direcionamento sítio-específico visando o sistema imunológico;
- c) desenvolver PECs utilizando metodologia que não requeira equipamentos específicos;
- d) usar excipientes biocompatíveis;
- e) obter PECs passíveis de serem transformados em produto farmacêutico;
- f) pesquisar o desempenho *in vitro* e eficácia *in vivo* dos sistemas desenvolvidos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de tornar o texto da metodologia mais simples e objetivo, a especificação das matérias-primas e equipamentos utilizados será apresentada separadamente.

### 4.1 MATERIAIS

As matérias primas, solventes e materiais consumíveis foram:

metotrexato, Fermion, OY-Finlândia, lote 1553325;

acetato de sódio tri-hidratado, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil, lote 09/0049;

acetonitrila, Merck, Alemanha, lote 1728130;

ácido acético glacial, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil, lote 13/0141;

ácido clorídrico, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil, lote 09/391;

ácido fórmico 88%, Biotec Reagentes Analíticos, Pinhais, Brasil, lote 19670;

adjuvante Completo de Freund, Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos;

água Milli-Q;

Anasedan solução injetável (xilazina 2%), Ceva, Paulínia, Brasil;

cloreto de sódio, Labsynth, Diadema, Brasil, lote 189485;

cloreto de potássio, Labsynth, Diadema, Brasil, lote 188798;

Dopalen solução injetável (ketamina 10%), Ceva, Paulínia, Brasil;

Fauldmetro solução injetável (metotrexato 50 mg), Libbs, São Paulo, Brasil;

fosfato de potássio monobásico PA, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, Brasil, lote 69336;

fosfato de sódio dibásico heptahidratado PA, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil, lote 1102086;

hidróxido de sódio, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil, lote 952012;

hidroxipropil metilcelulose ftalato (tipo HP-55), Shin Etsu, Tóquio, Japão, lote 3032073;

kit para desenvolvimento padrão ABTS ELISA para IL-1 $\beta$  de ratos, PeproTech, Rocky Hill, Estados Unidos, lote 1114091;

manose D (+), Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos, lote #SLBH1709V;

membrana RA em éter de celulose, 1,2 µm de poro, 47 mm de diâmetro, Millipore Indústria e Comércio Ltda., Barueri, Brasil, lote BONA78010;

membrana Spectra/Por molecularporous, Spectrum, Rancho Dominguez, Canadá;

metanol, Panreac Química SLU, Barcelona, Espanha, lote 0000492476;

poloxâmero 407, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, lote BCBG3949V;

poloxâmero 188, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, lote 070M0117V;

quitosana de baixa viscosidade, Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos, lote #BCBJ1722V;

trealose D (+) dihidratada, Vetec, Rio de Janeiro, lote 070245;

triacetóxi-borohidreto de sódio, Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos, lote #SHBG6214V.

Os equipamentos empregados foram:

agitador magnético Multistirrer, Velp Científica, Itália;

analisador de espalhamento de luz dinâmico (DLS), Zetasizer Nano NS®, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido;

balança analítica AUY 220, Shimadzu, Brasil;

banho de ultrassom, Unique, Brasil;

calorímetro NETZSCH modelo DSC Syrius 3500, Kanagawa, Japão;

calorímetro TA Instrument, modelo DSC Q20, New Castle, Estados Unidos;

células de difusão tipo Franz, Hanson Research Corporation, Chatsworth, Estados Unidos;

centrífuga MiniSpin plus, Eppendorf, Brasil;

difratômetro de raios X de pó da marca Rigaku, modelo Ultima IV (tipo II), Tóquio, Japão;

espectrofotômetro UV-Vis UV-M51, Bel Photonics, Brasil;

espectrofotômetro UV-Vis 2401-PC, Shimadzu, Brasil;

espectrofotômetro na região do IV por transformada de Fourier IV-FT Shimadzu, modelo Affinity-1 (Tóquio, Japão) acoplado à um acessório de amostragem por refletância total

atenuada (ATR) Pike Miracle com cristais de ZnSe Pike Technologies (Madison, Wisconsin, EUA);

kit de filamentos de von Frey, Aesthesio, San Jose, Estados Unidos;

leitor de microplacas Synergy H1, BioTek, Winooski, Estado Unidos;

liofilizador Labconco®, Labconco Corporation, Estados Unidos;

medidor de pH modelo Mpa-210, Tecnopon, Brasil;

microscópio Axio Scope A1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha;

microscópio de Força Atômica NX10, Park Systems, Coréia do Sul;

reômetro MARS II, Haake®;

termobalança TA Instrument, modelo STD Q600, New Castle, Estados Unidos;

texturômetro Tact Express, Extralab, Brasil;

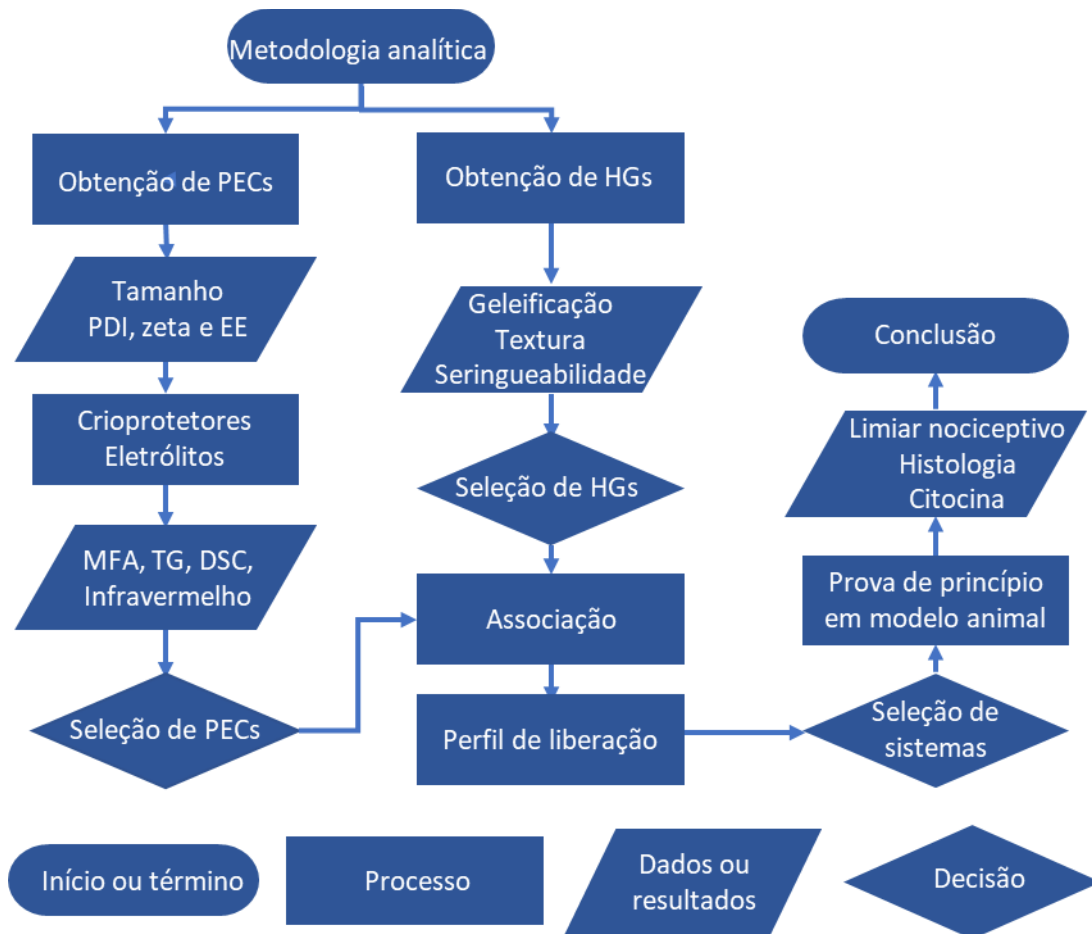
titulador automático MPT-2;

viscosímetro de Cannon Fenke nº 150 para líquidos transparentes, Laborglas, Brasil.

## 4.2 MÉTODOS

Para facilitar a compreensão da integração das metodologias que serão descritas nesta seção, a Figura 6 apresenta um esquema geral das etapas experimentais.

Figura 6 - Etapas experimentais



Legenda: HGs= hidrogéis; PECs= complexos polieletrólitos; PDI= índice de polidispersão; EE= eficiência de encapsulação, MFA= microscopia de força atômica; TG= termogravimetria; DSC= calorimetria exploratória diferencial; rX= raios X

Fonte: DO AUTOR (2019)

#### 4.2.1 Validação de metodologia analítica para quantificação de MTX

O método analítico para quantificação de MTX foi desenvolvido empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise foi feita em modo isocrático, utilizando como fase móvel uma mistura contendo 77% (v/v) de solução tampão acetato pH 4,3, 16% (v/v) de metanol e 7% (v/v) de acetonitrila. O tampão acetato pH 4,3 foi preparado a partir da seguinte fórmula: acetato de sódio anidro  $0,665 \text{ mg.mL}^{-1}$  e ácido acético  $0,714 \text{ mg.mL}^{-1}$  em água Milli-Q, com ajuste de pH para 4,3 com quantidade suficiente de solução aquosa de HCl  $182,3 \text{ mg.mL}^{-1}$  se necessário. Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa (C18) com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partícula de  $5 \mu\text{m}$ . Empregou-se

também pré-coluna preenchida com o mesmo material. O volume de injeção foi 50  $\mu\text{L}$ , a vazão de fase móvel, 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e o tempo de corrida 8 min. A detecção foi realizada por espectrofotometria no UV a 306 nm, comprimento de onda selecionado de acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (DE OLIVEIRA; ALVES; PEREIRA, 2016) por coincidir com faixa de máximo de absorção de MTX no UV.

#### 4.2.1.1 Pesquisa de seletividade

A pesquisa de seletividade se iniciou com a investigação da possibilidade de algum dos excipientes propostos (quitosana, oligoquitosana, HPMCP, poloxâmero 407 e poloxâmero 188) apresentarem absorção relevante em relação à apresentada por MTX em tal comprimento de onda. Para isso, os excipientes foram dispersos em água Milli-Q mantendo-se a concentração proporcional e o pH com que foram empregados nas formulações. Para cada amostra obteve-se o espectro de absorção no UV, na faixa espectral de 200 a 400 nm. O perfil de absorção no UV também foi determinado para PECs de quitosana vazios (QSV) e PECs de oligoquitosana carregados vazios (OQV), cujos sobrenadantes foram analisados após os PECs terem sido centrifugados a 1200 x *g*, por 2 horas.

Para verificação da seletividade do método cromatográfico para determinação de MTX livre no sobrenadante de PECs, PECs vazios de quitosana e oligoquitosana foram analisados sob as condições acima e os cromatogramas foram comparados ao apresentado pelos PECs carregados com MTX. O preparo de amostras de PECs para análise por CLAE encontra-se descrito na seção 4.2.2.3.2.

#### 4.2.1.2 Verificação da linearidade

Preparou-se uma solução mãe de MTX na concentração de 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tampão fosfato pH 7,4 (fosfato de sódio dibásico anidro 1,732  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e fosfato de potássio monobásico 1,0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em água Milli-Q). A partir de tal solução, foram feitas oito diluições nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 20, 25 e 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . sendo que cada diluição foi preparada em triplicata. Como diluente utilizou-se solução tampão acetato pH 4,3. As diluições

foram filtradas por membrana de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e submetidas a análise cromatográfica, sob as condições acima descritas.

Plotou-se um gráfico da área dos picos em função da concentração, para verificação da linearidade. O método de regressão linear adequado foi escolhido em função do resultado do teste de Cochran ( $C$ ), calculado conforme a equação:

$$C = \frac{\text{maior variância em } y}{\sum \text{variâncias}}$$

Por meio do *software R*<sup>®</sup> efetuou-se o ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados para obtenção da equação da reta ajustada. A confiabilidade da reta obtida foi avaliada estatisticamente pela avaliação da significância do coeficiente angular (teste F), análise da soma residual dos quadrados mínimos (SSE), inspeção visual da distribuição dos resíduos em torno do eixo x e da plotagem simultânea de y observado experimentalmente e y calculado a partir da equação da reta.

#### 4.2.1.3 Verificação da precisão

A partir de uma solução mãe contendo 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MTX em tampão fosfato pH 7,4 foram feitas diluições para se obterem soluções nas concentrações de 5,0, 20,0 e 30,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cada concentração foi obtida em triplicata e efetuou-se a análise cromatográfica sob as condições acima descritas. As áreas sob os picos de MTX foram aplicadas na equação da reta ajustada para determinação da concentração real de cada diluição.

A precisão, ou desvio padrão relativo (DPR), foi calculada a partir do desvio padrão (DP) e média (M) de análises efetuadas no mesmo dia (precisão intra-dia) e análises efetuadas em dias distintos (precisão interdia), como se segue:

$$DPR = \frac{DP}{M} \times 100$$

A precisão intermediária foi avaliada pelo teste t de student.

#### 4.2.1.4 Verificação da exatidão

A partir das análises das amostras descritas na seção 4.2.1.3, a exatidão foi calculada pela seguinte equação:

$$Exatidão = \frac{\text{média das concentrações experimentais}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

A recuperação de MTX a partir de amostras de PECs vazios (OQV e QS200V) contaminadas com MTX foi pesquisada da seguinte forma: a 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante dos PECs previamente centrifugados a 14000 x g por 1,5 h, foram acrescentados 40  $\mu\text{L}$  de solução de MTX 0,5  $\text{mg.mL}^{-1}$  em tampão fosfato pH 7,4 e 460  $\mu\text{L}$  de tampão acetato pH 4,3. As amostras foram homogeneizadas, filtradas por membrana de poro 0,045  $\mu\text{m}$  e submetidas à análise cromatográfica. A área do pico de MTX nas amostras contaminadas foi comparada à do pico gerado por uma solução de MTX a 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 4.2.1.5 Determinação dos limites de quantificação e de detecção

A partir das leituras feitas para determinação da linearidade, foram geradas três curvas independentes, com suas respectivas retas, cujos valores de intercepto e inclinação serviram de subsídio para calcular o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) do método a partir das seguintes fórmulas:

$$LQ = \frac{DP \text{ intercepto}}{\text{inclinação média}} \times 10 \qquad LD = \frac{DP \text{ intercepto}}{\text{inclinação média}} \times 3,3$$

## 4.2.2 Desenvolvimento dos PECs

Antes da descrição da obtenção dos PECs e sua caracterização, serão apresentados resultados de caracterização da quitosana, quanto aos principais aspectos que podem influenciar as partículas obtidas a partir deste polímero.

### 4.2.2.1 Caracterização da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por titulação potenciométrica e a massa molar, por viscosimetria, como detalhado a seguir.

#### 4.2.2.1.1 Determinação do grau de desacetilação

O GD da quitosana foi determinado por titulação potenciométrica seguindo o método desenvolvido por Jiang, Chen e Zhong (2003), o qual utiliza uma função linear simplificada aplicada dentro de uma região de pH universal (2,4 a 3,6), dentro da qual evitam-se os erros inerentes à precipitação polimérica em pH acima de 6,0 e aqueles decorrentes das limitações na aferição do pH.

Preparou-se uma dispersão de 200 mg de quitosana em 25 mL de solução aquosa de HCl 3,646 mg.mL<sup>-1</sup>. A dispersão foi mantida sob agitação magnética até solubilização do polímero. Então foram acrescentados 746 mg de KCl e completou-se o volume de 100 mL com água Milli-Q, de modo que a força iônica da solução a ser titulada foi ajustada para 0,1. Procedeu-se a titulação, empregando-se como titulante uma solução aquosa de NaOH 4,0 mg.mL<sup>-1</sup> e KCl 74,55 mg.mL<sup>-1</sup>. Sob agitação contínua, o titulante foi adicionado até que o pH atingisse 2,0, a partir daí foram feitos incrementos de 0,5 mL de titulante por vez, sendo que após cada um deles aguardou-se a estabilização do pH e registrou-se o valor. A titulação foi interrompida quando o pH da solução atingiu 4,0. O experimento foi realizado em triplicata.

Dentro da faixa de pH proposta no método (2,4 a 3,6), calculou-se o volume de NaOH necessário para desprotonar os resíduos desacetilados de quitosana (previamente protonados pelo HCl), representado por  $Y'$ , pela seguinte equação (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003):

$$Y' = \left( \frac{V_O + V_B}{C_B} \right) \times ([H^+] - [OH^-]),$$

onde  $V_O$ (L) é o volume da dispersão de quitosana antes do início da titulação,  $V_B$ (L) é o volume de titulante adicionado e  $C_B$  é a concentração da solução titulante.

Na mencionada faixa de pH, o volume ( $V$ ) é uma função linear de  $Y'$  (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003):

$V = V_e + Y'$ , onde  $V_e$  é o volume de equivalência. Por isso, plotou-se um gráfico de  $V$  em função de  $Y'$ , no qual a extrapolação da reta permitiu conhecer o  $V_e$ , quando  $Y'$  assume valor zero.

Conhecendo-se  $V_e$ , foi calculado o GD por meio das seguintes equações:

$$d = \frac{(C_1 V_1 - C_B V_e)}{1000} \quad GD(\%) = \frac{d}{\left(\frac{W-161d}{204} + d\right)} \times 100 \quad \text{onde } V_1 \text{ é o volume (L) da}$$

solução de HCl empregada,  $C_1$  é a concentração da solução de HCl e  $W$  é a massa da amostra de quitosana (g).

#### 4.2.2.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica

A massa molar polimérica foi determinada pelo método de viscosimetria capilar (BARBI, 2011). Foi preparada, em triplicata, uma dispersão de quitosana a  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  em sistema solvente constituído por solução aquosa de ácido acético  $6,0052 \text{ mg.mL}^{-1}$  e cloreto de sódio  $11,688 \text{ mg.mL}^{-1}$ . O ensaio foi realizado a  $25^\circ\text{C}$ , sendo que a temperatura foi mantida estável com auxílio de ar condicionado. Utilizou-se um viscosímetro de Cannon Fenke nº150 (FIGURA 7), o qual foi alimentado com aproximadamente 8 mL de amostra, com auxílio de um pipetador manual. Cronometrou-se o tempo gasto pela amostra e pelo sistema solvente para percorrerem a distância entre os dois meniscos presentes no aparato.

Figura 7 - Aparato utilizado para determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana



Fonte: DO AUTOR (2017)

O cálculo da massa molar foi realizado utilizando o procedimento validado por Costa *et al.* (2015), o qual emprega a viscosidade específica ( $\eta_{esp}$ ) de uma solução infinitamente diluída, a qual é dada por:

$$\eta_{esp} = \frac{(t - t_0)}{t_0}, \text{ onde } t \text{ é o tempo de escoamento da amostra entre os dois meniscos e } t_0$$

é o tempo gasto pelo sistema solvente para percorrer a mesma distância. A partir daí, foi possível obter a viscosidade intrínseca ( $\eta$ ), a qual é considerada a medida do volume de uma única molécula polimérica em condição ideal. Para isso foi utilizada a equação:

$\frac{\eta_{esp}}{c} = \eta + k\eta\eta_{esp}$ , onde  $c$  é a concentração da dispersão e  $k$  é um coeficiente tabelado para o sistema solvente utilizado, cujo valor é 0,28.

Pelo valor da viscosidade intrínseca foi possível determinar a massa molar viscosimétrica ( $M_v$ ) aplicando-o na equação de Mark-Houwink-Sakurada (KASAAI, 2007):

$\eta = K(M_v)^\alpha$ , onde  $K$  e  $\alpha$  são constantes viscosimétricas que variam em função da natureza do solvente, temperatura e estrutura química do polímero. Para a quitosana, no sistema solvente aqui empregado e a 25°C,  $K$  vale  $1,81 \times 10^{-3} \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $\alpha$ , 0,93 (KASAAI, 2007).

#### 4.2.2.2 Obtenção dos PECs

Os PECs foram obtidos a partir de duas dispersões (A e B) e uma solução (C), as quais foram obtidas da seguinte forma:

A = dispersão de quitosana (forma polimérica) ou oligoquitosana (forma oligomérica)  $4,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Duzentos miligramas de quitosana ou oligoquitosana foram dispersos em solução aquosa de ácido acético  $6,005 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ou água, respectivamente, por um período *overnight*, mediante agitação magnética. Em alguns ensaios, tal dispersão foi acrescida com solução aquosa de NaCl  $2,922$ ,  $5,844$ ,  $11,688$ ,  $17,532$  ou  $23,376 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Em seguida, efetuou-se ajuste para pH 5,5, apenas no caso de se utilizar solução aquosa de ácido acético  $6,005 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  como meio de dispersão. A dispersão teve o volume final completado para 50 mL e foi filtrada através de membrana de poro de  $1,2 \mu\text{m}$ .

B = solução de ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCp)  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ : 100 mg de HPMCp foram dispersos em solução aquosa de NaOH  $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sob agitação magnética, por um período *overnight*. Em alguns ensaios, tal dispersão foi acrescida com NaCl 2,922, 5,844, 11,688, 17,532 ou  $23,376 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A dispersão obtida teve seu pH ajustado para 5,5, 6,0 ou 6,7. O volume foi completado para 50 mL e filtrou-se a dispersão por membrana, com diâmetro de poro  $1,2 \mu\text{m}$ .

C = tampão fosfato pH 7,4 ou solução de MTX a 0,5, 1,0 ou  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  em tampão fosfato pH 7,4. A solução foi filtrada através de membrana com diâmetro de poro de  $0,4 \mu\text{m}$ .

Sobre 2 mL da solução A, foram gotejados, por meio de seringa, 1,06 mL da solução C, sob forte agitação magnética. Em seguida, foram gotejados 1,34 mL da solução B. A agitação magnética foi mantida por mais 30 minutos.

O Quadro 5 exhibe todos os fatores que foram pesquisados durante o desenvolvimento dos PECs e o código atribuído a cada variação de fórmula sintetizada. As variáveis exploradas foram o tipo de quitosana (oligomérica ou polimérica), a força iônica das dispersões poliméricas, a concentração de MTX em relação à massa polimérica, o pH da dispersão de HPMCp e o meio de dispersão da quitosana. A proporção quitosana:HPMCp foi mantida fixa em 3:1 com base em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (NAVES, 2018).

Quadro 5 – Fatores pesquisados durante o desenvolvimento dos PECs

FATORES		PECs													
		QS	QS50	QS100	QS200	QS300	QS400	QSV	QS200V	OQ-1	OQ-2	OQ-5	OQ-6	OQ-7	OQV
Tipo de quitosana	Polimérica	X	X	X	X	X	X	X	X						
	Oligomérica									X	X	X	X	X	X
Força iônica (concentração acidronada de NaCl (mg.mL <sup>-1</sup> ))	0	X						X		X		X	X	X	X
	2,922		X												
	5,844			X											
	11,688				X				X	X					
	30017,532					X									
	23,376						X								
MTX	Presente	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	
	Ausente							X	X						X
pH da dispersão de HPMCP	5,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
	6,7											X	X	X	X
Meio de dispersão da quitosana	CH <sub>3</sub> COOH 6,005 mg.mL <sup>-1</sup> pH 5,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
	Água											X	X	X	X
Concentração de MTX em relação à massa polimérica	5%	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X			
	10%												X		
	20%													X	*

Legenda: PECs= complexos polieletrólitos; MTX= metotrexato; HPMCP= ftalato de hidroxipropilmetil celulose; \*= ausência de MTX

Fonte: DO AUTOR (2019)

#### 4.2.2.3 Caracterização dos PECs

As caracterizações iniciais dos PECs compreenderam a determinação do tamanho de partícula, da polidispersão, do potencial zeta e da eficiência de encapsulação (EE). Os resultados de tais caracterizações possibilitaram a seleção de amostras que foram submetidas às caracterizações adicionais, por microscopia de força atômica, análise térmica e espectroscopia no infravermelho.

##### 4.2.2.3.1 *Determinação de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta*

Todos os PECs desenvolvidos tiveram o diâmetro hidrodinâmico médio e o PDI analisados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e o potencial zeta avaliado por 5.2espalhamento de luz eletroforético. As análises foram feitas a 25°C, utilizando um ângulo de detecção de 173°. Para a execução de tais medidas as suspensões foram diluídas com água Milli-Q na proporção de 1:3,33.

Para alguns PECs verificou-se a variação do potencial zeta em função do pH com auxílio do titulador automático acoplado ao Zetasizer Nano ZS®. Estudou-se a faixa de pH de 3 a 10, empregando-se soluções aquosas de HCl 9,115 mg.mL<sup>-1</sup> e NaOH 10 mg.mL<sup>-1</sup> e 20 mg.mL<sup>-1</sup>. As amostras tituladas foram previamente diluídas em água Milli-Q a uma concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

##### 4.2.2.3.2 *Determinação da eficiência de encapsulação*

A EE foi determinada em suspensões de PECs frescas, cerca de 24 h após a obtenção. Um mililitro de suspensão foi transferido para eppendorf e centrifugado a 14000 x g por 1,5 h. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram diluídos com 500 µL de solução tampão acetato pH 4,3. A diluição foi filtrada através de membrana de poro de 0,45 µm e efetuou-se a quantificação de MTX por meio de CLAE, seguindo as condições validadas pelo método descrito na seção 4.2.1.2. Para amostras cujo valor quantificado extrapolou a concentração

máxima da curva de calibração, a análise foi repetida utilizando-se um maior fator para diluição do sobrenadante. Todas as análises foram feitas em triplicata.

A EE foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$EE (\%) = \frac{[\text{MTX empregado na obtenção}] - [\text{MTX no sobrenadante da suspensão}]}{[\text{MTX empregado na obtenção}]} \times 100$$

#### 4.2.2.3.3 *Microscopia de força atômica*

As suspensões de PECs foram colocadas em banho de ultrassom durante 10 minutos. Em seguida, pequenas lâminas de vidro, as quais foram usadas como suporte, foram mergulhadas na amostra. Após 5 minutos, as lâminas foram retiradas, rinsadas com água Milli-Q e secas por movimento de rotação manual, a uma velocidade aproximada de 30 rpm.

As lâminas foram analisadas no microscópio Park Systems NX10, em modo de contato NCM (True Non-Contact™ Mode), utilizando cantilever NSC15. Foram registradas imagens com tamanho de XScan: 16 µm e YScan: 13,8 µm e resolução de 512x512 pixels. As imagens foram analisadas utilizando o *software* Park SmartScan™. A análise de grãos foi efetuada pelo método *Threshold*, sendo observadas áreas superiores a várias alturas a partir de 0 nm.

#### 4.2.2.3.4 *Espectroscopia de absorção no IV*

Amostras liofilizadas dos PECs QS200, QS200V, OQ-7 e OQV, assim como as matérias-primas utilizadas na obtenção, quitosana, oligoquitosana, HPMCP, metotrexato, e os crioprotetores, manose e trealose, foram analisadas por espectroscopia no IV no modo ATR. Foram obtidos espectros na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.2.5 *Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial*

Para a análise por termogravimetria (TG) foram pesados cerca de 8 a 10 mg de amostra (quitosana, oligoquitosana, HPMCP, MTX, trealose, manose, QS200, QS200V, OQ-7 ou OQV) em cadinho de alumina. Os experimentos foram realizados sob atmosfera de nitrogênio ( $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , a partir de  $20^\circ\text{C}$  até a temperatura máxima de  $600^\circ\text{C}$ .

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas pesando-se de 5 a 10 mg das amostras (quitosana, oligoquitosana, HPMCP, MTX, trealose, manose, QS200, QS200V, OQ-7 ou OQV) em cadinho de alumínio aberto, o qual foi posteriormente fechado. As medidas foram conduzidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com um fluxo de calor de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , aquecido a partir da temperatura ambiente até  $400^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.2.4 Seleção de crioprotetores

Para o estudo de crioproteção, foram produzidos vários lotes de QS200, os quais foram reunidos em um *pool* cujo tamanho de partícula foi determinado por DLS, cerca de 24 h após a obtenção. Para cada amostra, 1 mL da suspensão foi transferido para frasco de penicilina e acrescentou-se o(s) crioprotetor(es). Os frascos foram movimentados gentilmente até completa solubilização dos crioprotetores. Em seguida, as amostras foram congeladas mediante imersão em nitrogênio líquido enquanto o frasco era girado em posição inclinada, de modo que a amostra se congelasse na forma de um filme fino aderido às paredes do recipiente. As amostras congeladas foram submetidas a liofilização, à temperatura de  $-49^\circ\text{C}$  e pressão  $0,024 \text{ mBar}$ .

As alternativas de crioproteção avaliadas foram: trealose 10%; manose 10%; trealose 5%; manose 5%; trealose 5% + manose 5%, trealose 2,5% + manose 2,5%, manitol 10% e manitol 5%. A título de comparação também foi efetuada a liofilização de amostra congelada nas mesmas condições, porém na ausência de qualquer crioprotetor e, portanto, usada como controle negativo. Todas as opções foram testadas em triplicata.

Para ressuspensão das amostras liofilizadas foi utilizada uma mistura de solução aquosa de ácido acético  $6,005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  pH 5,5, solução aquosa de hidróxido de sódio  $4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  pH 5,5 e tampão fosfato pH 7,4, nas proporções necessárias para reproduzir o meio de obtenção dos PECs, conforme descrito na seção 4.2.2.2. Inicialmente verificou-se se seria possível ressuspender cada amostra em  $100 \mu\text{L}$ . Depois o volume foi completado para 1 mL e a amostra

foi submetida a análise de tamanho por DLS e análise morfológica por microscopia por força atômica, conforme metodologia descrita nas seções 4.2.2.3.1 e 4.2.2.3.3 respectivamente.

A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal Wallis, pelo *software* R (R CORE TEAM, 2018) usando o pacote Agricolae (MENDIBURU, 2017).

### 4.2.3 Desenvolvimento de hidrogéis

O desenvolvimento dos hidrogéis consistiu na sua obtenção e caracterização quanto à temperatura de gelificação, perfil de textura e seringueabilidade, conforme a metodologia detalhada adiante.

#### 4.2.3.1 Obtenção dos hidrogéis

Foram preparados hidrogéis contendo poloxâmero 407 20% (m/m) e poloxâmero 188 10% (m/m) em água Milli-Q pelo método de dispersão a frio (SCHMOLKA, 1972). Para obtenção do hidrogel base (HG), os polímeros foram pesados, tamizados e dispersados aos poucos sobre a água milli-Q, já sob agitação, contida em béquer mergulhado em banho de gelo. A agitação foi mantida por 20 min., à velocidade mínima suficiente para movimentar adequadamente a dispersão. A formulação foi armazenada sob refrigeração e aguardaram-se no mínimo 24 h antes que qualquer caracterização fosse feita.

HG-MTX, ou seja, formulação base acrescida do fármaco, foi preparado do mesmo modo. A única diferença foi que a fase aquosa foi constituída por MTX solubilizado em tampão fosfato pH 7,4, em quantidade suficiente para se obter concentrações finais de 1,4 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,120 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,482 mg.mL<sup>-1</sup>.

Com a mesma proporção de poloxâmeros e metodologia descritas acima, também foram obtidos HG-QS, HG-QS200, HG-OQ-7 e HG-OQV, nos quais a fase aquosa consistiu de suspensão fresca de QS, QS200, OQ-7 e OQV, respectivamente, e HG-OQ-7 liof., no qual a fase aquosa foi constituída por ressuspensão de OQ-7 liofilizados.

#### 4.2.3.2 Caracterização dos hidrogéis

Todos os hidrogéis foram caracterizados quanto a sua temperatura de gelificação, pelo método de inversão do tubo, e algumas amostras, especificadas na subseção 4.2.3.2.2, tiveram tal parâmetro avaliado também por reometria oscilatória.

##### 4.2.3.2.1 Determinação da temperatura de gelificação pelo método de inversão do tubo

A temperatura de gelificação de HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7 foi estimada pelo método de inversão do tubo (SHINDE *et al.*, 2016). Acondicionou-se 1 mL de amostra em *ependorf* de 2 mL. A amostra foi mergulhada em banho-maria a 25°C e a temperatura do banho foi elevada numa velocidade aproximada de 1°C a cada 3 minutos, até a ocorrência de gelificação, o que foi monitorado a cada incremento de 1°C. A gelificação foi caracterizada quando a inclinação do tubo a 90° não mais produziu deslocamento do menisco da amostra (FIGURA 8). O teste foi realizado em triplicata.

Figura 8 – Caracterização de amostra de HG gelificada (B) e não gelificada (A), durante determinação da temperatura de gelificação pelo método de inversão do tubo



Fonte: DO AUTOR (2017)

##### 4.2.3.2.2 Determinação da temperatura de gelificação por método reométrico oscilatório

A fim de se determinar a temperatura de transição sólido-gel ( $T_{sol/gel}$ ), amostras de HG, HG-MTX e HG-QS foram analisadas em reômetro de tensão e gradiente controlados MARS II (Haake®), no modo oscilatório com rampa de temperatura, e geometria cone-placa paralela de 35 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm (BARBOSA *et al.*, 2017; BRUSCHI *et al.*, 2006, 2007; FERREIRA *et al.*, 2015; JONES *et al.*, 2009). Cada amostra foi

cuidadosamente depositada na placa inferior do equipamento, assegurando o menor cisalhamento possível da formulação, e permitindo tempo de relaxamento de um minuto antes de cada determinação. Inicialmente, foi realizada a determinação da região viscoelástica linear (RVL) de cada formulação nas temperaturas de 5 °C e 60 °C. Após isso, a análise de varredura da temperatura foi conduzida variando de 5 °C a 60 °C, com gradual aumento de 10 °C.min<sup>-1</sup> na temperatura, seguindo a aplicação de uma tensão constante e frequência de 1,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso (G''), a viscosidade dinâmica ( $\eta'$ ) e a tangente de perda ( $\tan \delta$ ) foram determinadas utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake®).

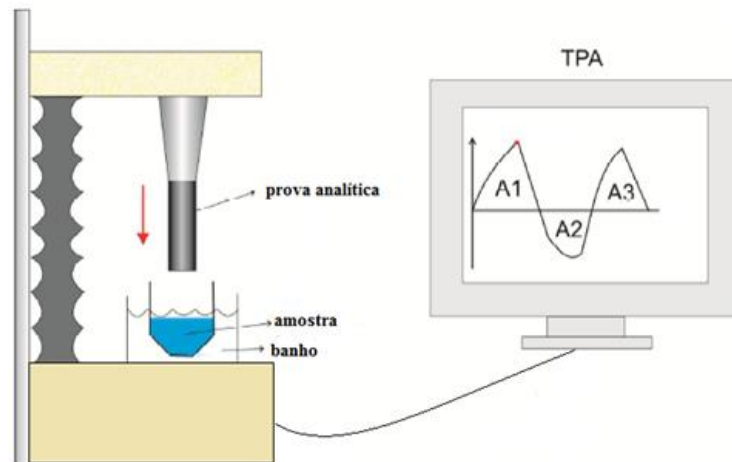
#### 4.2.3.2.3 Avaliação do perfil de textura

As formulações HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7 tiveram seu perfil de textura avaliado pelo equipamento Text Plus, disponível no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Unifal. Tal análise forneceu informações referentes à força de compressão, capacidade de adesão e coesão dos hidrogéis. A Figura 9 traz uma representação esquemática do texturômetro e de como os resultados são plotados graficamente.

Para o ensaio, o qual foi realizado em triplicata, 10 mL de amostra foram acondicionados em tubo Falcon de 50 mL e mergulhados em banho termostatizado a 37°C a fim de se obter gelificação. Durante a análise, a prova analítica (10 mm de diâmetro) penetrou na amostra, numa velocidade de 0,50 mm.s<sup>-1</sup>, percorrendo a distância de 10 mm e então retornou à sua superfície a uma velocidade de 0,50 mm.s<sup>-1</sup>. Após um intervalo de 5 segundos, houve um segundo ciclo de compressão sob as mesmas condições anteriores. A força de gatilho empregada no método foi 0,005 N. Por meio do software *Texture Exponent Lite* acoplado ao equipamento foi gerada uma curva de força em função do tempo, apresentando três áreas distintas (FIGURA 9): A1 representa o esforço necessário para comprimir a amostra durante o primeiro ciclo de compressão; A2 representa a adesão, ou seja, o trabalho efetuado pela sonda para se retirar da amostra e A3 representa o esforço necessário para a segunda compressão. A razão A3/A1 informa qual é a coesão da amostra, o que significa o quanto a amostra conseguiu manter sua resistência após a primeira compressão (CARVALHO, 2012; EXPONENT LITE, 2009; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida por teste de comparações múltiplas de Bonferroni, efetuados com auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Figura 9 - Representação esquemática do texturômetro e do resultado gráfico



Fonte: adaptado de CARVALHO (2012)

#### 4.2.3.2.4 Determinação da seringueabilidade

O trabalho necessário para extrair HG, HG-MTX, HG-QS200, HG-OQ-7, QS200 e OQ-7 de uma seringa foi avaliado com o auxílio do equipamento Taxt Express (FIGURA 10). Para a execução da análise, uma seringa de 1 mL foi preenchida cuidadosamente com a amostra evitando-se a incorporação de bolhas de ar e em seguida, foi acoplada a uma agulha 26G. Cada amostra foi testada em quintuplicata. Uma solução comercial injetável de MTX foi avaliada sob as mesmas condições, para fins comparativos.

O equipamento atuou no modo de compressão (BRUSCHI, 2006), sendo que seu braço móvel desceu, percorrendo uma distância de 20 mm e empurrando o êmbolo da seringa a uma velocidade de  $2,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pelo *software Exponent Lite* foi gerado um gráfico de força *versus* distância cuja área representa o trabalho efetuado para extrusão da amostra.

Os resultados foram submetidos a ANOVA seguida por teste de comparações múltiplas de Bonferroni, efetuados com auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Figura 10 - Ilustração do teste de determinação da seringueabilidade



Fonte: DO AUTOR

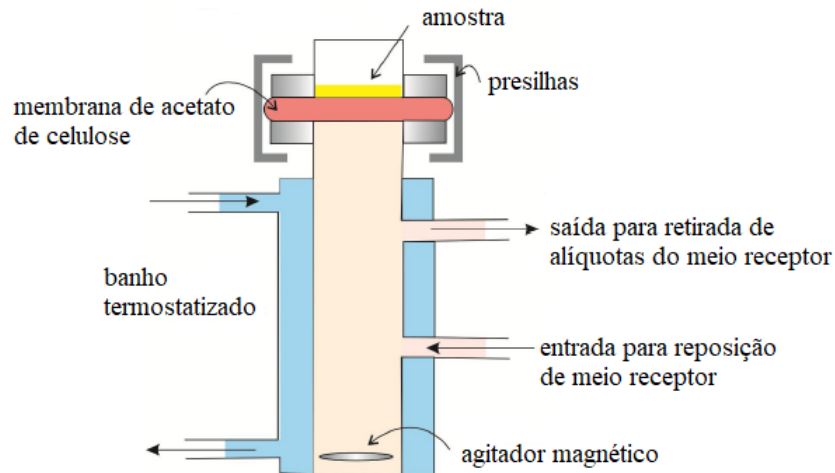
#### 4.2.4 Estudos de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos em células de difusão verticais tipo Franz (FIGURA 11), cobertas com membrana de acetato de celulose regenerada (MENDES *et al.*, 2019).

Como meio receptor foi utilizada uma solução aquosa de cloreto de sódio  $8,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , cloreto de potássio  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , fosfato de sódio dibásico  $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e fosfato de potássio monobásico  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com pH ajustado para 6,8, de forma que se simulasse o fluído sinovial de pacientes com artrite (MARQUES; LOEBENGER; ALMUKAINZI, 2011; WARD; STEIGBIGEL, 1978). Os testes foram conduzidos a  $37^\circ \text{ C}$ , sob agitação de 300 rpm. Após a montagem das células, decorrido um período de 30 minutos destinados à estabilização do sistema, efetuou-se a aplicação da amostra ( $200 \mu\text{L}$ ). Retiraram-se alíquotas de 1 mL do compartimento receptor após 15 min., 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 12 h, as quais foram analisadas por CLAE, para quantificação de MTX, conforme metodologia descrita previamente. Imediatamente após a retirada de cada alíquota, o meio receptor foi repostado em igual volume de forma a se garantir a condição *sink*. O ensaio foi conduzido em triplicata.

Para fins comparativos, além das formulações desenvolvidas, determinou-se também o perfil de liberação a partir de uma solução de MTX  $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 11 - Representação esquemática da célula de difusão utilizada para o teste de liberação *in vitro*



Fonte: adaptado de CARVALHO, 2012

Avaliou-se o ajuste dos dados experimentais aos modelos de cinética de liberação de 1ª ordem, Higuchi, Peppas e Weibull, utilizando-se o *software* Sigmaplot 10.0 (SYSTAT SOFTWARE INC, 2006) para fazer regressão não linear. A seleção do modelo matemático mais adequado foi feita considerando-se o maior coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ), informado pelo *software*, e o menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC), o qual foi determinado pela seguinte equação (COSTA; LOBO, 2001):

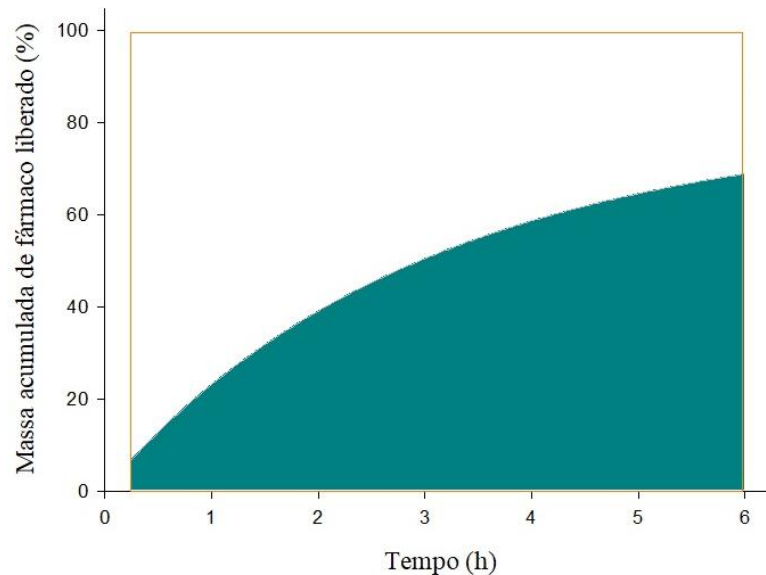
$AIC = n \times \ln(SQR) + 2 \times p$ , onde  $n$  é o número de pontos de coleta,  $SQR$ , a soma dos quadrados dos resíduos e  $p$ , o número de parâmetros do modelo matemático.

Para cada formulação determinaram-se os tempos necessários para liberação de 30, 50 e 80% do fármaco total ( $t_{30\%}$ ,  $t_{50\%}$  e  $t_{80\%}$ , respectivamente), pela leitura no gráfico de massa acumulada de MTX liberado em função do tempo. Determinou-se a eficiência de liberação em 6 h (EL 6h), a qual correspondeu à área sob a curva de liberação até o tempo de 6 h, expressa como uma porcentagem em relação à área do retângulo correspondente a 100% de liberação, porém no mesmo tempo, como ilustrado na Figura 12. Os índices de diferenciação ( $f1$ ) e similaridade ( $f2$ ) também foram calculados, em relação à solução de MTX livre e outras formas tomadas como referência, por meio das seguintes equações (COSTA; LOBO, 2001):

$$f1' = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n \frac{(R_j + T_j)}{2}} \text{ e } f2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}, \text{ onde } n \text{ é o}$$

número de pontos de coleta,  $R_j$  e  $T_j$  são os percentuais liberados em cada ponto  $j$  pela formulação de referência e a teste.

Figura 12 - Representação esquemática do conceito de eficiência de liberação no tempo de 6 h (EL 6h)



$$EL\ 6 = \frac{\text{área azul}}{\text{área do retângulo de bordas laranja}} \times 100$$

Fonte: adaptado de (COSTA; LOBO, 2001)

#### 4.2.5 Prova de princípio em modelo animal

Foram utilizados 96 ratos machos, raça Wistar, com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 250-299 g, obtidos no biotério da Universidade Federal de Alfenas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UNIFAL) da Universidade Federal de Alfenas (Protocolo nº 55/2018). Os ratos são animais bastante utilizados em modelos de artrite (GOMES *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2011; MARESCA *et al.*, 2016; OCAL *et al.*, 2014; QUINTEIRO *et al.*, 2014; SON *et al.*, 2015; THAKKAR *et al.*, 2004; UEMATSU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2008; YUDOH *et al.*, 2009). Durante o período de experimento, os animais tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos em sala com temperatura e umidade controladas ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 60%, respectivamente) e a um ciclo claro-escuro de 12

horas. Antes do início do experimento foi respeitado um prazo de 3 a 4 dias para ambientação dos ratos nas gaiolas.

#### 4.2.5.1 Distribuição dos grupos experimentais

Os ratos foram randomicamente separados em 20 grupos (QUADRO 6), sendo que em metade deles se induziu artrite reumatoide, pela aplicação de Adjuvante Completo de Freund (CFA) (GOMES *et al.*, 2013; MARESCA *et al.*, 2016; MORADO-URBINA *et al.*, 2014; OCAL *et al.*, 2014; QI *et al.*, 2016a; SNEKHALATHA *et al.*, 2013; THAKKAR *et al.*, 2004; TÜRKER *et al.*, 2008; UEMATSU *et al.*, 2011), e a outra metade permaneceu como controle e recebeu apenas óleo mineral, que é o veículo do CFA, durante os procedimentos de indução e reforço.

Quadro 6 - Descrição dos grupos de animais

(continua)

Grupo	Indução e Reforço	Tratamento	n
Co	o.m.	nenhum	4
Co+MTX oral	o.m.	solução aquosa de MTX 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4
Co+tampão i.a.	o.m.	tampão fosfato pH 7,4	4
Co+MTX i.a.	o.m.	solução de MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6
Co+HG	o.m.	hidrogel base sem fármaco	4
Co+HG-MTX	o.m.	hidrogel contendo MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6
Co+OQV	o.m.	suspensão de PECs sem fármaco	4
Co+OQ-7	o.m.	suspensão de PECs contendo MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6
Co+HG-OQV	o.m.	PECs sem fármaco dispersos em hidrogel	4
Co+HG-OQ-7	o.m.	PECs contendo MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dispersos em hidrogel	6
AR	CFA	nenhum	4
AR+MTX oral	CFA	solução aquosa de MTX 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4
AR+tampão i.a.	CFA	tampão fosfato pH 7,4	4
AR+MTX i.a.	CFA	solução de MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6
AR+HG	CFA	hidrogel base sem fármaco	4

Quadro 6 - Descrição dos grupos de animais

Grupo	Indução e reforço	Tratamento	(conclusão)
			n
AR+HG-MTX	CFA	hidrogel contendo MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6
AR+OQV	CFA	suspensão de PECs sem fármaco	4
AR+OQ-7	CFA	suspensão de PECs contendo MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6
AR+HG-OQV	CFA	PECs sem fármaco dispersos em hidrogel	4
AR+HG-OQ-7	CFA	PECs contendo MTX 482 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dispersos em hidrogel	6

Legenda: MTX= metotrexato; o.m.= óleo mineral; CFA= Adjuvante Completo de Freund; PEC= complexo polieletrólítico; n= número de animais por grupo; Co= controle; AR= artrite reumatoide; HG= hidrogel; i.a.= intra-articular

Fonte: DO AUTOR (2019)

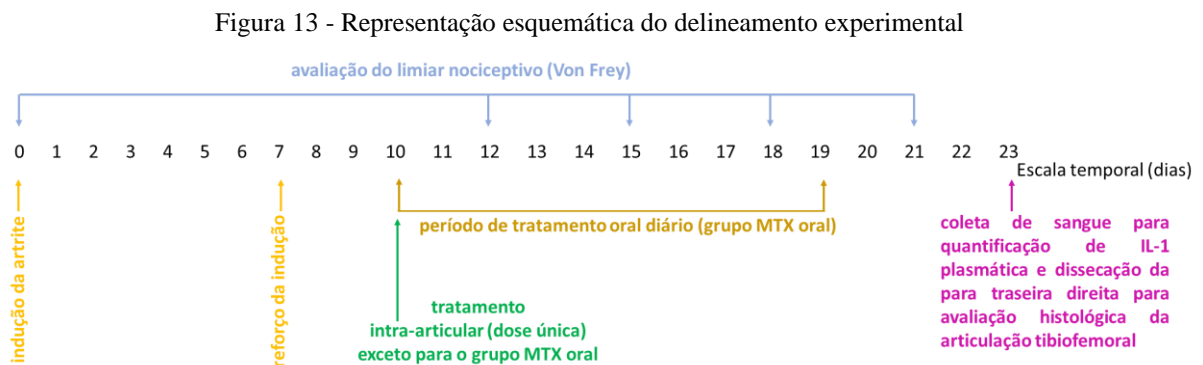
#### 4.2.5.2 Protocolo experimental

No dia zero do experimento, antes de qualquer outro procedimento, mediu-se o limiar nociceptivo basal de cada animal, pelo teste de von Frey de filamentos (CHAPLAN *et al.*, 1994; DIXON, 1980), cuja metodologia encontra-se descrita adiante. Em seguida os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de solução de cetamina e xilazina, nas doses de 75 e 10 mg/kg, respectivamente, seguindo recomendações específicas do Centro de Bioterismo da Unifal-MG. Os animais sedados foram colocados sobre placa aquecedora para prevenção de hipotermia e foi realizada uma tricotomia no joelho direito e de suas regiões adjacentes. Após esse procedimento, foram injetados intra-articularmente no joelho direito de cada animal 100  $\mu\text{L}$  de CFA (SNEKHALATHA *et al.*, 2013; THAKKAR *et al.*, 2004) ou de óleo mineral. Sete dias após a indução, os animais foram novamente sedados e receberam a mesma injeção intra-articular realizada no início do experimento, descrita como dose reforço (CHONDREX, 2015). No dia 10, os animais foram anestesiados e receberam injeção intra-articular de 100  $\mu\text{L}$ , administração única, do tratamento a ser avaliado, a qual representou uma dose de 175.7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os grupos tratados por via oral (Co-MTX oral e AR-MTX oral) receberam solução aquosa

de MTX  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , na dose de  $75 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (BENDELE *et al.*, 1999), diariamente, do dia 10 ao dia 19, resultando numa ingestão total de  $750 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

A partir do dia 12, avaliou-se o limiar nociceptivo dos animais, a cada três dias, até o dia 21. No dia 23, os animais foram anestesiados e coletou-se o sangue por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado para separação do plasma, o qual foi armazenado a  $-80^\circ \text{C}$  para posterior quantificação de IL-1 $\beta$ . Em seguida, os animais foram sacrificados e sua pata traseira direita foi dissecada e colocada em *p*-formaldeído tamponado  $40\text{mg.mL}^{-1}$ , para que se realizasse estudo histológico da articulação tibiofemoral.

O delineamento experimental se encontra esquematizado na Figura 13.



Fonte: DO AUTOR (2019)

#### 4.2.5.3 Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von Frey filamentos

Para avaliação do limiar nociceptivo, os animais foram dispostos sobre uma tela e cercados individualmente por caixas transparentes de acrílico, divididas em boxes. Após colocar os animais no aparato, aguardava-se um período mínimo de 30 minutos ou tempo suficiente para ambientação.

Utilizou-se um kit de von Frey de filamentos (CHAPLAN *et al.*, 1994) (FIGURA 14a). O teste foi iniciado a partir de um filamento mediano, correspondente a 6,0 g, o qual geralmente exerce pressão abaixo do limiar nociceptivo de ratos saudáveis. O filamento foi pressionado perpendicularmente à região central suplantada da pata traseira direita do animal em repouso, apoiado sobre a tela com as quatro patas (FIGURA 14b). A aplicação da pressão foi feita de modo padronizado de forma que fosse interrompida no momento em que o filamento começasse

a arquear. Cada filamento foi pressionado 3 vezes, com intervalo de tempo entre cada aplicação. Em seguida, o ciclo foi repetido com o filamento imediatamente mais forte, caso o animal não houvesse manifestado dor. Em caso de resposta positiva, representada pelo ato de chacoalhar ou lamber a pata, a resposta foi marcada com um “X” e repetiu-se o ciclo de estímulos com o filamento imediatamente mais fino. As respostas negativas foram registradas com um “O” e o próximo ciclo de estímulos foi feito com o filamento imediatamente mais espesso, de acordo com o método *up-and-down* (DIXON, 1980). Caso fossem observadas quatro respostas positivas ou negativas sequenciais o teste era interrompido e reiniciado (MASCARIN, 2015). O teste foi conduzido até que fossem registradas 6 respostas contadas a partir da primeira resposta positiva. A sequência de respostas foi registrada em uma planilha eletrônica específica, que a converteu no valor numérico do limiar nociceptivo.

Figura14 – Kit de filamentos de von Frey (A) e aplicação do teste de von Frey (B)



Fonte: imagens disponíveis nos sítios eletrônicos: bioseb.com (A) e land.icb.usp.br (B) (acesso em 02/06/2020)

O delineamento longitudinal foi analisado usando metodologia de Equações de Estimção Generalizadas (GEE), com erros assumindo distribuição Gama e matriz de covariância com estrutura independente. O teste *post hoc* utilizado foi o Bonferroni para comparações dois a dois com 5% de significância. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão médio.

#### 4.2.5.4 Quantificação de IL-1 $\beta$ plasmática

A quantificação de IL-1 $\beta$  plasmática foi realizada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando-se kit comercial específico (PeproTech®), seguindo as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir.

Em placa de 96 poços, cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo de captura ( $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A placa foi selada e incubada a temperatura ambiente durante a noite. Os poços foram aspirados para remoção do líquido e lavados 4 vezes pela adição de 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem. Após a lavagem, a placa foi invertida sobre papel toalha para remoção do tampão residual. A cada poço foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de tampão de bloqueio. Após pelo menos 1 h a temperatura ambiente, os poços foram aspirados e lavados 4 vezes. Cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  de padrão (diluições com diversas concentrações) ou amostra (previamente diluída sempre que necessário). A placa foi incubada a temperatura ambiente por pelo menos 2 h. Após nova aspiração e lavagem, cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo de detecção ( $0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Procedeu-se incubação a temperatura ambiente por 2 h. Após aspiração e lavagem, cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  de conjugado avidina-HRP (diluído a 1:2000). Após incubação a temperatura ambiente por 30 min, seguida por aspiração e lavagem, acrescentou-se a cada poço 100  $\mu\text{L}$  de substrato líquido ABTS. A placa foi incubada a temperatura ambiente para desenvolvimento de cor, o qual foi monitorado a 405 nm com leitor de placas de ELISA. A concentração de IL-1 $\beta$  nas amostras foi determinada a partir da curva padrão construída.

#### 4.2.5.5 Avaliação histológica da articulação tibiofemoral

Após as articulações dissecadas permanecerem em paraformaldeído tamponado  $40 \text{ mg.mL}^{-1}$  (pH 7,4) (GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012; NOVAES *et al.*, 2015) durante 48 h para fixação, foram submetidas ao processo de descalcificação, conforme descrito a seguir. As peças anatômicas foram submersas em solução constituída por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (0,7 g), tartarato de sódio e potássio (8 g), tartarato de sódio (0,14 g), ácido clorídrico (120 mL) e água purificada (900 mL). Após 24 h, as amostras foram rinsadas com água purificada e transferidas para solução aquosa de EDTA  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  (LIU *et al.*, 2017), na qual permaneceram por 45 dias para completa descalcificação. Durante tal período, a solução de EDTA  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi renovada duas vezes por semana. O processo de descalcificação foi finalizado quando os ossos não mais ofereceram resistência à penetração de uma agulha intradérmica. Após a descalcificação, as articulações foram lavadas com água purificada, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina de forma que o eixo longitudinal do fêmur ficasse em orientação vertical. Os blocos foram seccionados com 4  $\mu\text{m}$  de espessura, corados com hematoxilina e eosina e montaram-se as lâminas histológicas

(SEQUETTO *et al.*, 2017). Os cortes foram observados em fotomicroscópio de campo claro, usando lentes objetivas de 40x.

A histopatologia da cartilagem e da cápsula articular foi avaliada pela observação de sinais evidentes de inflamação (celularidade tecidual), hipertrofia/hipotrofia celular, e degeneração cartilágnea (*pannus*). A partir das observações histopatológicas estabeleceu-se o escore da gravidade da lesão articular, segundo os seguintes critérios (ADAN *et al.*, 2013): grau 1= nenhuma alteração detectável; grau 2= alterações leves; grau 3= alterações moderadas; grau 4= alterações intensas; grau 5= alterações graves (completa degeneração).

A histomorfometria articular foi avaliada pela determinação da espessura da cartilagem, da densidade de número (QA) de condrócitos e sinoviócitos e da distribuição de células intersticiais/inflamatórias na sinóvia. Para a determinação da espessura média utilizou-se ferramenta de medida linear aplicada às extremidades e no centro da cartilagem do fêmur e da tíbia. Para cálculo do QA de condrócitos e QA de sinoviócitos aplicou-se a fórmula estereológica  $QA = \sum c/At$ ; em que  $\sum c$  representa o somatório do número de células de interesse e  $At$ , a dimensão da área de teste utilizada ( $25 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ). A morfologia foi avaliada mediante a observação de 15 campos histológicos aleatórios por animal e sua análise quantitativa foi obtida com auxílio do programa de análises de imagens Image-Pro plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) (NOVAES *et al.*, 2015).

Para a análise estatística, os dados paramétricos foram submetidos a Anova seguida pelo pós-teste de Newman-keuls, empregando-se o software GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal, utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2018) usando o pacote Agricolae (DE MENDIBURU, 2017).

## 5. RESULTADOS

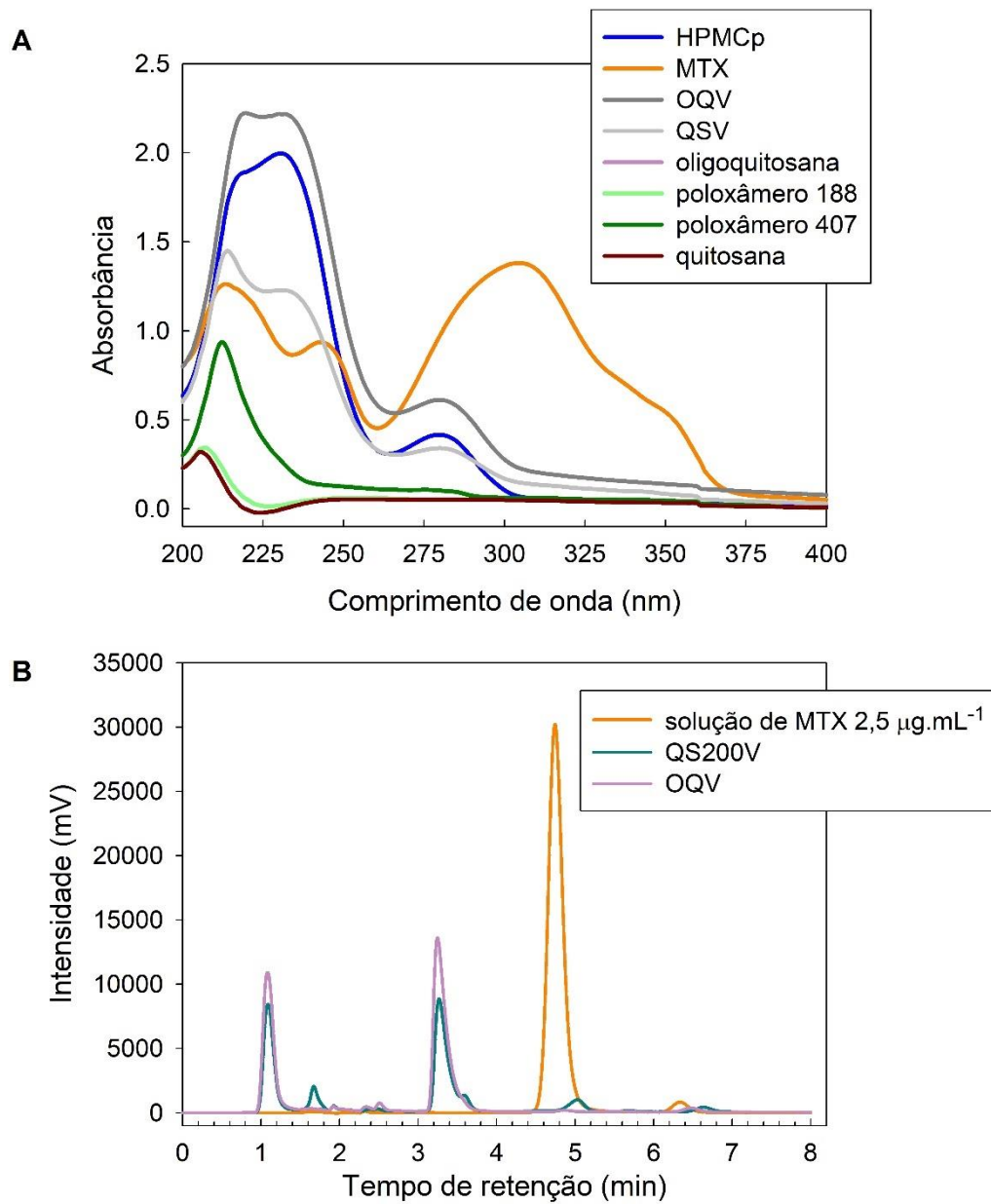
Os resultados serão apresentados de forma a facilitar a correlação entre eles e a compreensão do todo. Por esse motivo, algumas subseções apresentadas na metodologia, aqui terão seus desfechos reunidos.

### 5.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE MTX

A pesquisa de seletividade mostrou que todos os excipientes empregados nas formulações apresentaram absorção no UV inferior a 4,8% daquela apresentada por MTX a 306 nm (FIGURA 15-A). A absorção apresentada pelos poloxâmeros foi considerada não importante porque a única caracterização de hidrogéis dependente de quantificação do MTX foi o estudo de liberação *in vitro*, durante o qual os polímeros não atravessariam a membrana de celulose e, portanto, não alcançariam significativamente as amostras a serem quantificadas. Com relação aos PECs, a absorção foi considerada relevante e capaz de produzir interferência, tanto que as absorções de QSV e OQV corresponderam a 10,5% e 16% da absorção do MTX, respectivamente. Como além da liberação de fármaco *in vitro*, os PECs também teriam sua EE caracterizada, a qual seria realizada mediante análise do sobrenadante de PECs centrifugados, foi necessário garantir que o método de quantificação desenvolvido impediria a interferência das formulações vazias.

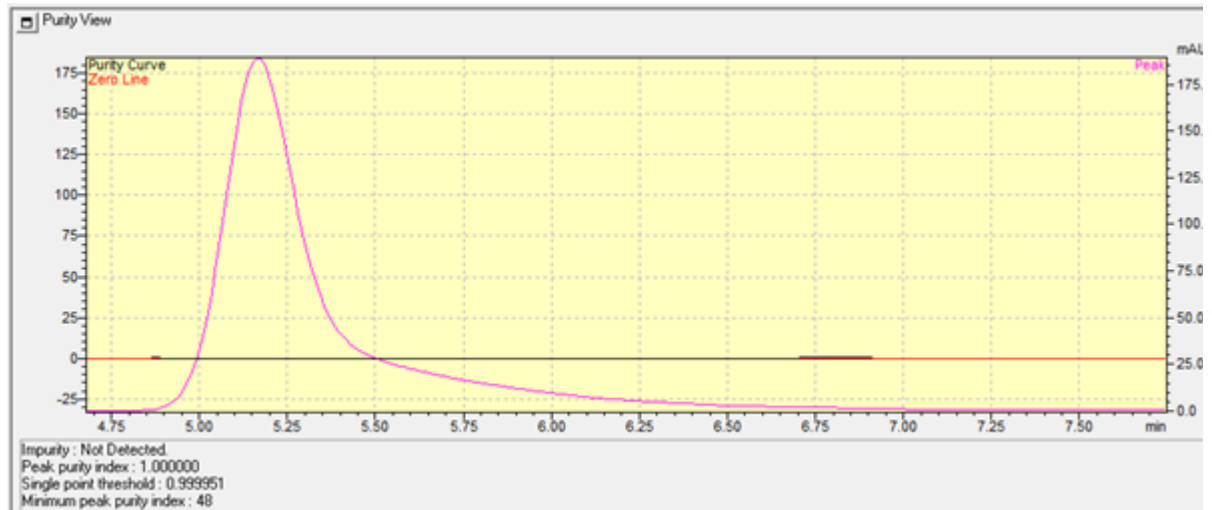
Constatou-se que o método cromatográfico pode ser aplicado para quantificação de MTX no sobrenadante de dispersões de PECs. Sob as condições de análise aqui descritas, o MTX elui com tempo de retenção entre 4,6 e 4,9 minutos, quando nenhum composto é detectado quando os PECs vazios são analisados (FIGURA 15-B). Foi possível constatar a pureza do pico no tempo de retenção do MTX (FIGURA 16) a partir da análise do sobrenadante de QS200 submetida a centrifugação (14000xg, por 1,5 h).

Figura15 – Perfis de absorção no UV de excipientes e PECs vazios (A) e cromatogramas de solução de MTX e PECs vazios (B)



Legenda: HPM Cp= ftalato de hidroxipropil metilcelulose; MTX= metotrexato; PECs= complexos polieletrólíticos Fonte: DO AUTOR (2019)

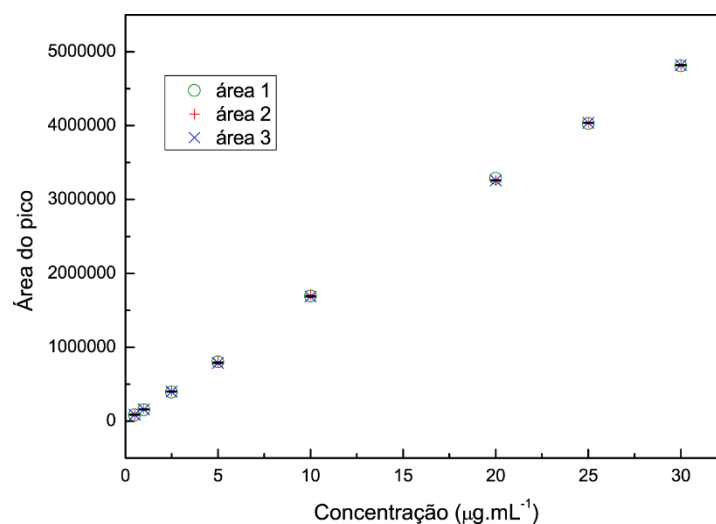
Figura 16 - Pureza do pico de MTX, após análise cromatográfica do sobrenadante de QS200, com detecção a 306 nm



Legenda: MTX= metotrexato  
 Fonte: DO AUTOR (2019)

A Figura 17 apresenta os valores de área do pico plotados em função da concentração das soluções de MTX, quando analisadas por CLAE, sob as condições relatadas na metodologia de validação do método.

Figura 17 - Plotagem das áreas de pico em função da concentração de soluções de MTX, analisadas por CLAE\*

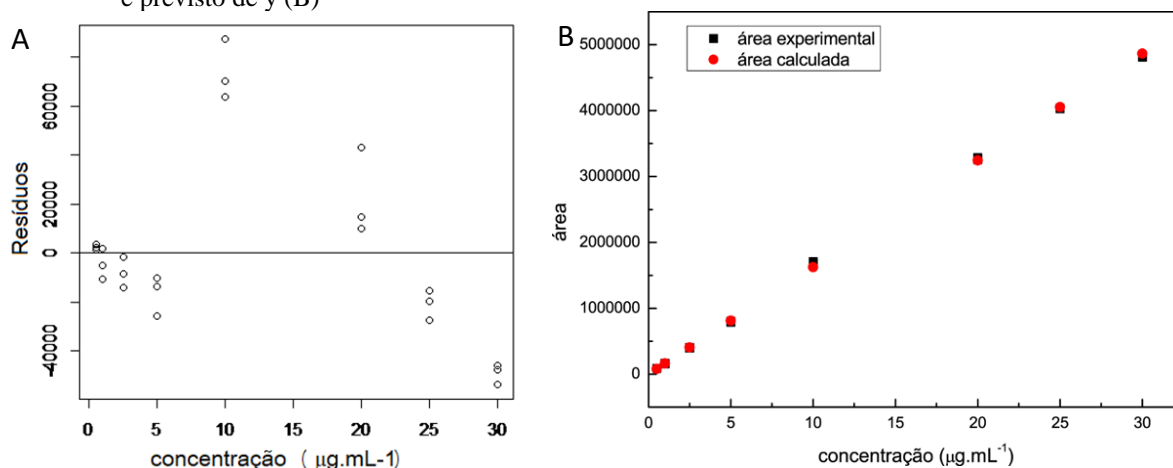


Legenda: CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; MTX = metotrexato; \*condições de análise: coluna C18 150x46 mm (partículas c/5 µm de diâmetro), fase móvel: solução tampão acetato pH 4,3:metanol:acetonitrila 77:16:7 (v/v/v) com vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 50 µL, detecção a 306 nm. Fonte: DO AUTOR (2018)

Como pode-se observar houve linearidade visual. O Teste de Cochran revelou  $C = 0,764$ , valor superior ao  $C_{\text{tabelado}}$  (0,516), o que demonstra a distribuição heterocedástica, ou seja, a variância das áreas do pico aumenta com o aumento da concentração. Portanto, a curva de calibração foi obtida efetuando-se ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados resultando em: equação da reta:  $y = 162062,4x + 2885,9$ ,  $R^2 = 0,9996$  e  $r = 0,9998$ , indicando boa correlação entre as variáveis.

O Teste F atestou a significância do coeficiente angular ( $F_{\text{calculado}} = 5,257 \cdot 10^4$ ), o valor de  $p$  foi  $< 2,2 \cdot 10^{-16}$ , indicando a adequação do modelo de regressão aplicado. A Figura 18-A apresenta a plotagem dos resíduos ao redor do eixo x. Embora a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear não tenha sido próxima de zero ( $2,5474 \cdot 10^9$ ) e o teste de Shapiro-Wilk não tenha atestado a normalidade da distribuição dos resíduos ( $P = 0,02149$ ), a plotagem simultânea da área prevista e a área obtida na análise (FIGURA 18-B) demonstrou que os valores calculados a partir da equação são praticamente coincidentes com os valores experimentais.

Figura 18 – Plotagem dos resíduos de y em torno do eixo x (A) e plotagem simultânea dos valores experimental e previsto de y (B)



Fonte: DO AUTOR (2018)

Além de linear, o método demonstrou exatidão entre 99,0 e 103,1%. De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2017), o ensaio de verificação da exatidão deve ser realizado a partir de soluções simples da substância química de referência quando o método destina-se à aplicação em insumos farmacêuticos, ou a partir da matriz da formulação contaminada com concentrações conhecidas da substância química de referência quando o método destina-se a ser aplicado em produto acabado. Neste trabalho, o método analítico teve por finalidade quantificar o fármaco liberado da formulação e/ou o fármaco livre, não encapsulado, não

visando quantificar o MTX presente nas formulações. Por isso, a exatidão foi determinada a partir de soluções de MTX, como descrito na metodologia. A partir de amostras dos PECs vazios QS200V e OQV, contaminados com concentração conhecida de MTX, a recuperação foi de 99,3% e 95,04%, respectivamente.

Encontrou-se uma precisão intradia muito favorável (TABELA 1), com DPR máximo de 1,33%. A precisão interdia variou de 1,62 a 2,94%. A legislação vigente estabelece que os limites aceitáveis para tais parâmetros devem ser justificados de acordo com o objetivo do método e sua variabilidade intrínseca, a concentração de trabalho e a concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Tabela 1 - Resultados para a determinação de exatidão e precisão intra e interdia do método de quantificação de MTX por CLAE

Ensaio	c.t. ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	c.e. ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		Precisão (%)	Exatidão (%)
		M	DP		
Intradia	0,5	0,515	0,007	1,33	103,1
	20,0	20,139	0,110	0,55	100,7
	30,0	29,698	0,026	0,09	99,0
Interdia	0,5	0,507	0,015	2,94	101,3
	20,0	20,491	0,332	1,62	102,5
	30,0	30,341	0,520	1,71	101,1

Legenda: c.t. = concentração teórica; c.e. = concentração experimental; M = média; DP = desvio padrão; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência  
Fonte: DO AUTOR (2018)

O principal objetivo deste método é possibilitar a comparação entre diferentes amostras quanto à capacidade de incorporação do fármaco pelos sistemas e a seu perfil de liberação, norteando assim a triagem das formulações durante seu desenvolvimento. Considerando que apenas variações muito notáveis de desempenho são úteis para definir entre uma ou outra amostra, entende-se que o método a ser empregado não necessita uma precisão tão alta quanto a suficiente para controle de qualidade, por exemplo.

Além dos erros de preparo de amostra, o método está sujeito às variações do equipamento, como flutuações no funcionamento do injetor de amostra, das bombas que propulsionam a fase móvel, da temperatura de análise, uma vez que o equipamento não conta com forno para coluna, e do desempenho da lâmpada do detector. Embora tais inconvenientes provavelmente contribuam para diminuir a precisão intermediária, com certeza não são

limitantes, haja visto a quantidade de metodologias analíticas por CLAE validadas para quantificação de analitos diversos.

Como a legislação em vigor (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL), 2017) não especifica o DPR máximo aceitável de acordo com a concentração do analito na amostra e nem com a concentração de trabalho. Na ausência de um parâmetro de comparação, optou-se por avaliar a precisão intermediária pelo teste t de student, conforme sugerido na consulta pública que precedeu a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL), 2016). À concentração de  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , análises efetuadas em 6 dias diferentes apresentaram  $p > 0,05$ , ou seja, houve igualdade estatística presumindo amostras com variâncias equivalentes. Para as concentrações de 20 e  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , observou-se igualdade entre alguns dias mas diferença entre outros. A falta de reprodutibilidade perfeita não invalida completamente a aplicação do método. Como foram demonstradas linearidade, exatidão e repetibilidade perfeitamente aceitáveis, uma alternativa coerente seria quantificar as amostras a partir de curva de calibração construída para cada dia de análise.

O LQ e LD determinados foram  $0,0178 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,0058 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO DOS PECs

O desempenho dos PECs como carreadores para fármacos é dependente de suas características físico-químicas, as quais variam de acordo com o processo de obtenção, a composição e atributos de suas matérias-primas. Portanto, os resultados apresentados nesta subseção facilitarão a compreensão dos resultados de liberação *in vitro* e da prova de princípio em modelo animal.

### 5.2.1 Caracterização da quitosana

O grau de desacetilação (GD) da quitosana pode interferir no tamanho das nanopartículas com elas obtidas (DING *et al.*, 2019; FURLANI *et al.*, 2019; SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017), na interação desses carreadores com as células do sistema imune e na resposta deflagrada por tal interação (FURLANI *et al.*, 2019). O GD foi determinado para se

confirmar as especificações do fornecedor, pois nem sempre há coerência entre valor determinado e o rotulado (SANTOS *et al.*, 2003). As propriedades físico-químicas da quitosana, além de serem diretamente influenciadas pelo GD, também podem variar em função da massa molar média. Portanto, tal parâmetro também foi determinado.

#### 5.2.1.1 Determinação do grau de desacetilação

Para determinação do grau de desacetilação, utilizaram-se os dados obtidos por meio da titulação potenciométrica de uma mistura de HCl 0,1M e QS por NaOH 0,1 M, no intervalo de pH 2,4 a 3,6, para cálculo de Y', conforme descrito na seção 4.2.2.1 (TABELA 2)

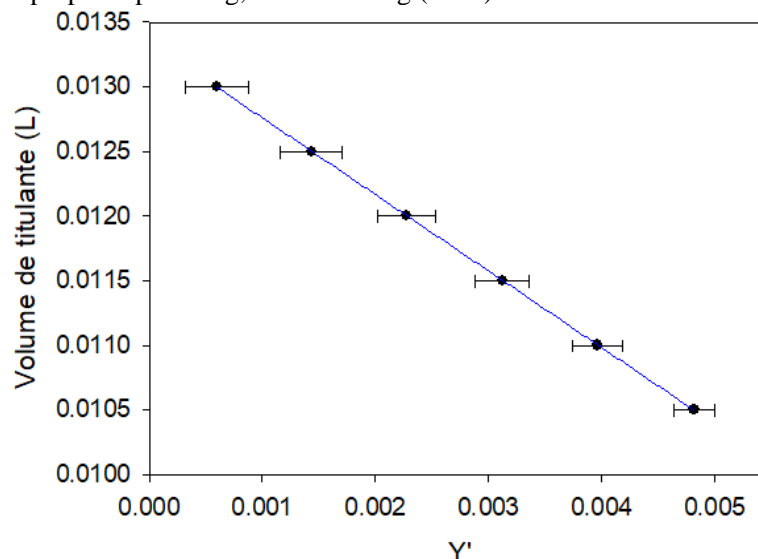
Tabela 2 - Dados obtidos pela titulação potenciométrica de quitosana segundo metodologia descrita por Jiang, Chen e Zhong (2003)

1ª titulação			2ª titulação			3ª titulação		
V (L)	pH	Y'	V (L)	pH	Y'	V (L)	pH	Y'
0,0105	2,45	0,004713704	0,0105	2,45	0,004713704	0,01	2,42	0,00502797
0,011	2,55	0,00376117	0,011	2,53	0,003938429	0,0105	2,5	0,004201093
0,0115	2,67	0,002865991	0,0115	2,63	0,003142497	0,011	2,6	0,003352146
0,012	2,82	0,002038065	0,012	2,78	0,002234694	0,0115	2,72	0,002554317
0,0125	3,05	0,001205459	0,0125	3	0,001352547	0,012	2,89	0,001734675
0,013	3,56	0,000374178	0,013	3,43	0,000504752	0,0125	3,17	0,000914434

Fonte: DO AUTOR (2017)

A plotagem dos valores de volume de titulante (V) em função de Y' originou gráfico com linearidade, como o ilustrado na Figura 19.

Figura 19 - Plotagem do volume de titulante em função de Y' para os dados obtidos a partir das titulações potenciométricas de quitosana segundo método proposto por Jiang, Chen e Zhong (2003)



Fonte: DO AUTOR (2017)

A equação da reta e o fator de correlação de *Pearson* ( $r$ ) obtidos pela plotagem de  $V$  em função de  $Y'$ , para todas as titulações, assim como o volume de equivalência ( $V_e$ ) e o GD encontrados estão apresentados na Tabela 3.

O GD determinado foi, portanto, 96,00% (valor médio das triplicatas), o qual está de acordo com o informado pelo fornecedor ( $\geq 75\%$ ). Tal parâmetro pode variar significativamente de acordo com as condições de obtenção do polímero (CANELLA; GARCIA, 2001). Possuir alto GD implica em maior solubilidade da quitosana, o que facilita seu uso na produção (MIMA *et al.*, 1983).

Tabela 3 - Resultados obtidos a partir das três titulações potenciométricas de quitosana segundo método desenvolvido por Jiang, Chen e Zhong (2003)

Parâmetros	1ª titulação	2ª titulação	3ª titulação
Equação da reta	$-0,5792x + 0,0132$	$-0,5886x + 0,0133$	$-0,6083x + 0,0131$
$r$	0,9996	0,9996	0,9999
$V_e$ (mL)	13,2	13,3	13,1
GD (%)	96,00	95,35	96,65

Legenda:  $r$  = coeficiente de correlação de *Pearson*;  $V_e$  = volume de equivalência; GD = grau de desacetilação.  
Fonte: DO AUTOR (2017)

### 5.2.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica

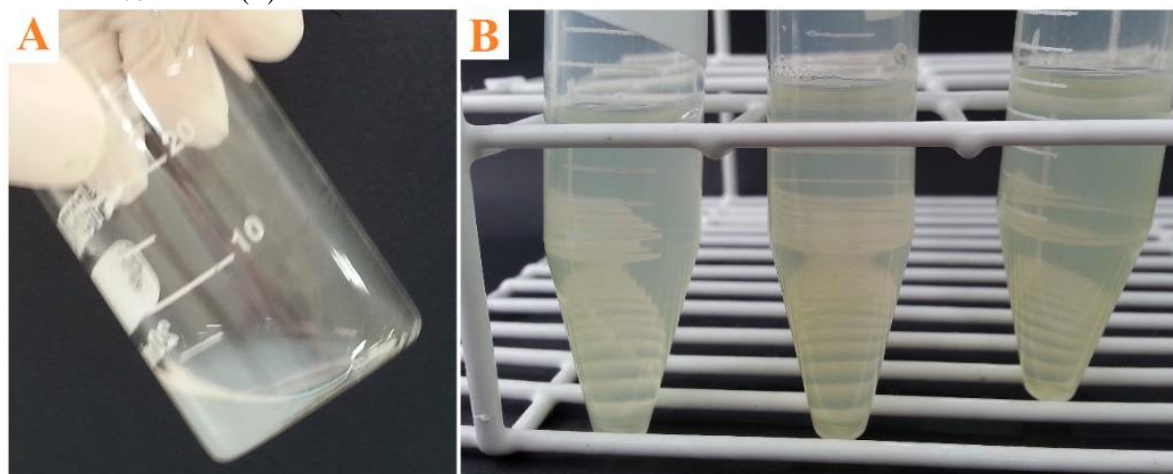
Apesar da viscosimetria não ser um método absoluto, é utilizada com frequência para determinação da massa molar de polímeros (SANTOS *et al.*, 2003). Além disso, fornece informação referencial dentro do grupo de pesquisa, para comparação entre lotes de polímeros adquiridos, uma vez que no laudo dos fornecedores não são especificados valores exatos de massa molar mas sim faixas bastante amplas de possíveis valores.

O tempo médio de escoamento da dispersão de quitosana a  $0,001 \text{ g.mL}^{-1}$  e do solvente foram, respectivamente, 36,05 s e 29,05 s. A partir de tais dados, determinou-se a massa molar viscosimétrica como  $3,04 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , a qual corresponde a médio peso.

### 5.2.2 Obtenção dos PECs

Pela técnica de complexação polieletrólítica (PATIL *et al.*, 2010) foi possível obter PECs à base de quitosana e HPMCP, ou oligoquitosana e HPMCP, contendo ou não MTX, de forma simples e de baixo custo. Independente da forma de quitosana utilizada (polimérica, ou oligomérica) e de quase todas as condições de obtenção estudadas, conforme descrito na seção 4.2.2.3, o aspecto visual característico das suspensões de PECs foi homogêneo e levemente opalescente (FIGURA 20). O diferencial se deu pela inclusão do MTX, resultando em dispersão homogênea, opalescente, porém amarela, ao invés de incolor.

Figura 20- Aspecto macroscópico de PECs de quitosana e HPMcP sem MTX (A) e PECs de oligoquitosana com MTX (B)



Legenda: PEC = complexo polieletrólítico; MTX = metotrexato; HPMcP = ftalato de hidroxipropilmetilcelulose  
 Fonte: DO AUTOR (2017)

As suspensões de PECs, logo após o processo de reticulação, apresentaram pH entre 5,5 e 6 (TABELA 4). O pH do fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide é, em média 6,6 (GOLDIE *et al.*, 1969), apresentando uma acidez correlacionada ao grau de infiltração leucocitária (WARD; STEIGBIGEL, 1978) e, portanto, dependente da atividade da patologia. Sendo assim, os PECs apresentaram um pH próximo, porém um pouco abaixo do ideal para aplicação intra-articular em pacientes com artrite reumatoide, indicando a necessidade de se monitorar a possibilidade de irritação *in vivo* e efetuar um ajuste nas formulações, se necessário.

Tabela 4 - Valores de pH das suspensões frescas de PECs

PEC	pH	PEC	pH	PEC	pH
QS	5,57 ± 0,03	QS200	5,65 ± 0,14	QSV	5,46 ± 0,01
QS50	5,54 ± 0,03	QS300	5,79 ± 0,16	OQ-7	5,87 ± 0,00
QS100	5,65 ± 0,00	QS400	5,89 ± 0,07	OQV	5,97 ± 0,03

Legenda: PECs= complexos polieletrólíticos  
 Fonte: DO AUTOR (2020)

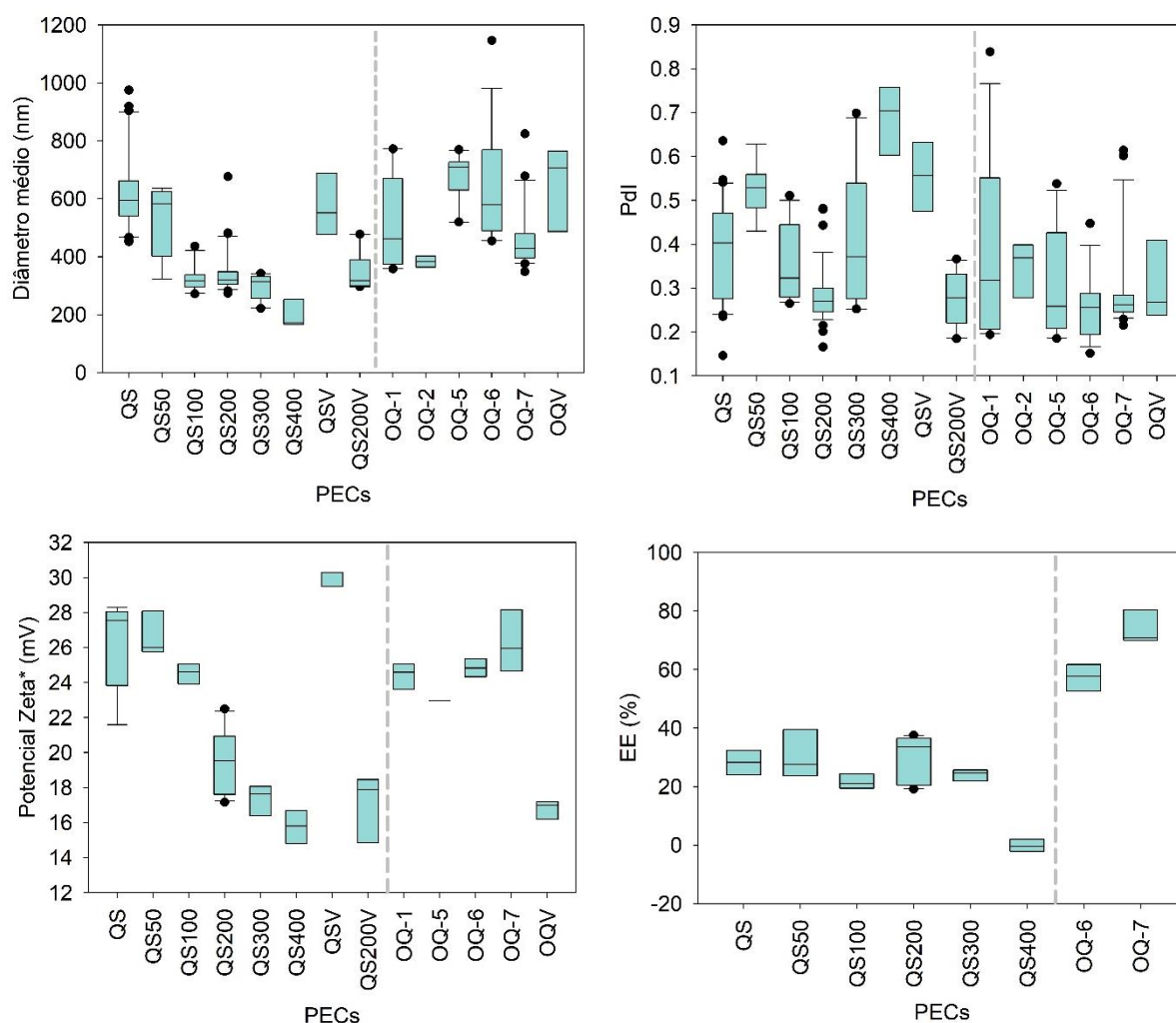
### 5.2.3 Caracterização dos PECs

Os parâmetros de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e EE são diferenciais para o desempenho de nanocarreadores, por isso foram empregados como critérios de seleção para os PECs desenvolvidos. Os resultados das caracterizações adicionais foram importantes para acessar a formação das partículas e a incorporação do fármaco nas mesmas.

#### 5.2.3.1 Determinação de tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta e EE

Os tamanhos de partícula, o PDI, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação determinados para os PECs estão apresentados na Figura 21, por meio de *box plot*, no qual estão representados a mediana, o primeiro e o terceiro quartis, os valores mínimo e máximo e os *outliers*. Os dados foram analisados separadamente para cada tipo de PEC: na subseção 5.2.3.1.1 é apresentada a análise dos dados dos PECs de quitosana polimérica, nos quais se pesquisou o efeito da adição de eletrólitos, e na subseção 5.2.3.1.2, PECs de oligoquitosana.

Figura 21 – Tamanho de partícula, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulação dos PECs desenvolvidos



Legenda: PECs= complexos polieletrólitos; Pdl= índice de polidispersão; EE= eficiência de encapsulação; \*= determinado no meio de obtenção dos PECs; a linha pontilhada separa os PECs constituídos por quitosana (à esquerda) e por oligoquitosana (à direita). A média não está representada.

Fonte: DO AUTOR (2020)

### 5.2.3.1.1 PECs de quitosana polimérica e estudo do efeito da adição de eletrólitos

QS, que se refere aos PECs obtidos por meio da reticulação polieletrólítica entre quitosana polimérica e HPMCP, carregados com MTX, apresentou tamanho de partícula  $625 \pm 137$  nm, Pdl de  $0,388 \pm 0,115$ , zeta  $+26 \pm 3$  mV e EE de  $28,2 \pm 4,5\%$ . A incorporação de MTX aos PECs não alterou o tamanho ( $P > 0,05$ ), mas reduziu ( $P < 0,05$ ) o Pdl e o potencial zeta, visto que os valores de QSV para os dois últimos parâmetros foram  $0,539 \pm 0,124$  e  $+30 \pm 1$  mV, respectivamente.

O tamanho de partícula está entre os fatores que mais influenciam a internalização de um nanocarreador (BARAR, 2015; SHANG *et al.*, 2014; SHANG; NIENHAUS; NIENHAUS, 2014), o que torna interessante o controle de tamanho de partícula e a redução da polidispersão. Sabe-se que tais parâmetros podem ser influenciados pela adição de eletrólitos (ANTONIOU *et al.*, 2015; CHAE; SHIN; SHIN, 2018; HUANG; LAPITSKY, 2011; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012; SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017; YANG *et al.*, 2018b). Portanto, decidimos pesquisar o possível efeito que a adição de NaCl teria sobre os PECs de quitosana. Os parâmetros analisados foram tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, EE, cujos resultados estão apresentados abaixo, e o perfil de liberação *in vitro* de MTX, apresentado na seção 5.4.

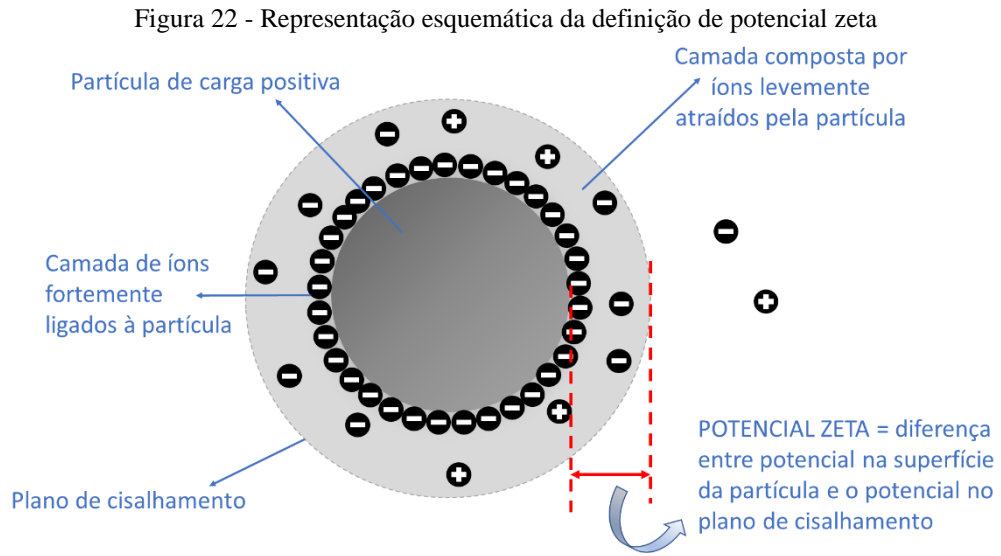
O aumento da força iônica diminuiu significativamente o tamanho de partícula, que chegou a  $197 \pm 56$  nm em QS400. A modulação de tamanho de partícula por meio da adição de NaCl ao meio de obtenção foi previamente relatada, sendo que em alguns casos a adição de eletrólitos promoveu redução (ANTONIOU *et al.*, 2015; CHAE; SHIN; SHIN, 2018; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012; YANG *et al.*, 2018b) e em outros, aumento (ANTONIOU *et al.*, 2015; HUANG; LAPITSKY, 2011; SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017). Uma das explicações propostas para redução de tamanho seria o fato dos íons salinos promoverem uma blindagem parcial dos grupamentos carregados dos polímeros, diminuindo a repulsão entre eles e fazendo com que a cadeia polimérica adquira uma conformação mais flexível e assim favoreça a obtenção de partículas menores (DAUTZENBERG, 1997; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012). Outro fator que poderia explicar a redução de tamanho seria que quando as partículas são obtidas em meio salino, a diferença de pressão osmótica entre o interior dos PECs e o meio externo é menor (DING *et al.*, 2019), diminuindo a propensão a intumescimento.

A adição de eletrólito influenciou também o PDI, tanto aumentando como diminuindo, sendo que a menor polidispersão foi observada com o uso de NaCl  $11,688 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $0,285 \pm 0,067$  para QS200 e  $0,276 \pm 0,060$  para QS200V). A oscilação aleatória do PDI em função da variação na concentração de eletrólitos também foi observada por outros autores (SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017). A presença dos eletrólitos no meio enfraquece a interação eletrostática (FU; SCHLENOFF, 2016), isso faz com que a complexação eletrolítica ocorra de forma mais lenta e a agregação das partículas primárias seja evitada (HUANG; LAPITSKY, 2011; LAPITSKY, 2014). Entretanto, quando a força iônica se torna excessiva, a formação das

partículas pode ser comprometida (HUANG; LAPITSKY, 2011, 2017; SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017) com consequente aumento da polidispersão.

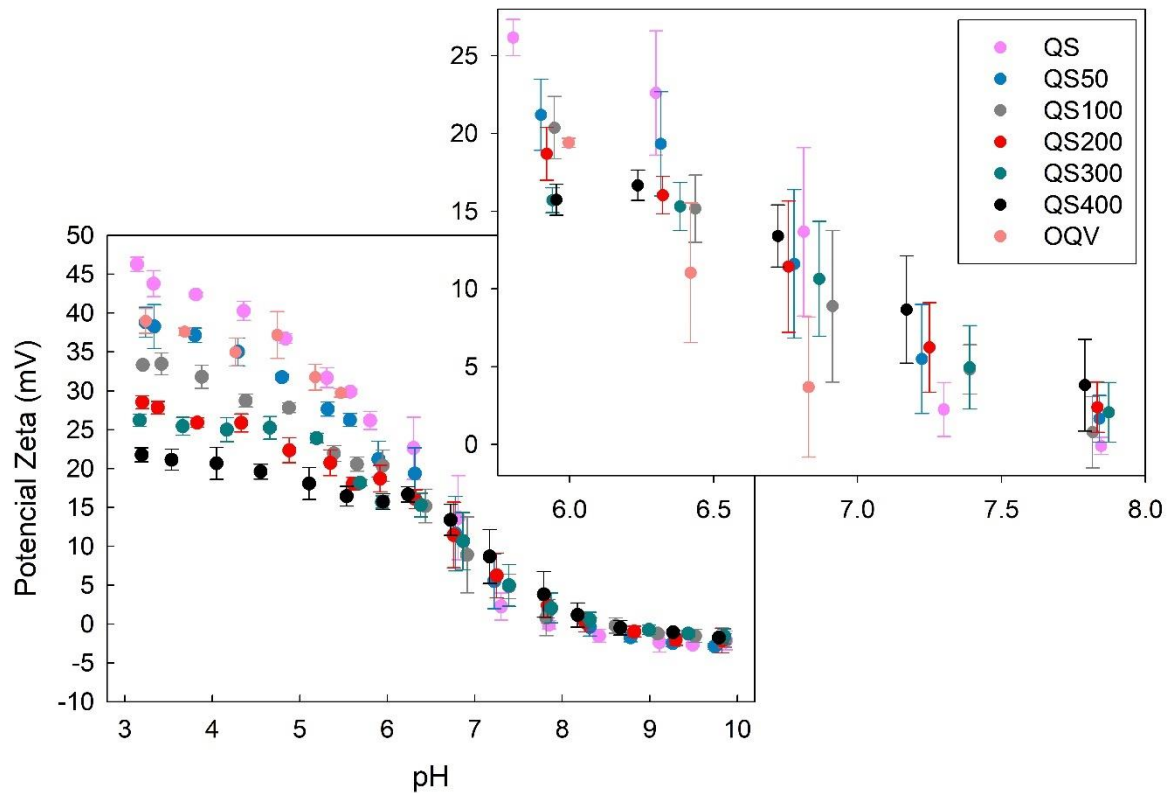
Além do tamanho de partícula e da polidispersão, o potencial zeta também é um parâmetro físico-químico relevante em sistemas coloidais. Quando a partícula se encontra dispersa em um meio polar, grupamentos químicos presentes em sua superfície podem se ionizar, de acordo com o pH do sistema, conferindo-lhe uma carga superficial. Íons de carga oposta tendem a circundar as partículas e se manterem fortemente unidos a ela. Tais íons influenciam os íons da circunvizinhança, até uma certa distância, e faz com que eles acompanhem a partícula se movimentando no meio de dispersão, embora não estejam fortemente ligados a ela. Ocorre assim a formação de uma dupla camada elétrica em torno da partícula, uma mais coesa e outra difusa. O potencial zeta é a diferença de potencial entre a superfície da partícula e o limite externo da dupla camada elétrica que envolve a partícula (FIGURA 22). Quanto maior seu valor em módulo maior será a repulsão entre as partículas e, conseqüentemente, menor a tendência de aglomeração (SALOPEK; KRASI; FILIPOVIC, 1992).

O efeito da adição de eletrólitos sobre o potencial zeta depende da faixa de pH analisada (FIGURA 23). Em pH 5,6 a 5,9, que corresponde ao meio onde as partículas são obtidas, o potencial zeta variou de +31 mV (QSV) a +16 mV (QS400), sendo que quanto maior a concentração de NaCl, menor foi o potencial zeta. Esse intervalo de potencial é suficiente para conferir aos PECs estabilidade coloidal média (SALOPEK; KRASI; FILIPOVIC, 1992). À medida em que o pH diminuiu, a redução de potencial provocada pelo NaCl tornou-se mais pronunciada. Entretanto, a elevação do pH reduz o potencial zeta em geral e inverte a tendência de influência do NaCl, sendo que em pH fisiológico (7,4), o potencial mais alto foi encontrado para QS400 (+8 mV).



Fonte: adaptado de MALVERN (2004)

Figura 23- Variação de potencial zeta em função do pH apresentada por PECs de quitosana com diferentes concentrações de eletrólitos



Legenda: PECs= complexos polieletrólíticos. Fonte: DO AUTOR (2020)

A EE, que representa o percentual de fármaco efetivamente incorporado ao carreador, foi equivalente para QS, QS50, QS100, QS 200 e QS300 ( $31,9 \pm 11,7$  a  $24,1 \pm 2,1\%$ ), enquanto a de QS100 foi menor ( $21,6 \pm 2,7\%$ ). QS400 não incorporou fármaco, o que pode ter sido decorrente da má formação das partículas em presença da alta concentração de NaCl (HUANG; LAPITSKY, 2011, 2017; SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017), como também foi indicado pelo alto PDI apresentado por tal amostra. Após o desenvolvimento dos PECs aqui descritos, foi publicada a obtenção de PECs de quitosana e ácido hialurônico, carregados com metotrexato a 5% em relação aos polímeros e revestidos ou não por HPMCP, os quais apresentaram eficiência de encapsulação de  $37,4 \pm 3,8\%$  e  $30 \pm 1,2\%$ , respectivamente (BONI *et al.*, 2018a), o que é próximo aos valores obtidos para QS50 e QS200.

O estudo do efeito da adição de eletrólitos sobre as características físico-químicas levou à seleção de QS200 como o melhor entre os PECs de quitosana polimérica. A utilização de NaCl a  $11,688 \text{ mg.mL}^{-1}$  nas dispersões poliméricas propiciou a obtenção de partículas consideravelmente menores em relação à formulação original (QS), com menor polidispersão e eficiência de encapsulação equivalente. Embora QS 200 tenha menor potencial zeta que QS em seu meio de síntese, essa desvantagem não existe em pH fisiológico.

#### 5.2.3.1.2 PECs de oligoquitosana

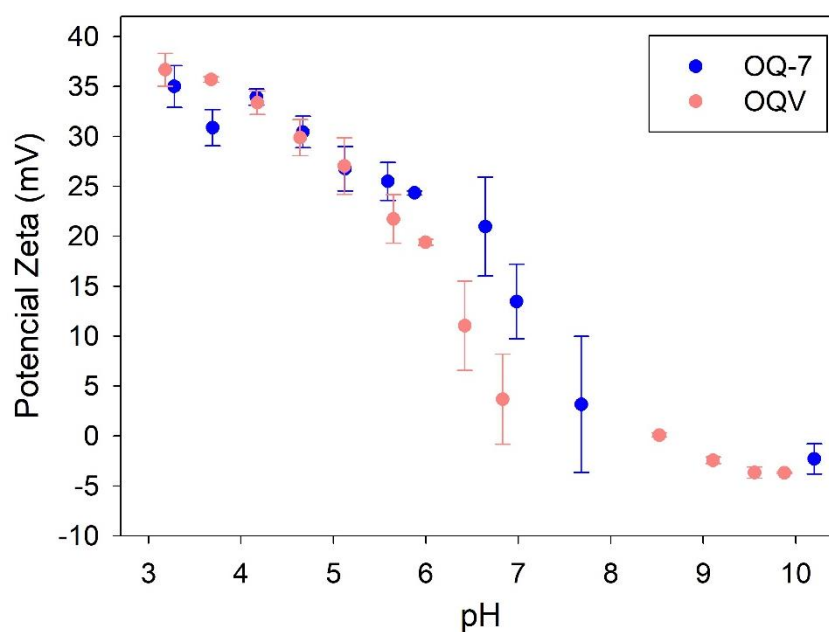
A forma oligomérica da quitosana, oligoquitosana, apresenta hidrossolubilidade independentemente do pH do meio o que a torna vantajosa em relação a seu polímero de origem, por simplificar o processo de obtenção e possivelmente aumentar a compatibilidade dos produtos com os fluídos corpóreos. Por esse motivo PECs obtidos com oligoquitosana também foram avaliados.

As partículas de oligoquitosana apresentaram tamanho de  $677 \pm 81 \text{ nm}$  (OQ-5) a  $383 \pm 19,6 \text{ nm}$  (OQ-2), sendo que OQ-1, OQ-2 e OQ-7 foram significativamente menores que OQ-5, OQ-6 e OQV e maiores que QS200. Todos os PECs de oligoquitosana apresentaram a mesma polidispersão, a qual ficou entre  $0,348 \pm 0,063$  (OQ-2) e  $0,298 \pm 0,108$  (OQ-7). Portanto, ficou evidente que a força iônica, o pH da dispersão de HPMCP e o meio de dispersão da oligoquitosana não influenciaram o tamanho e o PDI das partículas de oligoquitosana.

O aumento da concentração de MTX em relação à massa polimérica de 5% para 10 ou 20% melhorou a estabilidade coloidal das suspensões de PECs, pois os potenciais zeta de OQ-5, OQ-6 e OQ-7 foram  $+23 \pm 0,8$ ,  $+25 \pm 0,5$  e  $+26 \pm 1,8$ , respectivamente, no meio de obtenção das partículas. Constatou-se que a presença de MTX nos PECs de oligoquitosana provocou uma elevação do potencial zeta na faixa de pH compreendida entre 6 e 8, mas a diferença entre os PECs carregados e vazios não foi pronunciada em outras regiões da escala de pH (FIGURA 24).

OQ-6 e OQ-7 apresentaram EE de  $57,3 \pm 4,6$  e  $74,3 \pm 5,8\%$ , respectivamente, portanto significativamente superiores à das partículas de quitosana.

Figura 24 - Variação de potencial zeta em função do pH apresentada por OQ-7 e OQV



Fonte: DO AUTOR (2019)

### 5.2.3.2 Seleção dos PECs com base no tamanho, polidispersão e EE

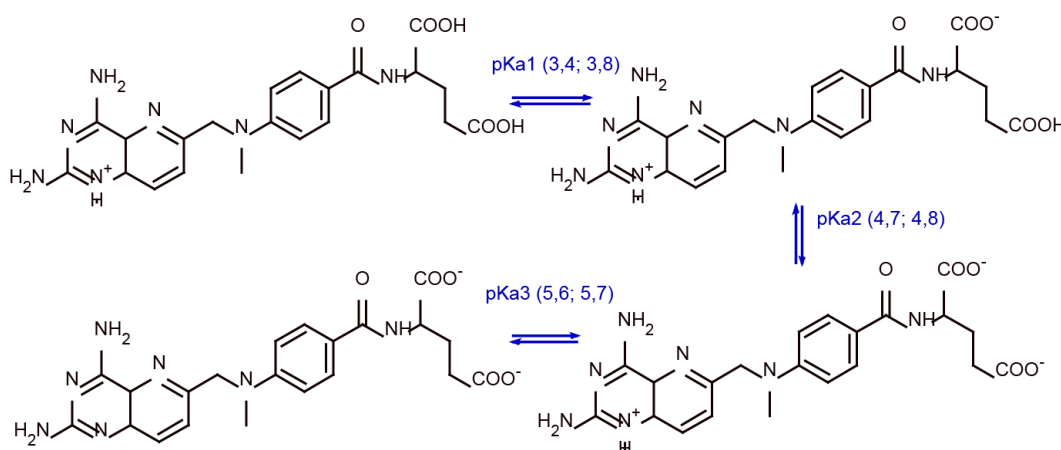
Comparando-se a quitosana polimérica com a oligomérica, QS200 foi menor que OQ-7, o que representa uma vantagem, e ambas apresentaram a mesma polidispersão. Entretanto, OQ-7 apresentou maior potencial zeta que QS200, o que pode significar ganho no que se refere

a estabilidade coloidal. Além disso, a capacidade de incorporação de MTX em OQ-7 foi 2,5 vezes a exibida por QS200, o que a tornou a mais promissora entre os PECs desenvolvidos.

Os resultados apontaram que a combinação de duas condições foi determinante para obtenção de melhor eficiência de encapsulação: o meio de dispersão de quitosana associada a maior concentração total de fármaco na formulação. Quando a oligoquitosana foi dispersa em água e empregou-se MTX a 20% em relação à massa polimérica (OQ-7), o percentual de fármaco incorporado foi estatisticamente superior aos encontrados em todos os PECs obtidos com quitosana polimérica dispersa em ácido acético  $6,005 \text{ mg.mL}^{-1}$  pH 5,5 e carregados com MTX a 5% em relação ao total de polímeros (QS200, QS300, QS100, QS e QS50).

A vantagem do uso da forma oligomérica de quitosana em relação à polimérica é decorrente da possibilidade de dispersá-la em água. Como a quitosana polimérica precipita acima de pH 6, a complexação polieletrólítica de tal polímero com HPMCP só é possível em um pH que não coincide com a melhor faixa de solubilidade do MTX, ou seja, quando a maioria de suas moléculas se encontram com carga efetiva -2 em decorrência da desprotonação das duas carboxilas e do nitrogênio aromático não protonado (FIGURA 25). Diferentemente do polímero catiônico, a oligoquitosana é hidrossolúvel possibilitando a obtenção em pH mais favorável à solubilização do fármaco e, portanto, à sua encapsulação.

Figura 25 - Formas iônicas de metotrexato prevalentes nas diferentes faixas de pH



Fonte: adaptado de MIODUSZEWSKA *et al.* (2017)

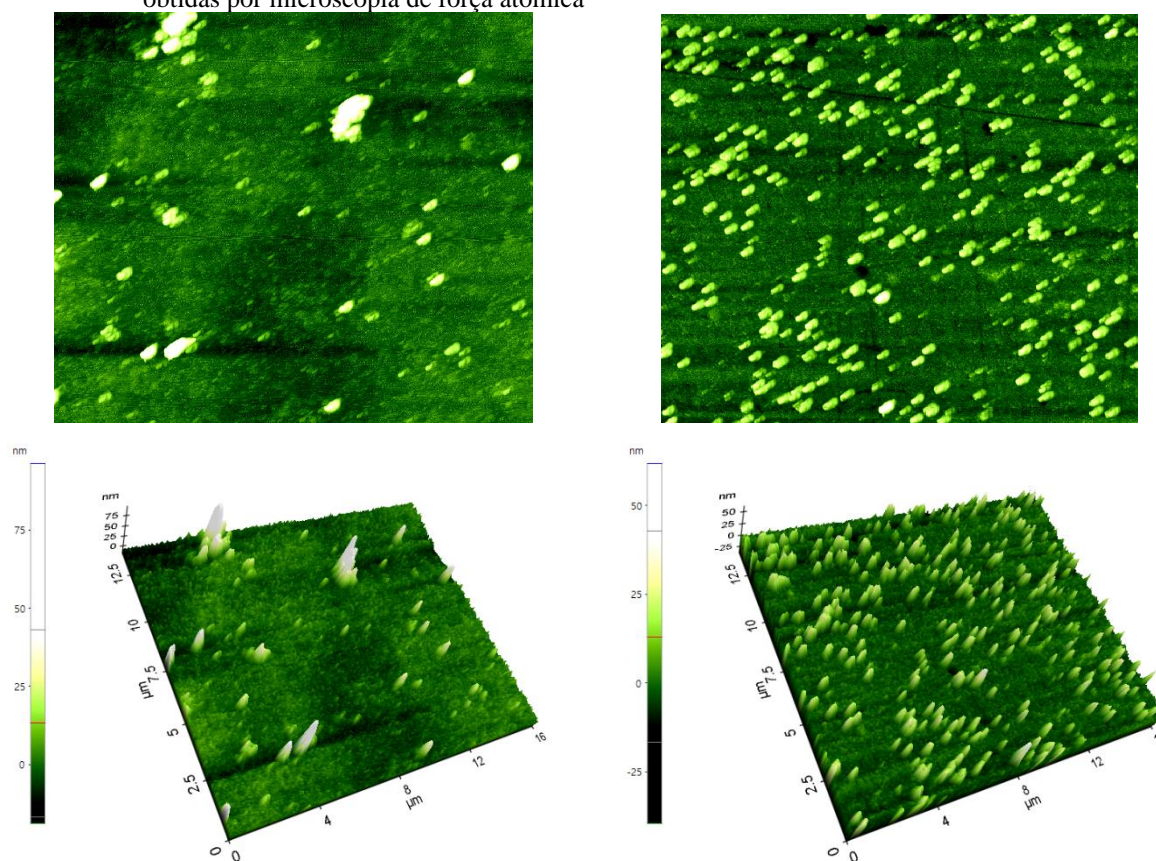
Tendo em vista estes resultados, os sistemas QS200 e OQ-7 foram selecionados para caracterização por microscopia de força atômica, espectroscopia de absorção no IV e análise

térmica (análises que foram feitas também com os respectivos PECs vazios, QS200V e OQV) e para incorporação a hidrogéis.

### 5.2.3.2 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica foi realizada a fim de se obter a imagem topográfica dos PECs. A Figura 26 exibe as imagens obtidas de QS200 e OQ-7.

Figura 26 - Imagens\* de PECs de quitosana (à esquerda) e oligoquitosana (à direita) carregados com MTX, obtidas por microscopia de força atômica



Legenda: PEC = complexo polieletrólítico; \* resolução: 512x512, tamanho: 16x13,6  $\mu\text{m}$   
 Fonte: DO AUTOR (2018)

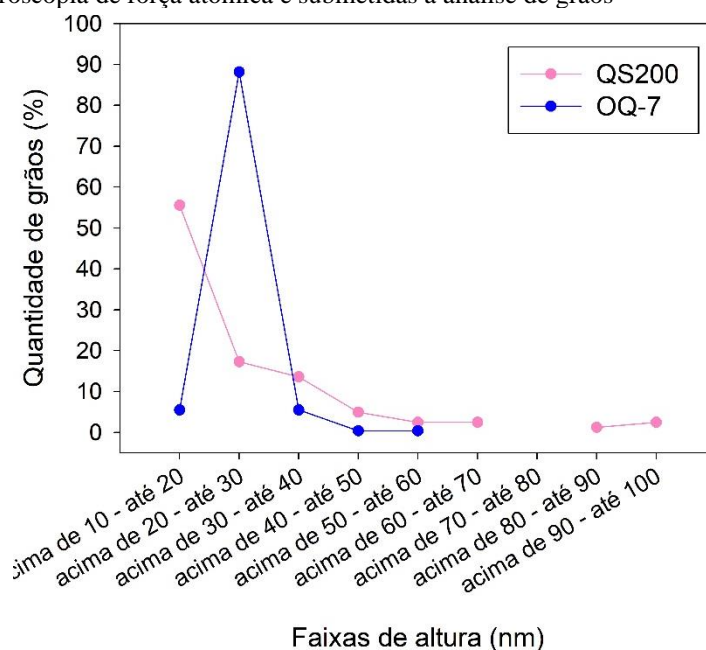
Foram relatadas na literatura partículas de quitosana complexada com TPP, de formato claramente circular (AI; LIAO; REN, 2017), evidenciado por microscopia de força atômica e de transmissão eletrônica. Em comparação com os resultados aqui apresentados, nota-se que a análise de QS200 e OQ-7 por microscopia de força atômica não permitiu concluir a respeito da

morfologia das partículas. Em OQ-7 os PECs parecem muito mais dispersos, com pouca agregação. Cumpre ressaltar que em OQ-7 o polímero aniônico HPMCP encontra-se complexado com a forma oligomérica de quitosana, a qual possui apenas dois grupos amina disponíveis para interação eletrostática e que, portanto, tendem a se complexar com apenas uma cadeia polimérica de HPMCP. Um raciocínio análogo pode ser feito para uma partícula de quitosana com TPP, na qual o contra-íon aniônico mais provavelmente se complexa com apenas uma cadeia polimérica catiônica.

Em uma partícula formada pela interação de dois polímeros, nos quais muitos grupos ionizáveis se distribuem ao longo de ambas cadeias, provavelmente há muitos pontos livres para interagirem com partículas vizinhas aumentando a probabilidade de agregação. É plausível que isso justifique o aspecto apresentado por QS200, onde visualiza-se um número maior de aglomerados, conferindo aspecto mais irregular aos PECs.

Por análise de grãos realizada a diferentes alturas, a partir de 10 nm, evidenciou-se que QS200 é menor que OQ-7 e tende a se aglomerar (FIGURA 27). Quando a altura das amostras foi nivelada a 10 nm, 88,2% dos grãos observados em OQ-7 apresentaram altura entre 20 e 30 nm, e a altura máxima observada foi até 60 nm. Sob as mesmas condições, 55,6% dos grãos em QS200 apresentaram menos que 20 nm de altura, 17,3%, entre 20 e 30 nm, 13,6% entre 30 e 40 nm e em quantidades menores (2,47%) foram observados grãos com mais de 90 nm.

Figura 27 - Altura dos grãos acima de 10 nm, quando QS200 e OQ-7 foram observadas por microscopia de força atômica e submetidas a análise de grãos\*



Legenda: \* efetuada com auxílio do *software* Park SmartScan™, pelo método *Threshold*  
 Fonte: DO AUTOR (2019)

Resumindo, as imagens obtidas por microscopia de força atômica não foram conclusivas para se inferir a respeito da morfologia dos PECs mas os tamanhos determinados corroboraram com os obtidos por DLS. Como a microscopia e o DLS são técnicas diferentes e a primeira foi efetuada com amostra seca e a segunda, com os PECs em suspensão, é de se esperar que os tamanhos para uma mesma amostra sejam diferentes entre as técnicas. Entretanto, ambas análises confirmaram que QS200 é menor que OQ-7.

#### 5.2.3.3 Espectroscopia de absorção no IV

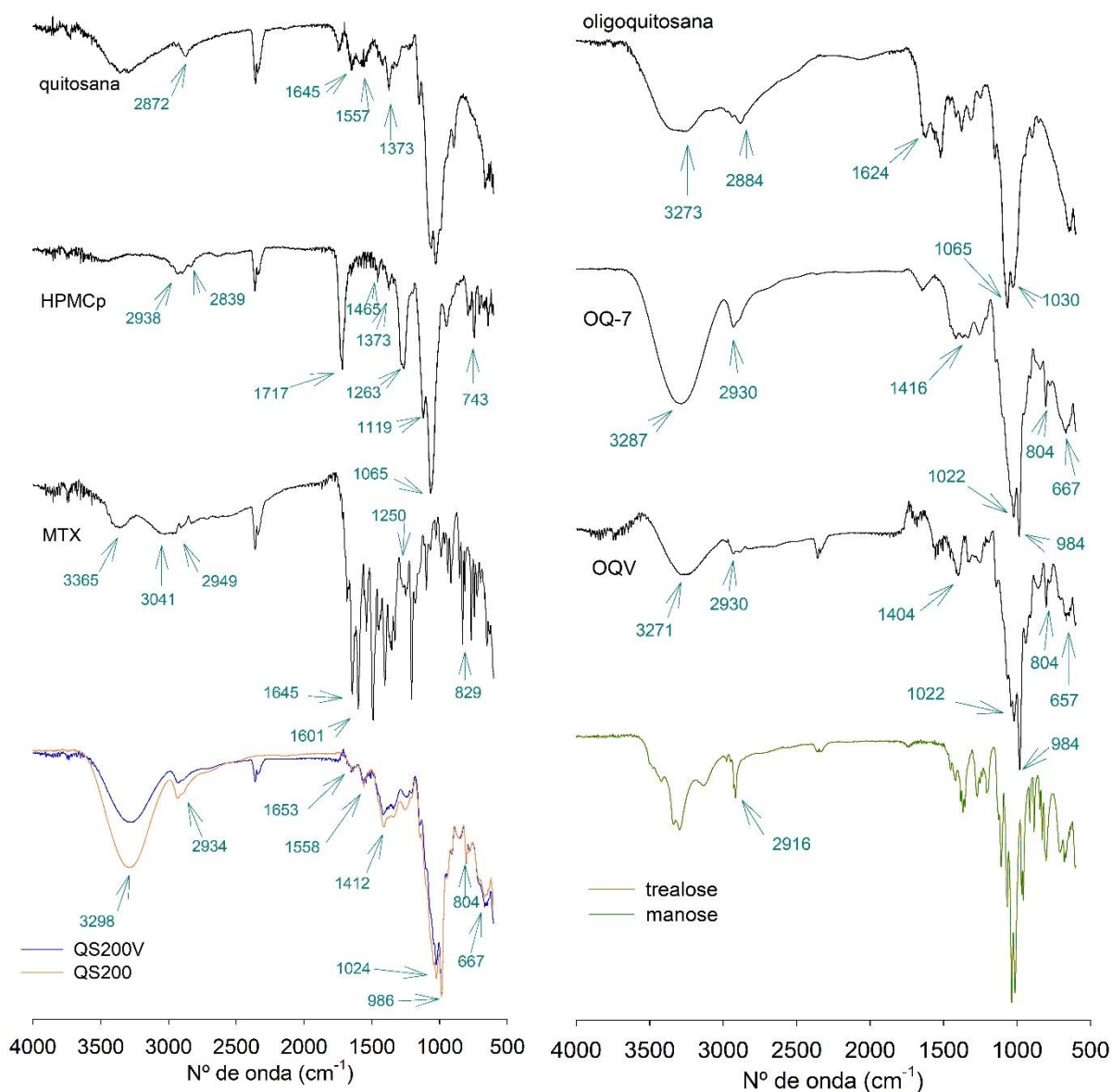
A fim de investigar os grupos funcionais presentes nos PECs QS200, QS200V, OQ-7 e OQV tais amostras foram submetidas a análise espectroscópica de absorção no IV, assim como as matérias primas que os constituem. A análise dos grupos funcionais foi importante para constatar a reticulação polieletrólítica e a incorporação do fármaco nos PECs. Todos os resultados (FIGURA 28) foram interpretados com base nas absorções características publicadas por Pavia *et al.*, (2010).

Pelo espectro de IV da quitosana é possível observar uma banda de absorção bastante alargada de 3400 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  a qual pode ser atribuída ao estiramento da ligação O-H, especialmente quando as hidroxilas estabelecem ligações de hidrogênio. Os picos de absorção característicos do estiramento N-H em aminas (3500 a 3300  $\text{cm}^{-1}$ ) e em amidas (3500 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ ) parecem estar sobrepostos à banda de absorção dos grupos hidroxila. As vibrações de dobramento de N-H são compatíveis com as absorções observadas próximo a 1557  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro de absorção no IV de HPMCP encontra-se uma banda alargada de absorção entre 3400 e 2400  $\text{cm}^{-1}$  devida a estiramento de O-H, a qual se sobrepõe às bandas de estiramento C-H, entre 2938 e 2839  $\text{cm}^{-1}$ . Entre 1905 e 1774  $\text{cm}^{-1}$  são vistas bandas harmônicas características de anéis aromáticos. A absorção em 1717  $\text{cm}^{-1}$  decorre do estiramento de carbonila, tanto de ésteres quanto de ácidos carboxílicos. Os aumentos de absorção próximos a 1465  $\text{cm}^{-1}$  podem ser provenientes do dobramento C-H de grupos metila e metileno. A banda larga - em 1373  $\text{cm}^{-1}$  pode ser proveniente do dobramento de C-OH e  $\text{CH}_3$ . A absorção em 1263  $\text{cm}^{-1}$  provavelmente se deve a estiramento C-O de função éster. O incremento de absorção em 1119  $\text{cm}^{-1}$  é característico de estiramento C-O-C em anel de seis membros que contenha oxigênio. A banda intensa em 1065  $\text{cm}^{-1}$  é compatível com estiramento C-OH. A absorção

aumentada em  $743\text{ cm}^{-1}$  provavelmente refere-se a dobramento CH fora do plano em anéis aromáticos.

Figura 28 – Espectros de absorção no IV de QS200, QS200V, OQ-7, OQV, suas matérias primas de origem e os crioprotetores utilizados, obtidos em modo ATR



Legenda: IV= infravermelho; ATR= refletância total atenuada; HPM Cp= ftalato de hidroxipropil metilcelulose; MTX= metotrexato; plotagens coloridas estão sobrepostas  
 Fonte: DO AUTOR (2018)

O espectro de absorção no IV do MTX obtido é condizente com outro experimental previamente publicado (AYYAPPAN *et al.*, 2010). Observa-se uma banda de absorção

alargada de 3400 a 2400  $\text{cm}^{-1}$  decorrente do estiramento O-H dos grupos carboxílicos. Dentro de tal banda observa-se uma intensificação de absorção próxima a 3365  $\text{cm}^{-1}$ , a qual provavelmente representa uma sobreposição de bandas de estiramento N-H de aminas primárias e de amida.

O aumento de absorção entre 3041 e 2949  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído a estiramento assimétrico de C-H em metileno e metila. Entre 1920 e 1759  $\text{cm}^{-1}$  aparecem bandas harmônicas características de compostos aromáticos. A banda em 1645  $\text{cm}^{-1}$  é provocada pelo estiramento C=O da função amida. A absorção do estiramento C=C parece sobreposta pela do dobramento N-H, observada em 1601  $\text{cm}^{-1}$ . A banda larga em 1250  $\text{cm}^{-1}$  é compatível com estiramento C-O de grupos carboxílicos. A absorção em 829  $\text{cm}^{-1}$  pode ser devida a dobramento fora do plano de C-H aromático.

O espectro de QS200V apresenta bandas de absorção condizentes com estiramento de O-H (3400-3200  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramento C-H (2928  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramento C=O de amida (1647  $\text{cm}^{-1}$ ), dobramento N-H (1558  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramento C-OH, C-O-C e C-N (representados pelas bandas sobrepostas com máximos de absorção em 1024 e 986  $\text{cm}^{-1}$ ). Tal perfil é semelhante ao apresentado por quitosana embora apresente deslocamentos quanto às frequências de absorção. Não são visualizados picos característicos do espectro de HPMCp, o que pode ser justificado pela menor proporção de tal polímero na composição dos PECs.

Algumas características espectrais podem indicar a formação dos PECs. A primeira delas é o incremento de absorção observado em 3296 ( $\text{cm}^{-1}$ ), o qual é compatível com estiramento N-H. Apesar dos espectros de manose e trealose apresentarem absorção em tal frequência, decorrente de estiramento O-H, a forma da banda é diferente. A absorção de estiramento N-H pode ter se evidenciado devido ao enovelamento da cadeia polimérica da quitosana, de forma a expor os grupos amina em resposta à presença do polímero aniônico, HPMCp. Se a cadeia polimérica permanecesse em uma conformação mais aberta seria razoável pressupor que a absorção provocada pelos grupos amínicos não se destacaria sobre a provocada pelas hidroxilas, a exemplo do observado com a quitosana pura. Apesar de não ter sido efetuado um controle de massa da amostra, o que seria mais apropriado para realizar inferências sobre as diferenças na intensidade de banda, cumpre lembrar que a concentração de quitosana em QS200 e QSV é menor do que na quitosana pura, ou seja na ausência de mudança conformacional, seria lógico esperar uma maior intensidade de banda referente a estiramento N-H na amostra de polímero puro, ao contrário do observado. O indício de enovelamento com exteriorização de grupos amina é reforçado pelo surgimento de absorção em 804  $\text{cm}^{-1}$ , que pode

ser atribuído a dobramento C-NH<sub>2</sub>. Além disso, a interação polieletrólítica também pode ser apontada pela banda em 1418 cm<sup>-1</sup>, uma vez que a presença tanto de íon amônio quanto de íon carboxilato incrementam a absorção nesta região espectral.

O espectro de absorção dos PECs carregados com MTX, QS200, não apresenta picos diferenciais em relação ao do espectro dos PECs vazios. Há uma pequena diferença em algumas frequências de absorção o que significa que provavelmente não se trata da mesma estrutura. A não visualização de picos característicos do fármaco não significa necessariamente sua ausência, pode ser devida a sua concentração relativamente baixa na amostra.

O espectro da oligoquitosana exibe uma banda alargada de 3400 a 2400 cm<sup>-1</sup>, proveniente do estiramento de O-H. A absorção decorrente de estiramento de N-H em oligoquitosana resulta em uma banda com mínimo de transmitância em 3273 cm<sup>-1</sup>. O aumento de absorção em 2884 cm<sup>-1</sup> decorre do estiramento dos grupos metilênicos. A vibração de dobramento de NH<sub>2</sub> pode ser evidenciada em 1624 cm<sup>-1</sup>. As bandas em 1065 e 1030 cm<sup>-1</sup> são provocadas por estiramento C-O das funções álcool e éter.

Os espectros apresentados por OQV e OQ-7 são bastante semelhantes aos de QS200V e QS200, sendo que a complexação com HPM Cp parece ter dado origem às bandas de absorção em 1404 e 1416 cm<sup>-1</sup> no carreador vazio e carregado, respectivamente. O perfil de absorção apresentado por OQ-7 revela aumento de intensidade nas bandas relativas a estiramento de N-H, em relação à oligoquitosana, e complexação polieletrólítica.

Nos espectros de absorção no IV de manose e trealose, as quais foram utilizadas como crioprotetores, observa-se uma banda larga de absorção entre 3400 e 3200 cm<sup>-1</sup> em decorrência do estiramento O-H. O estiramento C-H pode ser indicado pelo pico em 2916 cm<sup>-1</sup>. Os máximos de absorção registrados entre 1107 e 1013 cm<sup>-1</sup> provavelmente decorrem dos estiramentos C-O-C e C-OH.

Concluindo, estas análises indicam a formação dos PECs, tanto a partir de quitosana quanto de oligoquitosana, e a incorporação de MTX em QS200 e OQ-7.

#### 5.2.3.4 Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial

As análises de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial foram efetuadas para comprovar se o processo de obtenção de PECs de fato levou à formação de um novo material e não a uma simples mistura dos materiais de partida.

As curvas obtidas pelas análises de TG e DSC para estudo dos PECs de quitosana (QS200 e QS200V) e de seus materiais de partida encontram-se representadas na Figura 29-A e B.

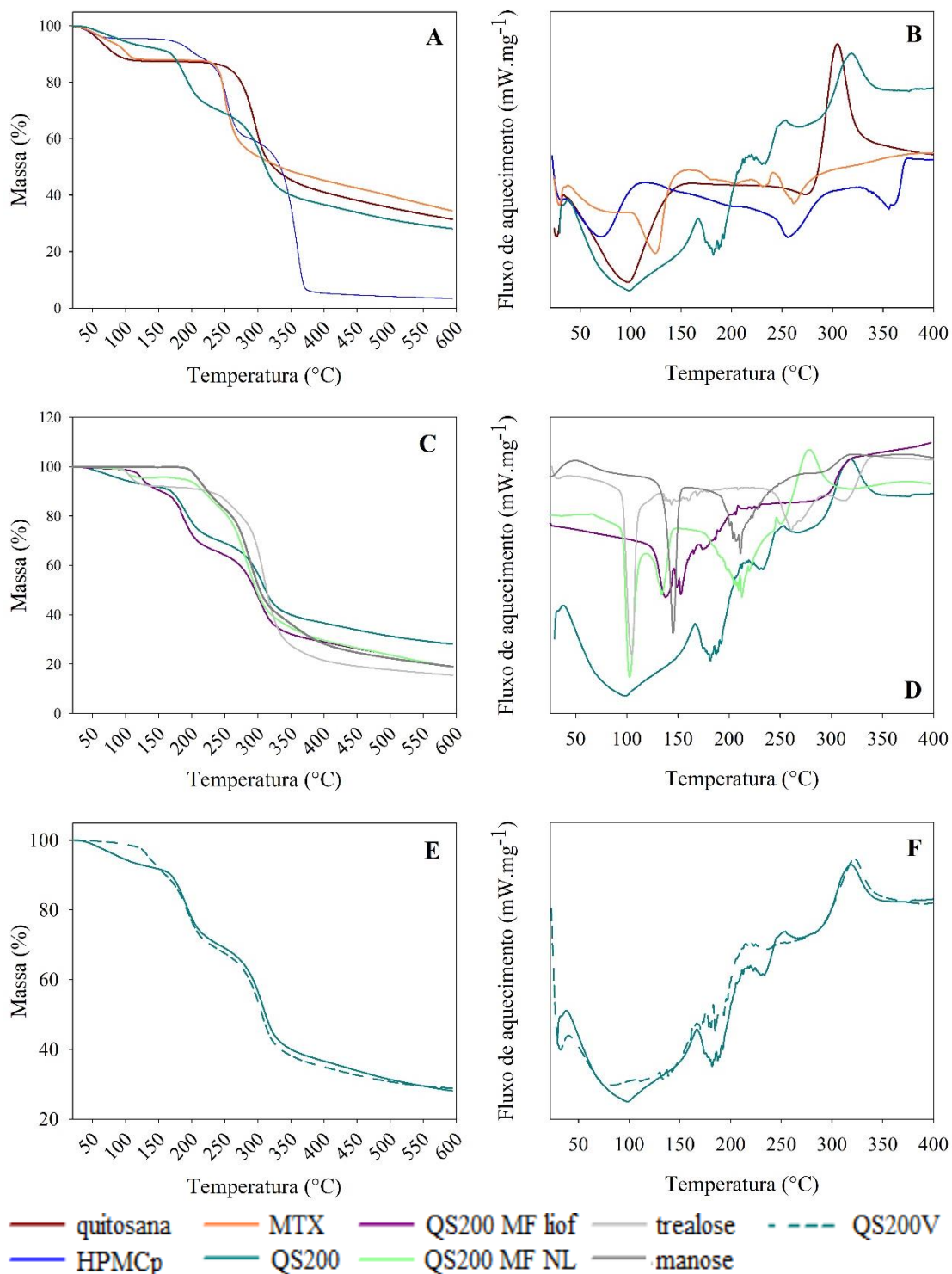
A curva termogravimétrica da quitosana revelou uma perda gradativa de 12,2% da massa até por volta de 112°C, coincidente com a ocorrência de processos endotérmicos, provavelmente correspondentes a perda de umidade. A partir de 276°C até 400°C a massa da amostra foi reduzida a 41% e foram observadas variações de energia negativas e positivas, provavelmente referentes à transição vítrea seguida pela degradação polimérica. Ao término do experimento (600°C) o resíduo foi 31,5%. Um comportamento termogravimétrico bastante semelhante foi previamente relatado para tal polímero (DHAWADE; JAGTAP, 2012).

No termograma de HPMCP observa-se uma redução de 4% de massa até aproximadamente 70°C simultânea a evento endotérmico, provavelmente referente a perda de umidade. A partir de 225°C são observados dois processos endotérmicos, os quais resultaram em resíduo de massa de 5% a 400°C. A primeira parte de tal processo degradativo pode ser atribuída à perda dos substituintes ftálicos e a segunda, à total decomposição polimérica (KARANDIKAR *et al.*, 2015).

O aquecimento de metotrexato promoveu uma diminuição de 11,7% de massa até próximo a 119°C, associada a variação endotérmica, provavelmente referente a perda de água de hidratação. Em 229°C iniciou-se outra perda de massa decorrente de eventos endotérmicos sobrepostos característicos de fusão e decomposição. Observações condizentes com estas foram reportadas por outros autores (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Ao final da análise houve um remanescente de 35% de massa.

A análise térmica de QS200 revelou uma perda de umidade até 160°C, denotada por um amplo evento endotérmico, que abrange toda a faixa de temperatura na qual se observaram os processos de desidratação da quitosana, HPMCP e MTX. A partir de 160°C se inicia a transição vítrea, seguida pela degradação do PEC, durante a qual foram observados três eventos exotérmicos.

Figura 29 - Curvas obtidas por análise termogravimétrica (à esquerda) e calorimetria exploratória diferencial (à direita) de PECs de quitosana e seus materiais de partida



Legenda: PECs= complexos polieletrólitos; MTX= metotrexato; HPMCp= ftalato de hidroxipropil metilcelulose; QS200= PECs de quitosana contendo MTX; QS200V= PECs de quitosana sem MTX; MF= mistura física; NL= não liofilizada; liof= liofilizada. Os picos positivos em relação à linha base indicam eventos exotérmicos e os negativos, endotérmicos.

Fonte: DO AUTOR (2019)

Para se investigar, pela análise térmica, a formação dos PECs, as curvas de TG e DSC de QS200 foram comparadas às aquelas apresentadas por uma mistura física de quitosana, HPMCP, MTX e os crioprotetores trealose e manose (FIGURA 29 C e D). Tais matérias primas foram misturadas a seco, nas mesmas proporções em que estariam presentes numa suspensão de PECs, porém, não foram submetidas à técnica de complexação polieletrólítica. A mistura física foi constituída por: quitosana (1,69% m.m<sup>-1</sup>), HPMCP (0,56% m.m<sup>-1</sup>), MTX (0,11% m.m<sup>-1</sup>), manose (46,36% m.m<sup>-1</sup>), trealose (46,36% m.m<sup>-1</sup>) e cloreto de sódio (4,92% m.m<sup>-1</sup>). Essas misturas físicas foram analisadas por TG e por DSC antes e após a liofilização, sendo nomeadas como QS200 MF NL e QS200 MF liof, respectivamente. O comportamento térmico de QS200 MF NL foi bastante semelhante àqueles apresentados pelos crioprotetores,

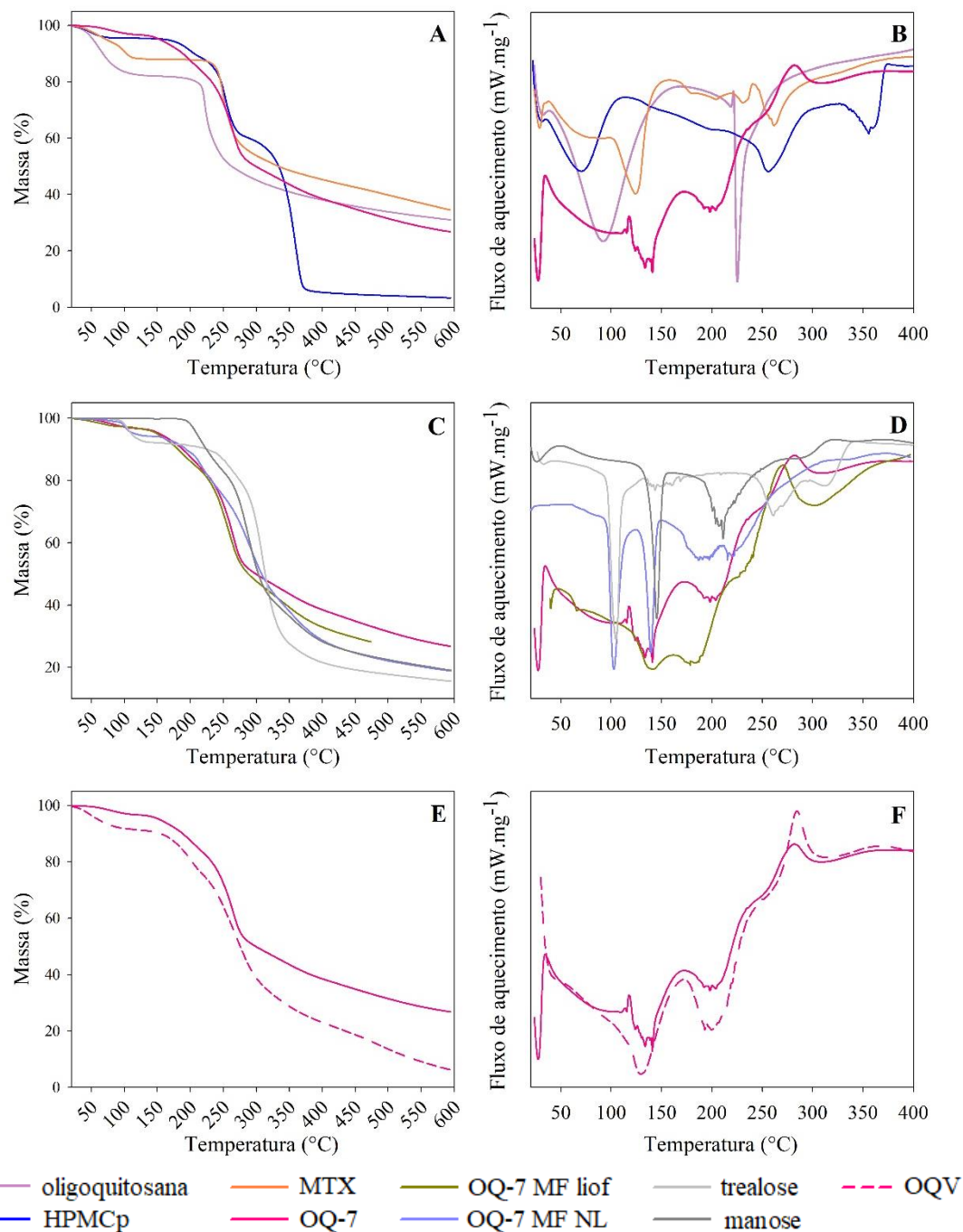
Em QS200 MF liof, a presença dos crioprotetores não ficou evidente nas curvas de DSC. Isso talvez se deva ao fato das moléculas de açúcar terem ocupado o espaço das moléculas de água de hidratação das cadeias poliméricas, que foram sublimadas durante o processo de liofilização (ABDELWAHED *et al.*, 2006). O perfil térmico de QS200 MF liof também foi diferente do de QS200, sugerindo que a complexação polieletrólítica tenha de fato ocorrido e dado origem a outro material.

Os PECs de quitosana sem MTX (QS200V) apresentaram um início de fusão com decomposição por volta de 96°C, portanto antes que o de QS200, sugerindo que a presença do fármaco melhore a estabilidade térmica da partícula (FIGURA 29-E). Ainda em comparação a QS200, QS200V exibiu menos efeitos exotérmicos durante sua decomposição (FIGURA 29-F).

Os resultados da análise térmica dos PECs de oligoquitosana (OQ-7 e OQV), bem como de seus componentes individuais ou fisicamente misturados, encontram-se plotados na Figura 30.

A oligoquitosana apresentou menor estabilidade térmica que a quitosana. Embora a variação inicial de massa tenha sido equivalente à do polímero, a transição vítrea seguida da decomposição da forma oligomérica foi observada entre 209°C e 272°C (FIGURA 30-A e B).

Figura 30 - Curvas obtidas por análise termogravimétrica (à esquerda) e calorimetria exploratória diferencial (à direita) de PECs de oligoquitosana e seus materiais de partida



Legenda: PECs= complexos polieletrólitos; MTX= metotrexato; HPMCP= ftalato de hidroxipropil metilcelulose; OQ7= PECs de oligoquitosana contendo MTX; OQ9= PECs de oligoquitosana sem MTX; MF= mistura física; NL= não liofilizada; liof= liofilizada. Os picos positivos em relação à linha base representam eventos exotérmicos e os negativos, endotérmicos.

Fonte: DO AUTOR (2019)

Na curva termogravimétrica de OQ-7 observa-se uma perda inicial de umidade menos pronunciada do que a que ocorre com oligoquitosana e MTX, sendo que até 149°C houve uma

redução de massa de 4,5%. A partir daí foram observados dois eventos endotérmicos, os quais provavelmente correspondem a transição vítrea e decomposição.

Nas análises conduzidas para se pesquisar a formação dos PECs e sua resistência ao processo de liofilização (FIGURA 30-C e D), a mistura física de componentes de OQ-7 foi constituída por: oligoquitosana (1,77% m.m<sup>-1</sup>); HPMCp (0,59% m.m<sup>-1</sup>); MTX (0,46% m.m<sup>-1</sup>); manose (48,59% m.m<sup>-1</sup>) e trealose (48,59% m.m<sup>-1</sup>). A mistura física não liofilizada (OQ-7 MF NL) demonstrou perfil térmico com eventos característicos de manose e trealose. O comportamento da mistura física após a liofilização (OQ-7 MF liof) foi diferente tanto de OQ-7 MF NL quanto de OQ-7, revelando uma sobreposição de eventos endotérmicos na faixa de 120° a 200°C.

Assim como foi observado para os PECs de quitosana, a presença de MTX parece ter melhorado a estabilidade térmica dos PECs de oligoquitosana. Apesar de ter se observado coincidência nos eventos endotérmicos e exotérmicos de OQ-7 e OQV (PECs não carregados com fármaco), desde o início da curva de TG a perda de massa foi mais acentuada e precoce para OQV do que para OQ-7 (FIGURA 30-E e F). A 600°C as massas residuais de OQ-7 e OQV foram 27% e 6%, respectivamente. TG e DSC se mostraram técnicas sensíveis o suficiente para distinguir a presença do MTX apesar deste composto estar presente em concentração inferior a 0,6% (m.m<sup>-1</sup>). Além disso, a análise térmica permitiu constatar que o processo de obtenção dos PECs deu origem a materiais que se distinguem tanto das matérias primas isoladas quanto misturadas entre si.

#### **5.2.4 Seleção de crioprotetores**

As obtenção de PECs por reticulação polieletrólítica resulta em suspensões aquosas, que em termos de estabilidade de produto, podem com o tempo sofrer aglomerações e liberação do ativo. Neste sentido, foi realizado um estudo com o objetivo de obter PECs liofilizados e para isso, foi avaliado o desempenho de diferentes crioprotetores (trealose, manose, manitol) para a preservação das características de QS200.

O Quadro 7 descreve as amostras utilizadas no estudo de seleção de crioprotetores.

Quadro 7 - Amostras utilizadas no estudo de seleção de crioprotetores

Código	Descrição da amostra
AF	Suspensão fresca de QS200, não submetida a liofilização
SC	Ressuspensão de QS200 liofilizado sem crioprotetor
T10	Ressuspensão de QS200 liofilizado com trealose 10%
T5	Ressuspensão de QS200 liofilizado com trealose 5%
M10	Ressuspensão de QS200 liofilizado com manose 10%
M5	Ressuspensão de QS200 liofilizado com manose 5%
TM10	Ressuspensão de QS200 liofilizado com trealose 5% + manose 5%
TM5	Ressuspensão de QS200 liofilizado com trealose 2,5% + manose 2,5%
ML10	Ressuspensão de QS200 liofilizado com manitol 10%
ML 5	Ressuspensão de QS200 liofilizado com manitol 5%

Fonte: DO AUTOR (2019)

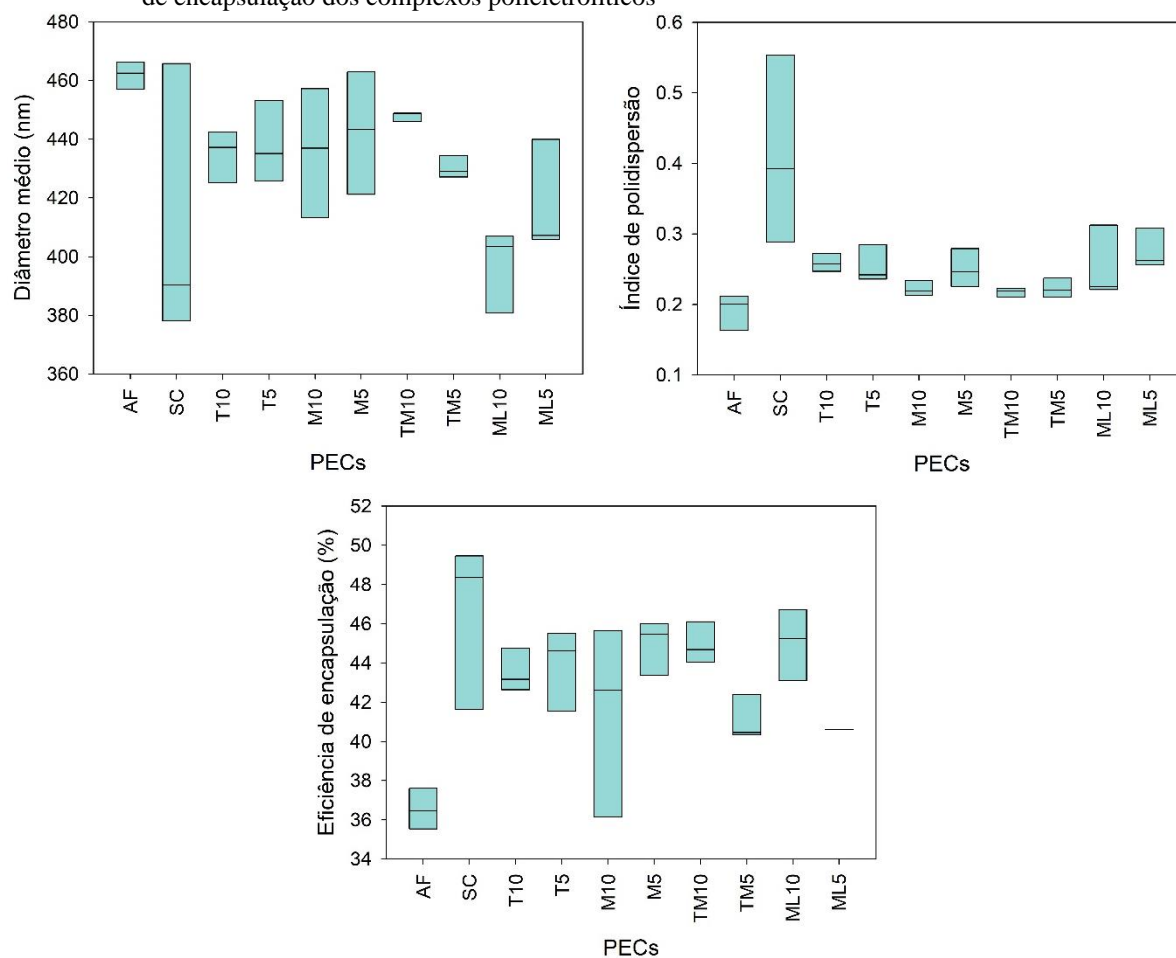
Independente do crioprotetor presente, todas as amostras de PECs liofilizadas apresentaram o aspecto macroscópico ilustrado na Figura 31, formando uma estrutura aerada de textura pegajosa. Os resultados de tamanho de partícula, PdI e EE encontram-se representados na Figura 32.

Figura 31 - Aspecto macroscópico de amostras de PECs liofilizadas, vistas lateralmente e de cima para baixo



Fonte: DO AUTOR (2018)

Figura 32 – Influência dos diferentes crioprotetores sobre o tamanho de partícula, a polidispersão e a eficiência de encapsulação dos complexos polieletrólíticos

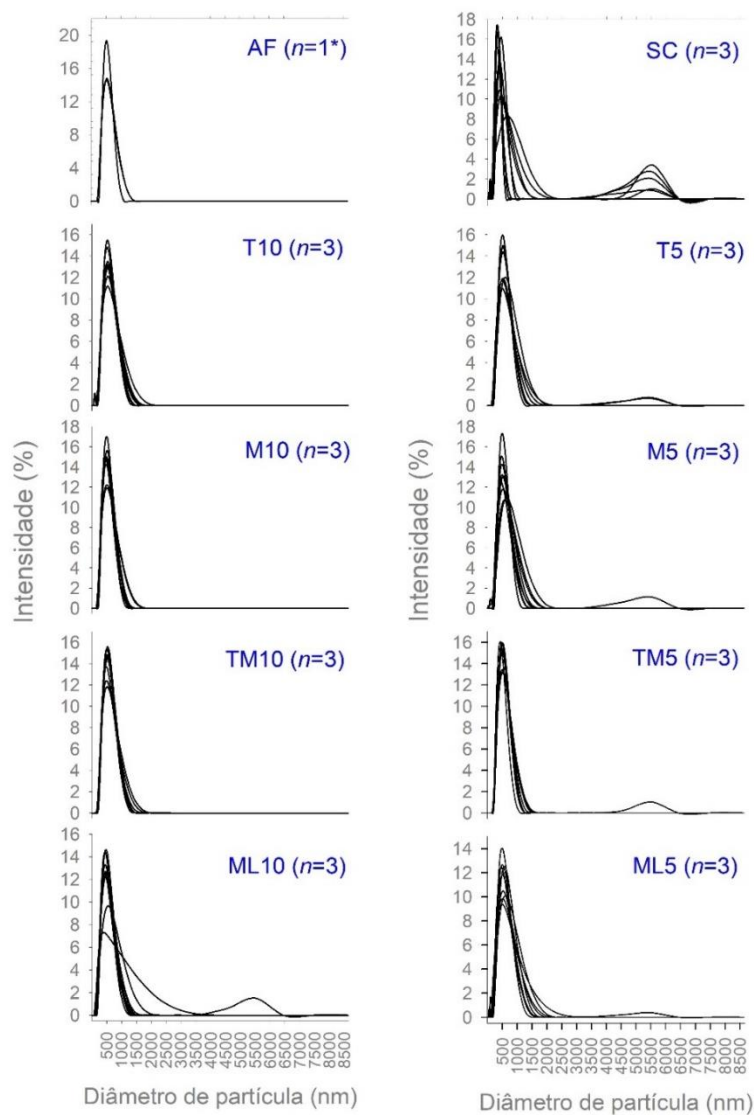


Legenda: PECs= complexos polieletrólíticos.  
Fonte: DO AUTOR (2019)

O tamanho das partículas após a liofilização variou de  $397 \pm 14$  nm (ML10) a  $448 \pm 2$  nm (TM10). Constatou-se que o processo de liofilização não alterou o tamanho, sendo que o diâmetro médio de SC ( $411 \pm 48$  nm) foi igual ao de AF ( $462 \pm 5$  nm) ( $P > 0,05$ ). Também não houve diferença estatística entre qualquer dos tratamentos e SC.

Embora o tamanho médio de partícula tenha sido equivalente para todas as amostras, a observação da distribuição de tamanho em função da intensidade de DLS (FIGURA 33) demonstrou que a liofilização na ausência de crioprotetores levou a heterogeneidade considerável na distribuição. Também foi possível notar que uma concentração total de crioprotetor de 5% não foi suficiente para manter a população unimodal original.

Figura 33 - Distribuição de tamanho de partícula em função da intensidade de espalhamento dinâmico de luz, observada para os complexos polieletrólíticos, antes e após a liofilização



Legenda:  $n$  = número de repetições da formulação, sendo que cada repetição foi analisada pelo menos em triplicata; \* = o número amostral representa um *pool* no qual foram reunidas 12 repetições da formulação

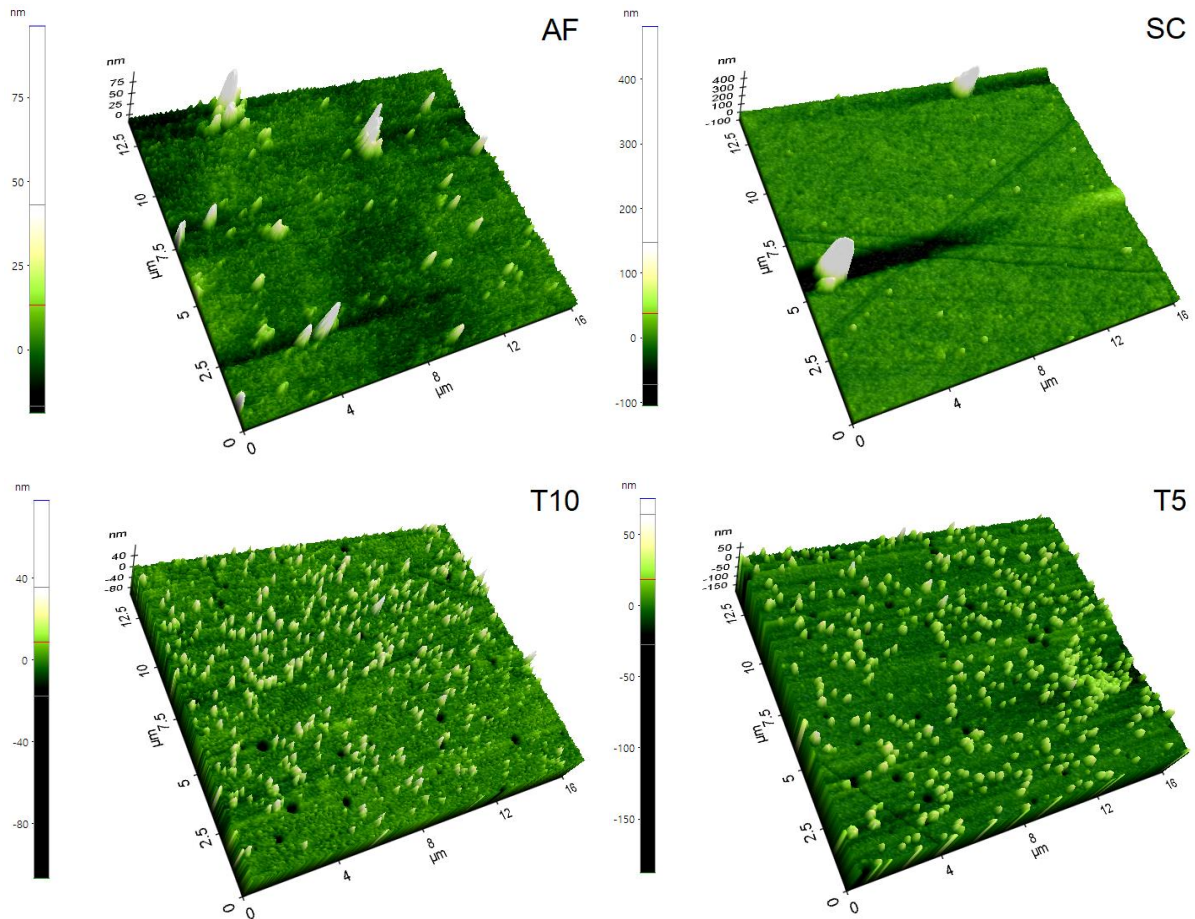
Fonte: DO AUTOR (2019)

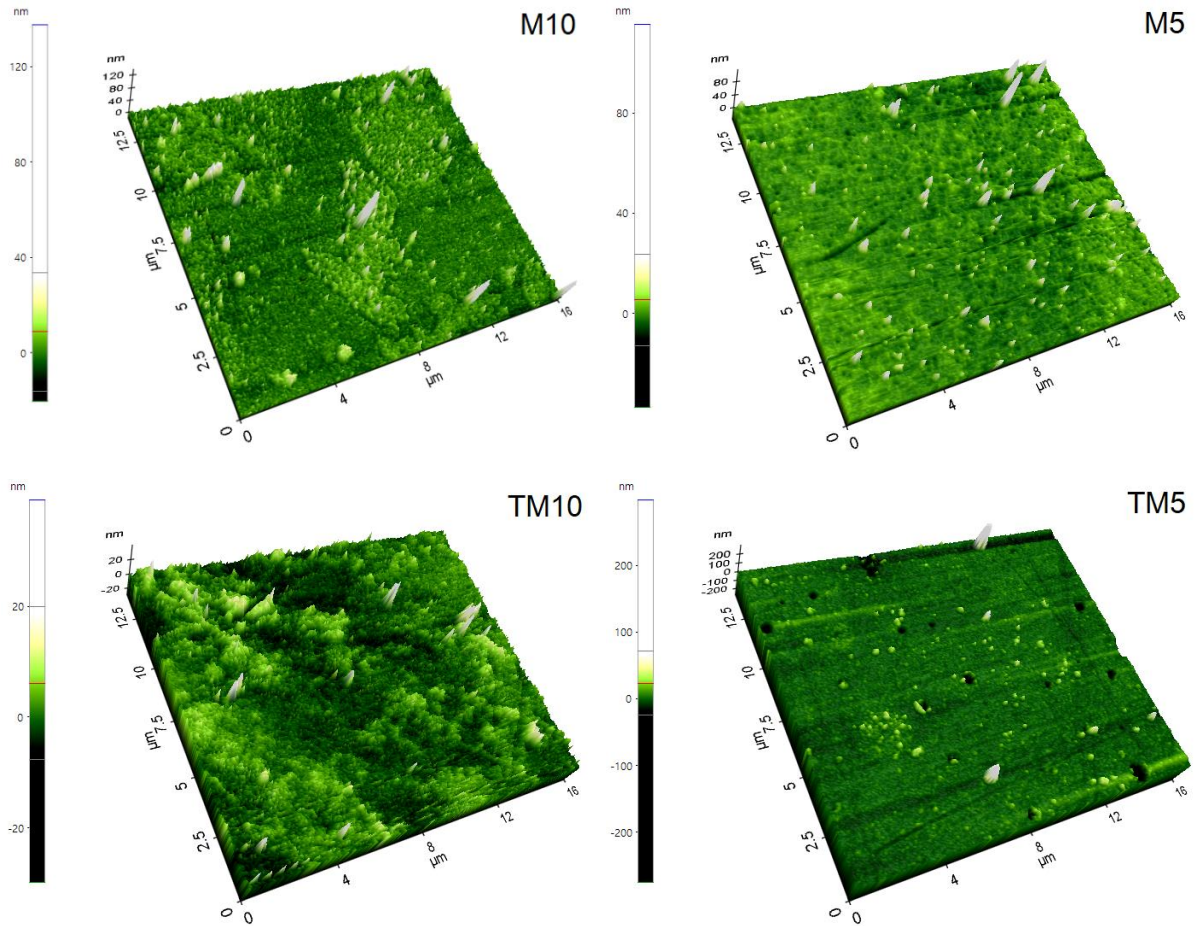
As amostras nas quais apenas trealose foi utilizada como crioprotetor foram facilmente ressuspensas. Entretanto, o PdI de T10 ( $0,259 \pm 0,013$ ) foi equivalente ao de SC ( $0,412 \pm 0,134$ ). Apesar do PdI de T5 ( $0,254 \pm 0,027$ ) ter sido menor que o de SC, foi mais alto que o de AF ( $0,192 \pm 0,026$ ). As EE de T10 e T5 ( $43,52 \pm 1,10$  e  $43,89 \pm 2,09\%$ , respectivamente) também foram estatisticamente diferentes das de AF ( $36,54 \pm 1,04\%$ ) e iguais a de SC ( $46,49 \pm 4,23\%$ ).

Pela análise de microscopia de força atômica (FIGURA 34), nas amostras liofilizadas com trealose foram observadas numerosas partículas, de aspecto uniforme. Apesar do aspecto visual homogêneo, quando as imagens foram submetidas a análise de grãos superiores a 10 nm

(FIGURA 35), constatou-se que 57,8% dos grãos observados em T10 possuíam altura acima de 20 até 30 nm, enquanto em AF 55,6% dos grãos apresentaram-se no intervalo acima de 10 até 20 nm. Para T5, 74,8% situaram-se no intervalo acima de 30 até 40 nm. Tais constatações indicam que os PECs liofilizados exclusivamente com trealose formaram majoritariamente agregados, o que condiz com o PdI significativamente mais alto com a aplicação de tal tratamento, independente da concentração estar a 10 ou a 5%. Além disso, se o objetivo foi obter suspensões a partir dos liofilizados com características mais fiéis às da suspensão fresca a trealose não foi o tratamento mais indicado.

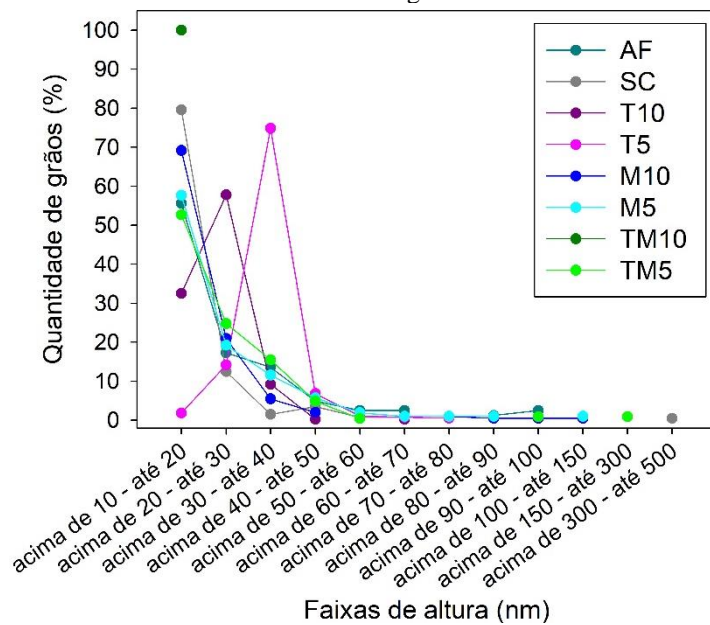
Figura 34 - Imagens topográficas tridimensionais dos PECs, antes e após a liofilização, obtidas por microscopia de força atômica





Legenda: PECs= complexos polieletrólitos  
 Fonte: DO AUTOR (2019)

Figura 35 - Alturas observadas quando as imagens de microscopia de força atômica dos PECs foram submetidas a análise de grãos\*

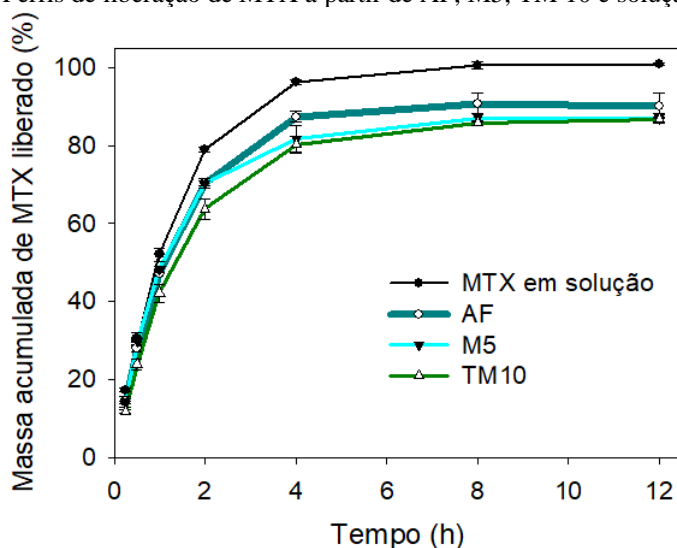


Legenda: \* efetuada com auxílio do software Park SmartScan™, pelo método Threshold  
 Fonte: DO AUTOR (2019)

As amostras liofilizadas com manose foram ressuspensas satisfatoriamente. A utilização de manose a 10%, além de preservar o tamanho ( $436 \pm 22,0$  nm), manteve o PDI ( $0,222 \pm 0,01$ ) e a EE ( $41,46 \pm 4,84\%$ ) inalterados após a liofilização. Além disso, a microscopia revelou que M10 e M5 foram as amostras mais semelhantes a AF tanto no aspecto topográfico quanto na distribuição de altura, sendo que os picos mais altos observados em tais amostras foram, respectivamente, 138, 116 e 96 nm. Tanto para M10 como para M5 a maioria dos grãos com altura superior a 10 nm apresentou no máximo 20 nm, à semelhança do observado para AF. A eficiência crioprotetora da manose também ficou evidente pela liberação de MTX a partir de M5, cujo perfil foi equivalente ao demonstrado por AF (FIGURA 36).

A associação de manose e trealose, tanto a 5 quanto a 10%, foi eficaz para manter o PDI ( $0,223 \pm 0,014$  e  $0,218 \pm 0,006$ , respectivamente). TM5 preservou também a EE ( $41,07 \pm 1,15\%$ ). Por análise microscópica, as amostras que foram liofilizadas com associação de trealose e manose apresentaram menor densidade de partícula. Pode ser possível que o tratamento com a associação de alguma forma tenha prejudicado a fixação das partículas no suporte, principalmente no caso de TM10. O perfil de liberação de MTX a partir de TM10 foi equivalente ao de AF. Apesar do PDI não alterado, na amostra liofilizada com trealose 2,5% + manose 2,5%, do total de grãos mais altos que 10 nm, 52,7% apresentaram até 20 nm, 24,8%, até 30 nm e 15,5%, até 40 nm. Além dessa falta de uniformidade, em TM5 foi observada uma estrutura com altura de 298,9 nm, a qual representou um dos maiores aglomerados, sendo menor apenas do que dois encontrados na amostra liofilizada sem crioprotetor, que apresentaram altura entre 370 e 480 nm.

Figura 36 – Perfis de liberação de MTX a partir de AF, M5, TM 10 e solução do fármaco



Legenda: MTX= metotrexato. Fonte: DO AUTOR (2019)

Portanto, os resultados apontaram a manose como o crioprotetor mais eficaz, entre os aqui avaliados, para preservação de tamanho, PdI e morfologia de QS200.

Na literatura consta que a trealose possui bom desempenho como crioprotetor devido a apresentar alta temperatura de transição vítrea ( $T_g'$ ) (ABDELWAHED *et al.*, 2006). A  $T_g'$  da trealose é 241,15 K (SIMPERLER *et al.*, 2007) e a da manose, 258 K (NOEL; PARKER; RING, 2000). A  $T_g'$  do manitol é ainda mais alta, 284 K (ZHU *et al.*, 2015). Entretanto, não foi possível ressuspender adequadamente as amostras liofilizadas com manitol e com exceção da EE apresentada por ML5 ( $40,61 \pm 0,54\%$ ), não se observou outra característica a favor de tal crioprotetor. Além disso ambas as amostras liofilizadas com manitol apresentaram distribuição de tamanho bimodal.

Outra evidência constatada foi o benefício de se empregar a crioproteção de modo geral. A liofilização representa um recurso importante para se tentar prolongar o tempo de estabilidade de uma formulação farmacêutica ou para concentrar princípios ativos, entretanto, se conduzida de forma inadequada, pode levar à degradação dos fármacos. O processo se inicia com o congelamento da amostra, o que ocorre de forma gradativa. Primeiro se formam cristais de água pura, que vão aumentando progressivamente enquanto os demais componentes da formulação se acumulam no líquido remanescente, o qual se torna cada vez mais viscoso em função do aumento da concentração e, portanto, menos propenso ao congelamento. Em seguida, a água cristalizada é sublimada. Posteriormente, a água não congelada, a qual permaneceu ligada aos fármacos e excipientes, é desorvida da amostra. Tais etapas são fonte de estresse para a formulação e, portanto, para se obter um liofilizado com boa apresentação, de fácil redispersão e que preserve as propriedades físico-químicas e bioativas iniciais, torna-se importante o uso de crioprotetores (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

No caso dos PECs, o acúmulo de carreadores, tampão e fármaco não encapsulado em pequenos volumes de água, provocado pelo congelamento, pode induzir a agregação das partículas talvez até de forma irreversível. Além disso, os cristais de gelo podem desestabilizar as partículas por exercerem perturbação mecânica. A resistência de formulações nanoestruturadas ao processo de liofilização depende de vários fatores como a natureza e a concentração dos crioprotetores utilizados, a presença de tensoativos, a constituição polimérica das partículas e a presença de grupos funcionais em sua superfície. Portanto, é necessário realizar um estudo criterioso para a seleção de crioprotetores (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

Os açúcares são as substâncias mais comumente relatadas para crioproteção de nanopartículas, especialmente trealose, sacarose, glicose e manitol. Tais substâncias passam por uma transição vítrea a determinada temperatura e a estrutura vitrificada originada oferece proteção às partículas imobilizadas em seu interior, prevenindo sua agregação. Um mecanismo de proteção proposto é que o crioprotetor estabeleça ligações de hidrogênio com a superfície das partículas, ocupando posições que na sua ausência seriam preenchidas por moléculas de água (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

Com base nestes resultados, os PECs liofilizados com manose foram posteriormente associados a hidrogéis e fizeram parte da avaliação do perfil de liberação *in vitro*.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS

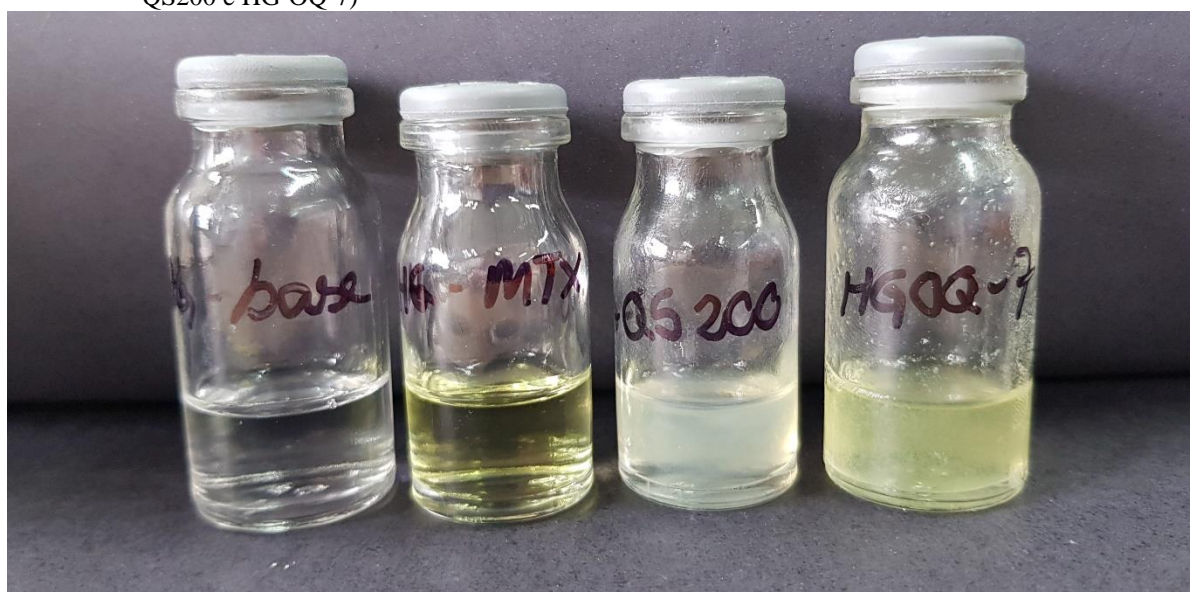
O desenvolvimento dos hidrogéis se iniciou com a seleção de uma fase aquosa fisiologicamente compatível e, ao mesmo tempo, capaz de solubilizar MTX. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, cujos resultados ainda não estão publicados, indicaram que a solubilidade máxima de MTX em tampão fosfato pH 7,4 é 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>, o que seria suficiente para produzir hidrogéis com as concentrações planejadas. Tal constatação, aliada à similaridade do tampão fosfato pH 7,4 com o fluido sinovial (MARQUES; LOEBENGER; ALMUKAINZI, 2011), justificou a escolha deste meio para a solubilização do fármaco e dispersão dos poloxâmeros. O passo seguinte foi estabelecer a concentração polimérica adequada para a obtenção de hidrogéis com características físico-químicas satisfatórias para atender aos objetivos propostos, ou seja, uma formulação com fluidez suficiente para ser injetada mas que se gelifique logo após a administração. Com tal finalidade, foram desenvolvidas formulações constituídas por poloxâmero 407 e poloxâmero 188, numa proporção de 20:10, a qual foi selecionada com base em resultados publicados por Dos Santos *et al.* (2015). A combinação de diferentes tipos de poloxâmeros e a variação da proporção entre eles podem permitir a otimização da temperatura de gelificação (DOS SANTOS *et al.*, 2015; DUMORTIER *et al.*, 2006; XUAN *et al.*, 2011, 2010).

#### 5.3.1 Obtenção dos hidrogéis

Por meio do método de dispersão a frio foram obtidos HG, HG-MTX, HG-QS, HG-QSV, HG-OQV, HG-OQ-7, todos fluídos a temperatura ambiente. HG e HG-MTX apresentaram pH 7,5, HG-QS e HG-QSV, 6,2 e HG-OQV e HG-OQ7, 6,6. O MTX conferiu coloração amarela aos hidrogéis (FIGURA 37), os quais foram incolores na ausência deste fármaco. HG e HG-MTX foram transparentes, límpidos, e os hidrogéis associados a PECs foram opalescentes, turvos.

A técnica empregada mostrou-se extremamente simples e rápida pois o banho de gelo manteve a formulação com baixa viscosidade facilitando a dispersão polimérica.

Figura 37 – Hidrogéis de poloxâmero a temperatura ambiente (da esquerda para a direita: HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7)



Fonte: DO AUTOR (2019)

### 5.3.2 Caracterização dos hidrogéis

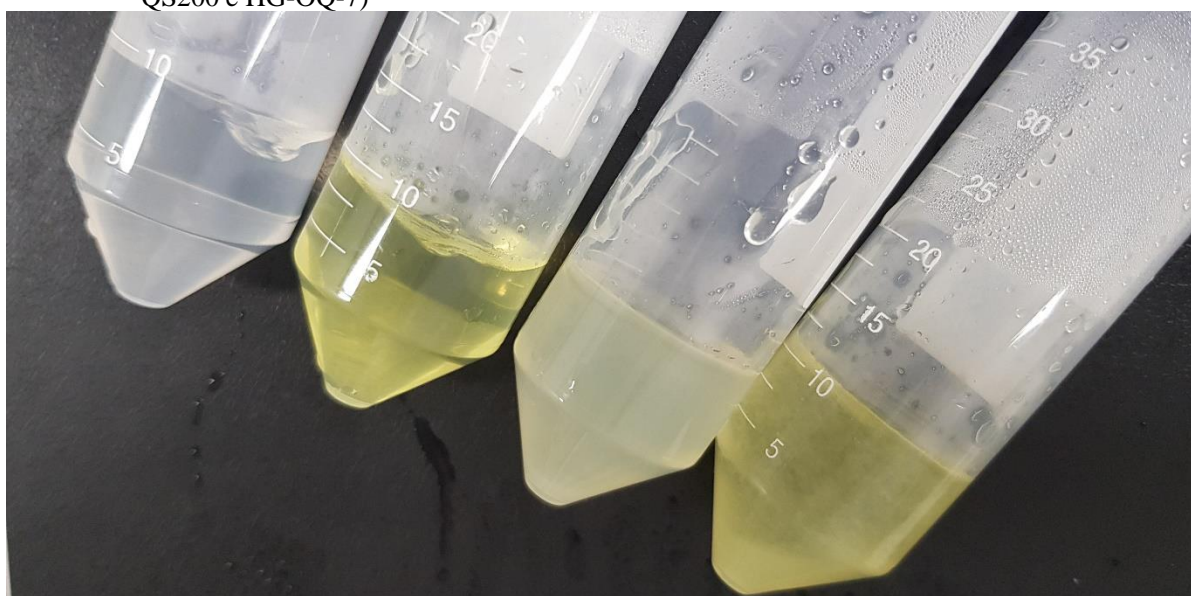
A temperatura de gelificação dos hidrogéis termorresponsivos depende da composição da formulação e constitui o aspecto mais importante a ser avaliado. Portanto, embora a literatura tenha embasado a seleção dos tipos e da concentração dos poloxâmeros para que a gelificação ocorresse à temperatura corporal, a avaliação deste parâmetro foi necessária para investigar uma possível interferência do meio de dispersão e/ou do fármaco incorporado.

### 5.3.2.1 Determinação da temperatura de gelificação pelo método de inversão do tubo

Por meio da técnica de inversão do tubo, ocorreu a gelificação tanto de HG, HG-MTX, HG-QS, HG-QSV, HG-QS200, HG-OQ-7 e HG-OQV entre 36 e 37°C (FIGURA 38), indicando que a incorporação do fármaco e/ou dos PECs ao hidrogel base não modificou muito sua faixa de  $T_{sol/gel}$ . A temperatura de gelificação encontrada é coerente com a descrita na literatura para a proporção polimérica utilizada nas formulações (DOS SANTOS *et al.*, 2015). A  $T_{sol-gel}$  coincidente com a temperatura corporal é uma das características principais desejadas para as formulações que este trabalho se propõe a desenvolver, pois possibilita que uma forma com fluidez suficiente para ser injetada se gelifique prontamente após a aplicação, formando um depósito semissólido do fármaco no espaço intra-articular cuja depuração será mais lenta do que a de uma forma líquida, prolongando a disponibilidade do ativo em seu sítio de ação.

Cumprе ressaltar que a técnica aqui empregada não possibilita uma determinação acurada da temperatura de gelificação. Entretanto, a técnica de inversão do tubo (SHINDE *et al.*, 2016) demonstrou-se bastante útil para uma triagem inicial durante o desenvolvimento dos hidrogéis, em virtude da facilidade de sua execução e da aparente reprodutibilidade dos resultados

Figura 38 - Hidrogéis de poloxâmero gelificados a 37°C (da esquerda para a direita: HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7)



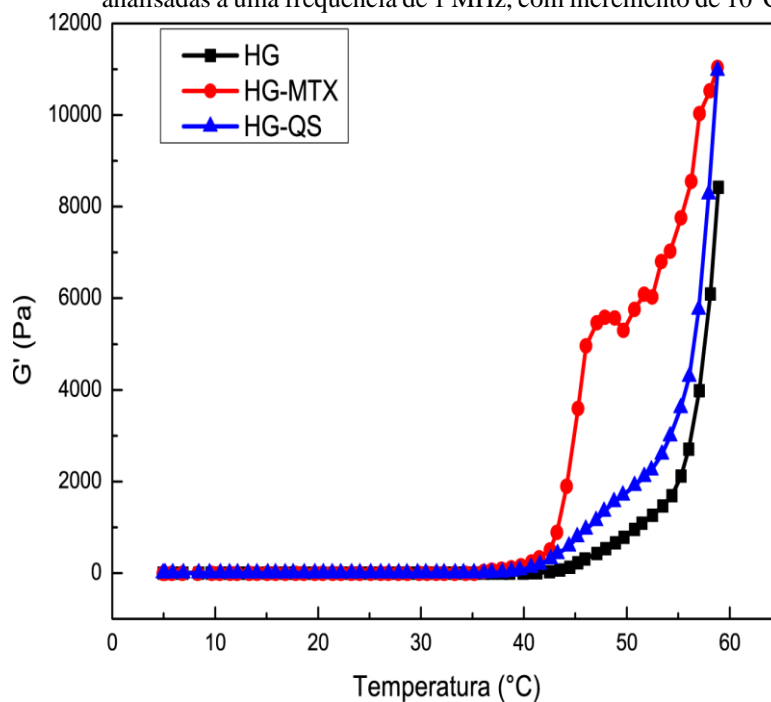
Fonte: DO AUTOR (2019)

### 5.3.2.2 Determinação da temperatura de gelificação por método reométrico oscilatório

Os ensaios reométricos oscilatórios foram executados na Universidade Estadual de Maringá. Em tais experimentos mede-se a tensão transmitida por uma amostra quando é submetida a uma deformação que não ultrapasse o limite viscoelástico linear. Conforme a natureza do material analisado haverá uma perda de energia fazendo com que a oscilação senoidal da tensão gerada tenha menor amplitude e maior comprimento de onda que a da deformação aplicada. Tal defasagem possibilita o cálculo do  $G'$  e do  $G''$ , sendo que este último está relacionado à  $\eta$  (AULTON, 2005). Quanto maior  $G'$  que  $G''$ , maior o comportamento elástico do material. Quanto maior  $G''$  que  $G'$ , maior o caráter viscoso (CARVALHO, 2012).

Efetuando-se a plotagem do valor de  $G'$  em função da temperatura pode-se determinar a  $T_{sol/gel}$ , a qual corresponde ao ponto médio entre os valores obtidos para o estado de solução e para o estado de gel, quando deve-se observar um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da  $\eta$  (BRUSCHI *et al.*, 2006, 2007; JONES *et al.*, 2009). A Figura 39 mostra a variação de  $G'$  para amostras de HG, HG-MTX e HG-QS submetidas a rampa de temperatura de 0 a 60°C. Observa-se que não houve completa gelificação das amostras até 60°C, o que seria sinalizado por uma estabilização de  $G'$  após seu aumento significativo. Há relatos na literatura de que dispersões de um outro tipo de poloxâmero também não apresentaram gelificação completa, o que foi relacionado à concentração polimérica (LAU *et al.*, 2014). A velocidade de incremento de temperatura utilizada durante o ensaio reométrico também pode interferir na determinação da  $T_{sol/gel}$  (MEZMARICH; LOVE, 2011).

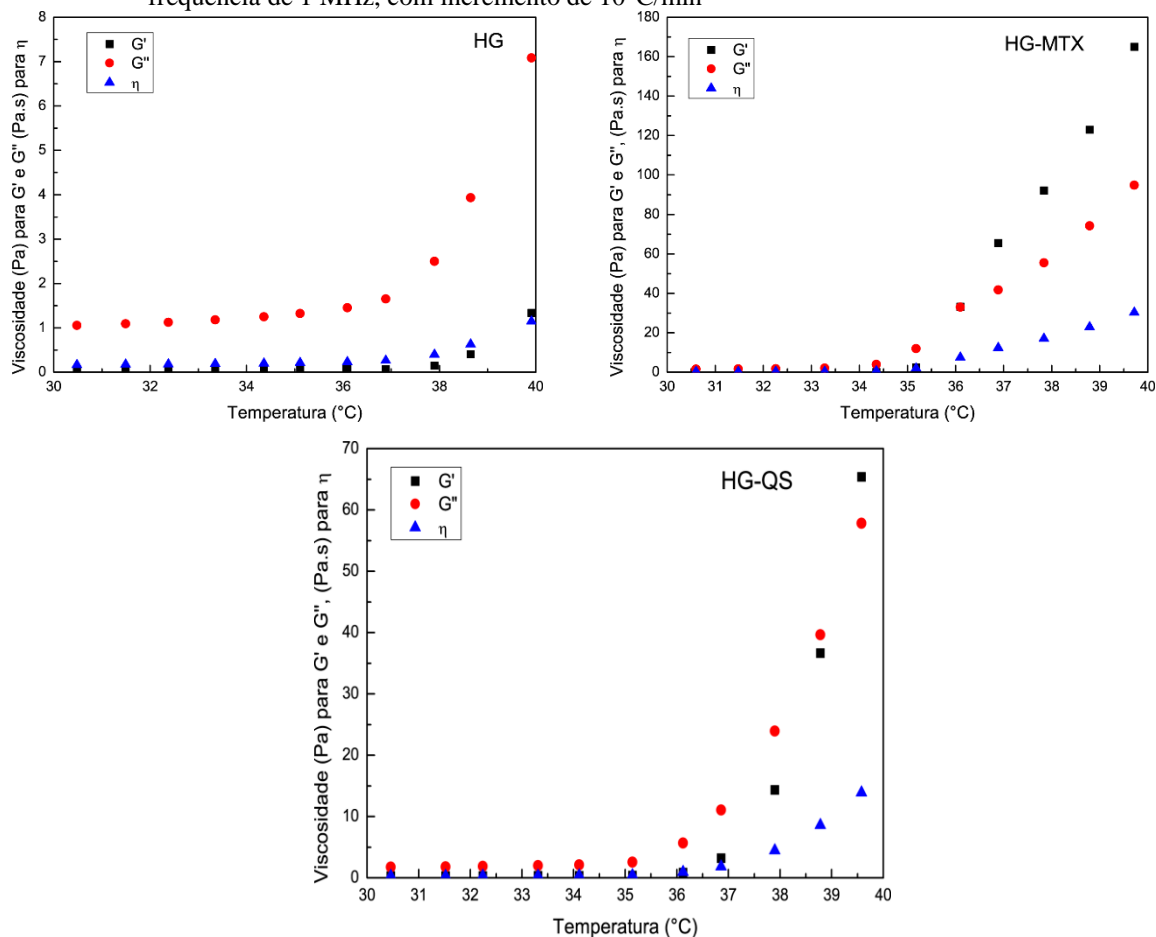
Figura 39 - Variação de  $G'$  em função da temperatura em amostras de hidrogéis analisadas a uma frequência de 1 MHz, com incremento de 10°C/min



Legenda:  $G'$  = módulo elástico; HG = hidrogel base; HG-MTX = HG contendo metotrexato; HG-QS = HG contendo complexo polieletrólítico de quitosana carregado com MTX  
 Fonte: DO AUTOR (2018)

Embora não tenha sido possível observar a completa gelificação, a determinação da temperatura de gelificação pelo método da inversão do tubo mostrou que à temperatura corporal ocorre uma mudança de viscosidade, visualmente perceptível, suficiente para impedir o escoamento das amostras. Com o intuito de se conhecer melhor o comportamento das amostras em tal região, plotaram-se os valores de  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta$ , em função da temperatura no intervalo de 30 a 40°C (FIGURA 40). Nota-se que para HG e HG-QS, a 37° C o módulo  $G''$  é maior que  $G'$ , ou seja, as amostras apresentam maior caráter viscoso do que elástico. Para HG-MTX, à temperatura corporal,  $G'$  é maior que  $G''$  o que indica comportamento predominantemente elástico, além da viscosidade dinâmica ter se elevado mais expressivamente que para as outras duas amostras.

Figura 40 - Variação de  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta$  em função da temperatura em amostras de hidrogéis analisadas a uma frequência de 1 MHz, com incremento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$



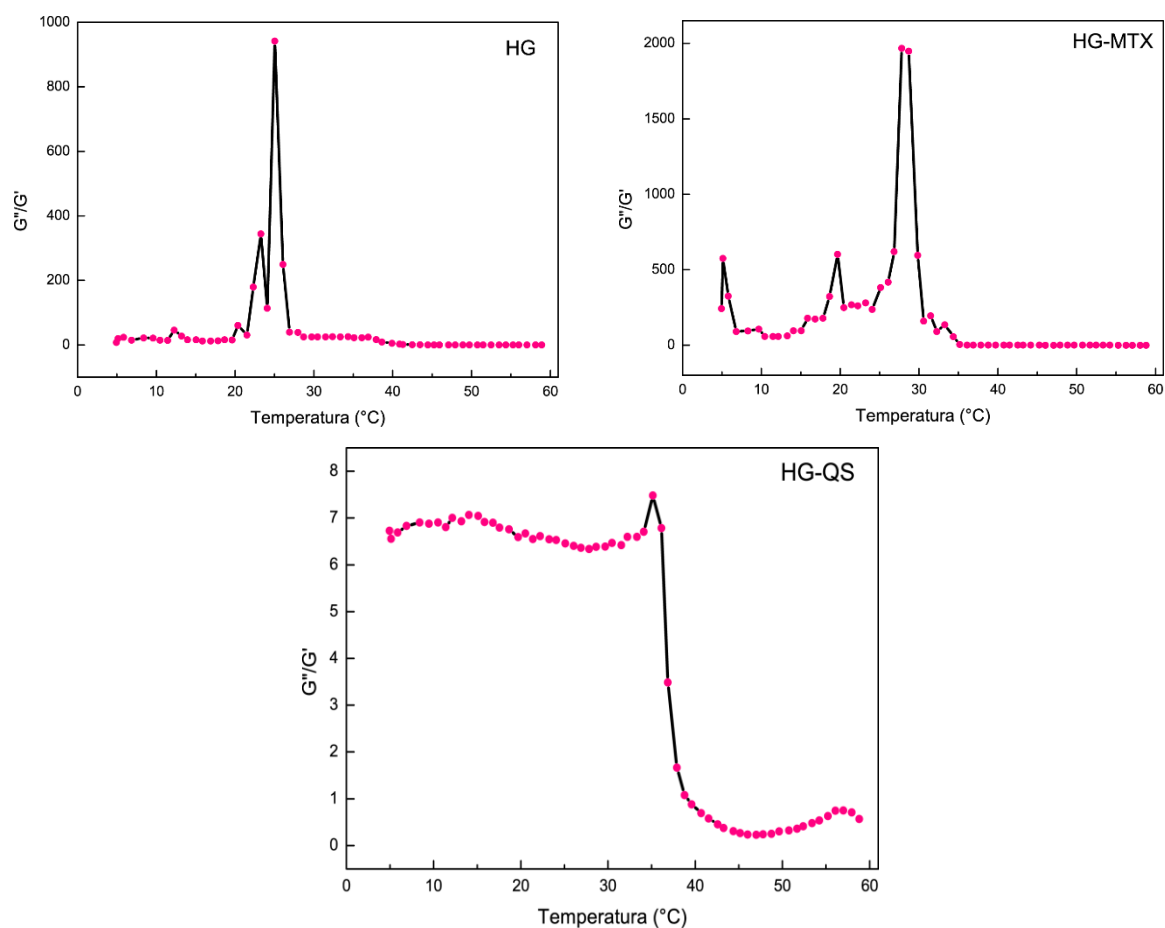
Legenda:  $G'$ =módulo elástico;  $G''$ =módulo viscoso;  $\eta$ =viscosidade dinâmica; HG=hidrogel base; HG-MTX=HG contendo metotrexato; HG-QS=HG contendo complexo polieletrólítico de quitosana carregado com MTX

Fonte: DO AUTOR (2018)

Como não foi possível determinar a temperatura de gelificação, investigou-se em que temperatura a razão  $G''/G'$  adquiriu seu menor valor (FIGURA 41). Para HG, a proporção entre  $G''$  e  $G'$  diminui abruptamente a partir de  $25^\circ\text{C}$  e torna-se menor que 1 em  $43^\circ\text{C}$ . Para HG-MTX, a diminuição brusca de  $G''/G'$  se dá a partir de  $29^\circ\text{C}$  e torna-se menor que 1 em  $35,18^\circ\text{C}$ . Para HG-QS, a queda acentuada de  $G''/G'$  ocorre a partir de  $35^\circ\text{C}$  e  $G'$  torna-se maior que  $G''$  a  $39^\circ\text{C}$ . Nota-se portanto que a incorporação de PECs e de MTX ao hidrogel base contribuiu para aumentar significativamente sua característica elástica, em detrimento da viscosa, numa faixa térmica coincidente com a temperatura corporal.

Com base nestes dados, os hidrogéis desenvolvidos podem ter um aumento abrupto de consistência *in vivo*, o que pode favorecer que a formulação permaneça na articulação por mais tempo, atendendo a um dos objetivos deste trabalho.

Figura 41 - Variação de  $G''/G'$  em função da temperatura em amostras de hidrogéis analisadas a uma frequência de 1 MHz, com incremento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$



Legenda:  $G'$ =módulo elástico;  $G''$ =módulo viscoso; HG=hidrogel base; HG-MTX=HG contendo metotrexato; HG-QS=HG contendo complexo polieletrólítico de quitosana carregado com MTX

Fonte: DO AUTOR (2018)

### 5.3.2.3 Avaliação do perfil de textura

O perfil de textura informa sobre a compressibilidade, adesão e coesão, que podem ser indicativos da estabilidade da formulação quando submetida a pressão ou impacto e/ou do grau de resistência oferecido pelo produto para entrar ou sair da embalagem.

HG, HG-MTX, HG-QS200 e HG-OQ-7 foram analisados quanto a seu perfil de textura. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da avaliação do perfil de textura dos hidrogéis

Amostra	Compressibilidade N.s	Adesão N.s	Coesão
HG	4,191 ± 0,556 <sup>a</sup>	3,667 ± 0,755 <sup>e</sup>	0,878 ± 0,052 <sup>h,i</sup>
HG-MTX	6,197 ± 0,222 <sup>b</sup>	5,696 ± 0,372 <sup>f</sup>	0,887 ± 0,014 <sup>h,i</sup>
HG-QS200	9,333 ± 0,188 <sup>c</sup>	9,045 ± 0,212 <sup>g</sup>	0,913 ± 0,017 <sup>h</sup>
HG-OQ-7	3,469 ± 0,286 <sup>a</sup>	2,740 ± 0,331 <sup>e</sup>	0,799 ± 0,025 <sup>i</sup>

Legenda: letras iguais denotam igualdade estatística ( $P > 0,05$ )

Fonte: DO AUTOR (2019)

Observa-se que a incorporação de OQ-7 ao hidrogel base não modificou sua força de resistência à compressão e nem sua capacidade de adesão. A inclusão de MTX aumentou a compressibilidade e a adesão para  $6,197 \pm 0,222$  e  $5,696 \pm 0,372$  N.s, respectivamente. O aumento de tais parâmetros foi ainda maior para a associação de QS200 ao hidrogel, sendo que resultou em compressibilidade de  $9,333 \pm 0,188$  N.s e adesão,  $9,045 \pm 0,212$  N.s.

A característica de não se deformar facilmente mediante estímulo compressor pode ser favorável a uma formulação semissólida no sentido de se prevenir extravasamento indesejado caso seja acondicionada em embalagem flexível. Entretanto, por outro lado, dependendo da intensidade necessária para compressão torna-se difícil sua aplicação, principalmente em se tratando de uma formulação destinada a uso injetável. Porém, no caso das formulações em estudo, a gelificação ocorre *in vivo*, quando envasada encontra-se fluída. A rigidez no sítio de ação é importante porque propicia a formação de uma matriz de liberação com resistência adequada. Quanto à capacidade de adesão, trata-se de uma propriedade extremamente desejável em uma formulação uma vez que evita que a forma farmacêutica seja rapidamente eliminada do sítio de aplicação.

A inclusão de MTX, QS200 ou OQ-7 não modificou a coesão do hidrogel base ( $0,878 \pm 0,052$ ). Entretanto HG-OQ-7 foi menos coeso ( $P < 0,05$ ) que HG-QS200. A coesão é de grande importância para uma formulação destinada a atuar por tempo prolongado dentro da articulação.

Em conclusão, a avaliação do perfil de textura permitiu presumir que HG-MTX e, principalmente HG-QS200 formariam depósitos mais resistentes na articulação, quando comparados a HG-OQ-7.

### 5.3.2.4 Determinação da seringueabilidade

A seringueabilidade foi estudada com o objetivo de avaliar se a viscosidade dos hidrogéis poderiam evitar a movimentação do embolo, supondo uma administração intra-articular. Os resultados de seringueabilidade encontram-se na Tabela 6.

Nota-se que a seringueabilidade das suspensões de PECs, QS200 e OQ-7, é equivalente à da solução comercial de MTX injetável. A utilização de hidrogel nas formulações (HG, HG-OQ-7, HG-MTX e HG-QS200) aumentou significativamente o esforço necessário para ejetar as amostras ( $P < 0,05$ ), mas não impediu a administração por seringa a temperatura ambiente.

Portanto, como todas as formulações puderam ser ejetadas a partir de seringa acoplada a agulha, a temperatura ambiente, mostraram-se adequadas à administração intra-articular.

Tabela 6 - Esforço necessário para ejetar as diferentes formulações a partir de uma seringa de 1 mL acoplada a agulha 26G

Amostra	Seringueabilidade (N.sec)
MTX comercial	10,87 ± 7,27 <sup>a</sup>
QS200	2,50 ± 2,49 <sup>a</sup>
OQ-7	3,50 ± 0,87 <sup>a</sup>
HG base	111,81 ± 13,23 <sup>b</sup>
HG-OQ-7	114,28 ± 11,82 <sup>b</sup>
HG-MTX	139,09 ± 3,85 <sup>c</sup>
HG-QS200	167,42 ± 8,12 <sup>d</sup>

Legenda: MTX= metotrexato; letras iguais denotam ingualdade estatística ( $P > 0,05$ ).

Fonte: DO AUTOR (2019)

## 5.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Pelos estudos de liberação *in vitro* pudemos avaliar se os nanocarreadores poliméricos, a matriz gelificada ou a associação de ambos poderiam influenciar na liberação do fármaco.

As amostras avaliadas no estudo de liberação *in vitro* estão descritas no Quadro 8. Os perfis obtidos estão representados na Figura 42.

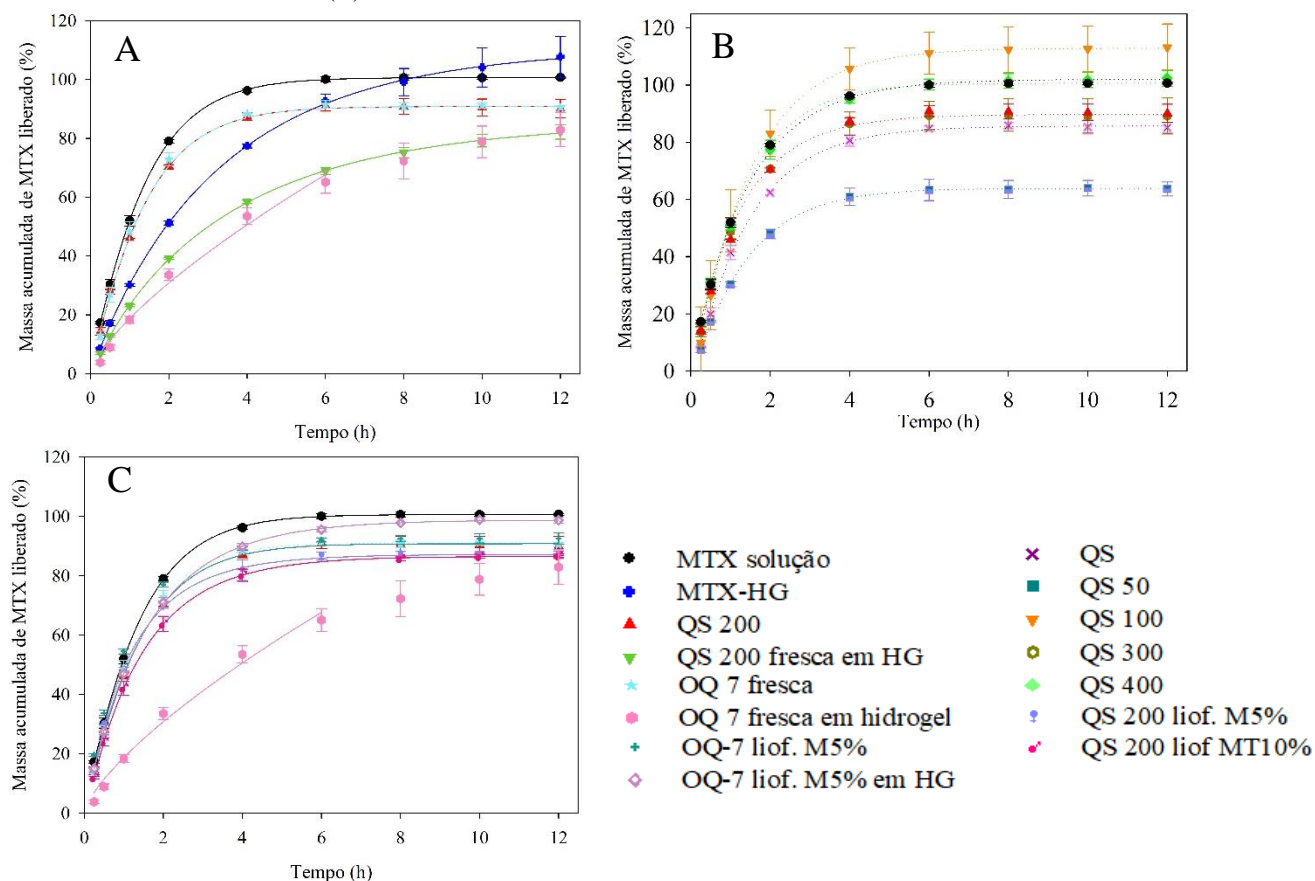
Quadro 8 - Amostras avaliadas no teste de liberação de MTX *in vitro*, em células de difusão de Franz

Amostra	Descrição
MTX solução	Solução de MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4
MTX-HG	Hidrogel contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
QS	Suspensão de PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
QS50	Suspensão de PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 2,922 $\text{mg.mL}^{-1}$
QS100	Suspensão de PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 5,844 $\text{mg.mL}^{-1}$
QS200	Suspensão de PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 11,688 $\text{mg.mL}^{-1}$
QS300	Suspensão de PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 17,532 $\text{mg.mL}^{-1}$
QS400	Suspensão de PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 23,376 $\text{mg.mL}^{-1}$
QS200 liof M5%	Suspensão de PECs de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 11,688 $\text{mg.mL}^{-1}$ , liofilizados com manose 5%
QS200 liof MT10%	Suspensão de PECs de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 11,688 $\text{mg.mL}^{-1}$ , liofilizados com manose 5% + trealose 5%
QS200 em HG	PECs frescos de quitosana contendo MTX 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e NaCl 11,688 $\text{mg.mL}^{-1}$ dispersos em hidrogel
OQ-7	Suspensão de PECs frescos de oligoquitosana contendo MTX 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
OQ-7 liof	Suspensão de PECs de oligoquitosana contendo MTX 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ liofilizados com manose 5%
OQ-7 em HG	PECs frescos de oligoquitosana contendo MTX 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dispersos em hidrogel
OQ-7 liof em HG	PECs de oligoquitosana contendo MTX 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , liofilizados com manose 5%, dispersos em hidrogel

Legenda: PECs= complexos polieletrólíticos; MTX= metotrexato

Fonte: DO AUTOR (2019)

Figura 42 - Perfis de liberação de MTX *in vitro*, comparando-se, em relação à solução de fármaco livre, as diferentes partículas de quitosana e o uso ou não de hidrogel (A), a influência da adição de diferentes concentrações de eletrólitos (B) e o desempenho de diferentes crioprotetores em relação à amostra fresca (C)



Legenda: MTX= metotrexato; HG= hidrogel; QS= complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana; OQ= PECs de oligoquitosana; liof.= liofilizada; M= manose; MT= manose + trealose; os números 50, 100, 200, 300 e 400 indicam a concentração de cloreto de sódio ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ); os pontos representam os dados experimentais; as linhas (sólidas ou pontilhadas) representam o ajuste ao modelo matemático de Weibull, para todas as formulações, exceto OQ7 fresca em HG, que melhor se adequou ao modelo de Korsmeyer-Peppas.

Fonte: DO AUTOR (2019)

A maneira mais adequada de se verificar o ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático é efetuando-se regressão não linear, o que previne a distorção do erro experimental ocasionada pela operação necessária para linearização dos dados. A partir da regressão não linear é possível selecionar o melhor modelo matemático como aquele com maior valor de  $R^2_{\text{ajustado}}$  e menor valor de AIC. O valor de  $R^2_{\text{ajustado}}$  é mais significativo que simplesmente  $R^2$ , pois permite a comparação entre modelos matemáticos contendo quantidades diferentes de parâmetros. Quanto maior o número de parâmetros do modelo maior tende a ser o  $R^2$ , sendo que tal interferência não é observada em  $R^2_{\text{ajustado}}$ . O valor de AIC também é importante porque, além de considerar o número de parâmetros, avalia os resíduos do ajuste feito, sendo que quanto menores os resíduos maior a eficiência do modelo (COSTA; LOBO, 2001). Os valores de

$R^2_{\text{ajustado}}$  e AIC oriundos do ajuste dos dados experimentais aos modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull e 1ª ordem estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de coeficiente de determinação ajustado e Critério de Informação de Akaike (AIC) oriundos do ajuste dos dados experimentais de liberação *in vitro* a diferentes modelos matemáticos

Amostra	1ª ordem		Higuchi		K.-Peepas		Weibull	
	$R^2_{\text{ajustado}}$	AIC	$R^2_{\text{ajustado}}$	AIC	$R^2_{\text{ajustado}}$	AIC	$R^2_{\text{ajustado}}$	AIC
Sol. de MTX	0.9991	20.45	0.9261	56.87	0.9208	57.48	0.9999	-0.65
MTX-HG	0.9882	46.77	0.9579	51.28	0.9872	40.54	0.9997	14.26
QS	0.9172	59.98	0.9329	54.36	0.9164	56.34	0.9991	20.83
QS50	0.5682	69.16	0.9352	48.45	0.9194	50.40	0.9996	7.84
QS100	0.9361	62.76	0.9295	59.87	0.9124	61.81	1.0000	-6.22
QS300	0.9378	56.59	0.9137	56.19	0.9120	56.36	0.9991	20.71
QS400	0.9982	27.17	0.9358	55.49	0.9306	56.20	0.9997	13.16
QS200	0.9585	53.54	0.9342	54.24	0.9263	55.26	0.9993	18.28
QS200 liof. M 5%	0.8914	60.79	0.9014	56.43	0.9070	55.90	0.9992	18.34
QS200 liof. MT 10%	0.9181	58.41	0.9565	46.25	0.9526	46.43	1.0000	-9.20
HG-QS200	0.9666	51.15	0.9595	45.63	0.9838	37.36	0.9998	6.69
OQ-7	0.9614	53.19	0.9173	56.80	0.9053	58.02	0.9997	9.79
OQ-7 liof.	0.9608	51.88	0.8696	59.42	0.9043	56.62	0.9999	-1.22
HG-OQ-7	0.9897	41.23	0.9263	50.77	0.9842	36.91	0.9710	53.99
OQ-7 liof. em HG	0.9985	25.51	0.9493	52.65	0.9409	54.03	0.9999	2.40

Legenda: sol.= solução; MTX= metotrexato; HG= hidrogel; QS= complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana; OQ= PECs de oligoquitosana; liof.= liofilizada; M= manose; MT= manose + trealose; K.= Korsmeyer; os números 50, 100, 200, 300 e 400 indicam a concentração de cloreto de sódio ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )

Fonte: DO AUTOR (2019)

Nota-se que o modelo matemático de Weibull foi o que melhor se ajustou ao perfil de todas as formulações (exceto OQ 7 fresca em hidrogel) pois foi o que originou maior valor de  $R^2_{\text{ajustado}}$  e menor valor de AIC. Para os PECs frescos de oligoquitosana dispersos em hidrogel (OQ7 em HG) o modelo matemático mais adequado foi o de Korsmeyer-Peepas, por ter fornecido o menor valor de AIC.

O modelo de Korsmeyer-Peppas descreve o percentual acumulado de fármaco liberado ( $F_t$ ) num determinado tempo ( $t$ ) pela seguinte equação (KORSMEYER *et al.*, 1983):

$F_t = at^n$ , onde  $a$  é uma constante relacionada aos aspectos estruturais e geométricos da forma farmacêutica e o expoente  $n$  indica o mecanismo de liberação envolvido. Para formas com geometria retangular,  $n = 0,5$  indica mecanismo condizente com a lei de Fick, onde há predomínio de difusão. Para  $0,5 < n \leq 1$ , a transferência de massa segue modelo não Fickiano. No caso de formas cilíndricas, devem-se considerar 0,45 e 0,89, ao invés de 0,5 e 1, em tais relações (COSTA; LOBO, 2001). Para OQ 7 em hidrogel, o valor de  $n$  foi 0,716, indicando que a liberação do fármaco não ocorreu simplesmente por difusão.

O modelo matemático de Weibull descreve a fração liberada como (LANGENBUCHER, 1972):

$F_t = 1 - \exp\left[\frac{-(t-T_i)^b}{a}\right]$ , onde  $a$  representa a escala de tempo do processo e  $T_i$ , o *lag time* antes do início da liberação. O parâmetro  $b$  confere à curva característica exponencial ( $b = 1$ ), sigmoidal ( $b > 1$ ) ou parabólica ( $b < 1$ ) (COSTA; LOBO, 2001). Para todas as amostras ajustadas pelo modelo de Weibull, o valor de  $b$  variou de 1,13 a 3,45 (TABELA 8).

O modelo de Weibull é empírico, não embasado em fundamentos cinéticos. Portanto, embora sua equação descreva a curva matematicamente, não favorece a compreensão das propriedades de liberação, por exemplo, a velocidade intrínseca relacionada ao processo não pode ser associada a nenhum de seus coeficientes (COSTA; LOBO, 2001). No entanto, como o ajuste foi muito satisfatório, possibilitou a determinação adequada de outros parâmetros úteis na avaliação dos perfis de liberação como o tempo necessário para que determinada fração fosse liberada ( $t_{30\%}$ ,  $t_{50\%}$  e  $t_{80\%}$ ), bem como a EL 6h. Tais resultados encontram-se representados na Figura 43.

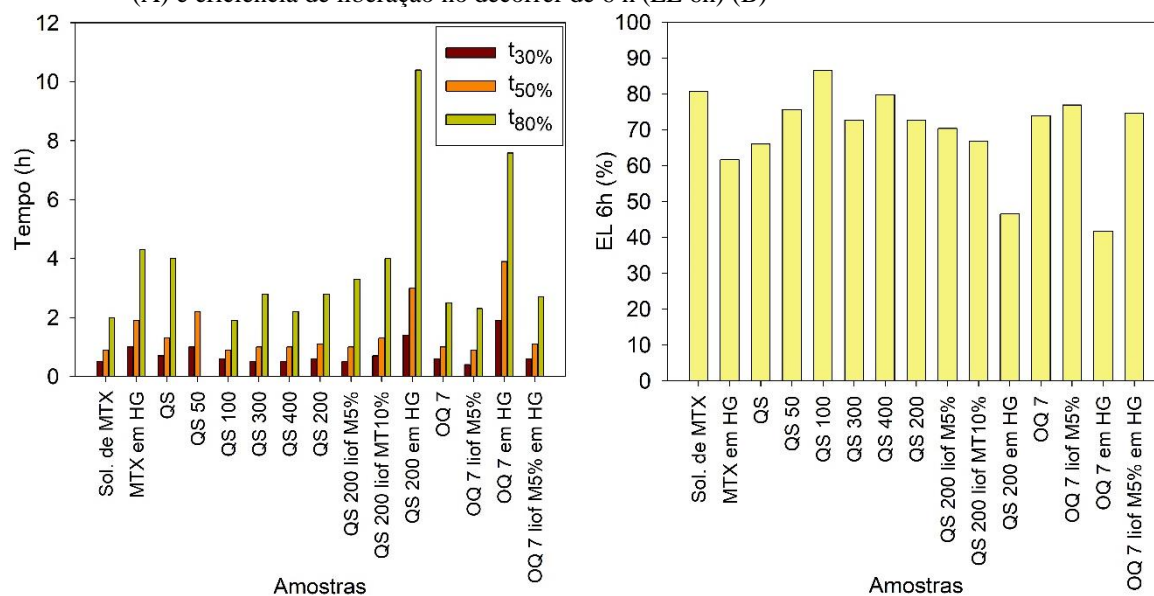
Tabela 8 - Valores do expoente  $b$  oriundos do ajuste dos dados experimentais de liberação *in vitro* ao modelo matemático de Weibull

amostra	$b$	amostra	$b$
Solução de MTX	1,42±0,02	QS200 liof. M 5%	1,13±0,04
MTX-HG	3,29±0,07	QS200 liof. MT 10%	1,44±0,01
QS	1,40±0,05	QS200 em HG	3,45±0,08
QS50	1,43±0,04	OQ-7	1,27±0,03
QS100	1,41±0,01	OQ-7 liof.	1,15±0,02
QS300	1,18±0,05	OQ-7 liof. em HG	1,55±0,02
QS200	1,41±0,06	QS400	1,42±0,04

Legenda: MTX= metotrexato; HG= hidrogel; QS= complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana; OQ= PECs de oligoquitosana; liof.= liofilizada; M= manose; MT= manose + trealose; os números 50, 100, 200, 300 e 400 indicam a concentração de cloreto de sódio (mmol.L<sup>-1</sup>)

Fonte: DO AUTOR (2019)

Figura 43 - Tempos necessários para liberação de 30, 50 e 80% de MTX a partir das diferentes formulações (A) e eficiência de liberação no decorrer de 6 h (EL 6h) (B)



Legenda: sol.= solução; MTX= metotrexato; HG= hidrogel; QS= complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana; OQ= PECs de oligoquitosana; liof.= liofilizada; M= manose; MT= manose + trealose; os números 50, 100, 200, 300 e 400 indicam a concentração de cloreto de sódio (mmol.L<sup>-1</sup>)

Fonte: DO AUTOR (2019)

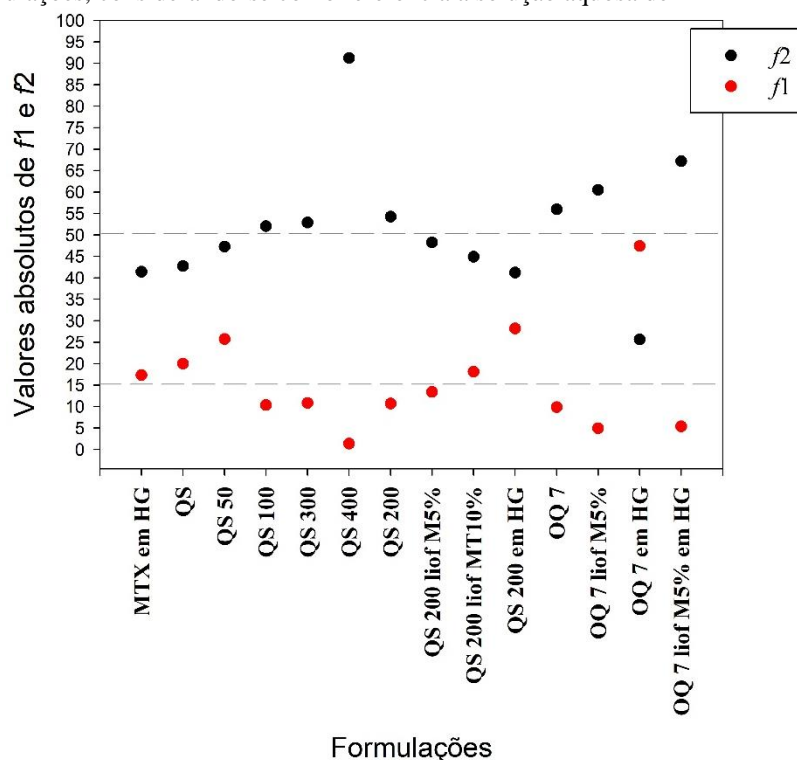
Nota-se que a veiculação de MTX na forma de PECs, tanto de quitosana quanto de oligoquitosana, praticamente não modificou a velocidade de liberação até 30%, em comparação à solução aquosa do fármaco. Para QS e QS50 o tempo necessário para liberar 50% aumentou em relação à solução, sendo que daí em diante a velocidade de liberação a partir de QS diminuiu ainda mais e a partir de QS50 a liberação cessou antes de atingir 80%.

O uso do hidrogel de poloxâmeros como matriz farmacêutica (MTX em HG) modificou claramente o perfil de liberação, o que pode ser atribuído a sua provável gelificação na interface em contato com o meio receptor a 37°C. Além a velocidade de liberação a partir de MTX-HG ter sido menor do que a partir da solução, a liberação não ficou constante antes de 10 h, sendo que para a solução ou as suspensões não houve aumento no percentual de MTX liberado após 6 h.

Foi ainda mais expressiva a redução na velocidade de liberação para as fórmulas contendo PECs frescos associados a hidrogel (QS200-HG e OQ-7-HG), de forma que esses foram os perfis que mais se aproximaram de uma liberação prolongada (AULTON, 2005). A quantidade acumulada de MTX liberado aumentou continuamente até o término do experimento. A EL 6h apresentada pela solução de MTX foi 1,7 e 1,9 vezes maior que as de QS200-HG e OQ-7-HG, respectivamente. Provavelmente, as cadeias poliméricas de quitosana e HPM Cp possuem uma mobilidade maior quando os PECs estão em suspensão do que quando se encontram dispersos em uma matriz gelificada e, por isso, a molécula do fármaco consiga sair da partícula mais facilmente no primeiro caso. É plausível pensar que talvez *in vivo* a diferença na liberação entre tais formas seja ainda mais acentuada devido ao fato de que os PECs em suspensão estariam mais livres para intumescerem quando em contato com os líquidos corporais do que quando aprisionados em uma segunda rede polimérica, organizada *in situ*.

Para melhorar avaliar os perfis de liberação, foram calculados os fatores de diferenciação ( $f_1$ ) e similaridade ( $f_2$ ), os quais comparam, em cada ponto de coleta, uma determinada formulação, tida como teste, com outra, tomada como referência (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL), 2018; COSTA, 2002; COSTA; LOBO, 2001; LU *et al.*, 2008). Quanto mais próximo  $f_1$  for de 1 e  $f_2$ , de 100, maior a semelhança entre o desempenho das duas formulações. Os perfis de liberação a partir de duas formas farmacêuticas geralmente são considerados iguais se  $f_1$  for menor que 15 e  $f_2$  for maior que 50 (COSTA; LOBO, 2001). Todas as formas analisadas foram avaliadas considerando-se a solução aquosa de MTX como referência (FIGURA 44).

Figura 44 - Plotagem dos valores de fator de diferenciação ( $f_1$ ) e fator de similaridade ( $f_2$ ) das diferentes formulações, considerando-se como referência a solução aquosa de MTX



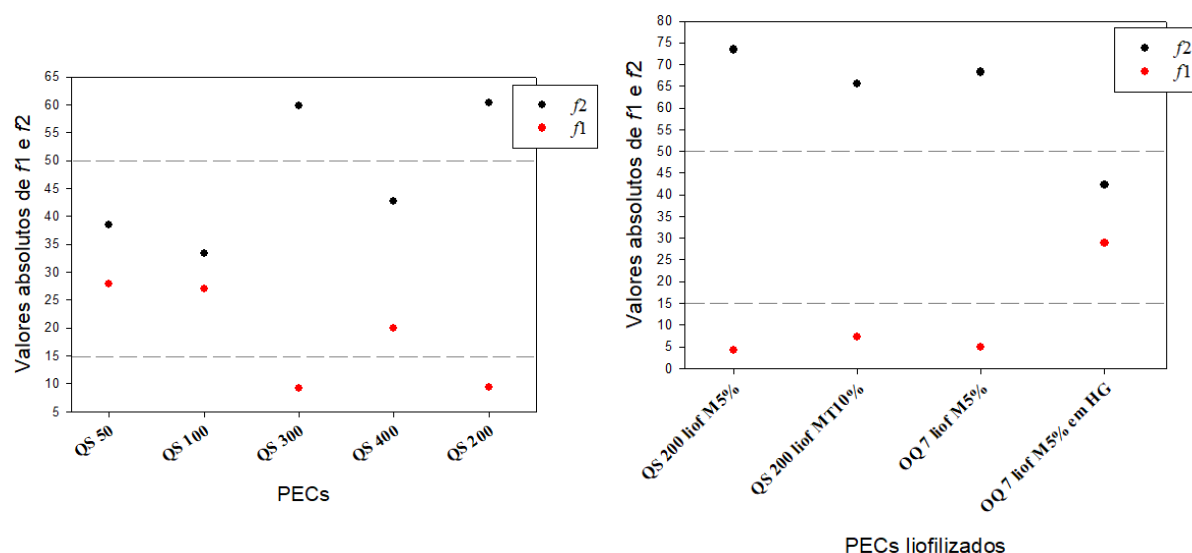
Legenda: MTX= metotrexato; HG= hidrogel; QS= complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana; OQ= PECs de oligoquitosana; QSMN= PECs de quitosana funcionalizada com manose na proporção 1:1; QSMN 0,5= PECs de quitosana funcionalizada com manose na proporção 1:0,5; liof.= liofilizada; M= manose; MT= manose + trealose; os números 50, 100, 200, 300 e 400 indicam a concentração de cloreto de sódio ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )

Fonte: DO AUTOR (2019)

Os resultados mostram que a adição de cloreto de sódio aos PECs de quitosana numa concentração maior ou igual a  $5,844 \text{ mg.mL}^{-1}$  tornaram o perfil de liberação equivalente ao da solução do fármaco, sendo o de QS400 o mais semelhante deles. A liberação de MTX a partir de OQ 7 também não se distinguiu da forma não carregada. Vale ressaltar que o efeito *in vivo* no tratamento da artrite reumatoide pode não estar relacionado apenas ao controle da liberação, mas ao fato do MTX estar num carreador que pode estimular sua captura pelas células do sistema imunológico, atuando como um vetor de liberação.

Os parâmetros  $f_1$  e  $f_2$  também foram calculados para QS50, QS100, QS200, QS300 e QS400, adotando-se como referência QS, a fim de se verificar a influência da adição de eletrólitos sobre o perfil de liberação (FIGURA 45). Para se avaliar se o uso de crioprotetores foi capaz de preservar o perfil de liberação original, calcularam-se  $f_1$  e  $f_2$  para as formas liofilizadas, tendo-se como referência as respectivas formas frescas.

Figura 45 - Plotagem dos valores de fator de diferenciação ( $f1$ ) e fator de similaridade ( $f2$ ) para avaliação da influência da adição de eletrólitos (à esquerda) ou da liofilização (à direita) sobre o perfil de liberação



Legenda: MTX= metotrexato; HG= hidrogel; QS= complexos polieletrólitos (PECs) de quitosana; OQ= PECs de oligoquitosana; QSMN= PECs de quitosana funcionalizada com manose na proporção 1:1; QSMN 0,5= PECs de quitosana funcionalizada com manose na proporção 1:0,5; liof.= liofilizada; M= manose; MT= manose + trealose; os números 50, 100, 200, 300 e 400 indicam a concentração de cloreto de sódio ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )

Fonte: DO AUTOR (2019)

Constatou-se que os perfis de liberação a partir de QS200 e QS300 são equivalentes ao de QS. Embora ambos tenham sido semelhantes ao perfil exibido pela solução de MTX, o que não foi observado para QS.

Demonstrou-se que o uso tanto de manose 5% quanto de manose 5% + trealose 5% como crioprotetores foi suficiente para preservar o perfil de liberação exibido antes da liofilização, pois o comportamento de QS200 liof M5% e QS200 liof MT10% foi equivalente ao de QS200 e o de OQ-7 liof M5%, ao de OQ-7.

Entretanto, a associação dos PECs de oligoquitosana liofilizados ao hidrogel não proporcionou o mesmo controle de liberação observado para a associação dos respectivos PECs frescos e o hidrogel. O perfil de liberação a partir de OQ-7 liof M5% em HG foi equivalente ao de MTX-HG, ou seja, a presença do carreador liofilizado, nesse caso, não conferiu vantagem à formulação. Isso pode indicar que talvez o processo de liofilização tenha modificado uma possível interação da partícula com a rede de poloxâmeros.

Com base nestes perfis de liberação, as formulações OQ-7 em hidrogel e MTX em hidrogel foram selecionadas para o teste *in vivo*. Embora OQ-7, não associada a hidrogel, não tenha se demonstrado vantajosa em termos de controle de liberação, também foi selecionada

para aplicação em modelo animal porque talvez a veiculação do fármaco em PECs possa oferecer outros benefícios *in vivo*.

## 5.5 PROVA DE PRINCÍPIO EM MODELO ANIMAL

Os resultados dos três parâmetros avaliados *in vivo*, o limiar nociceptivo, o teor de IL-1 $\beta$  plasmática e a avaliação histológica da articulação tíbiofemoral, indicaram que o modelo animal de artrite foi adequado visto que os ratos que receberam CFA apresentaram sinais inflamatórios compatíveis com a patologia em estudo. O desempenho dos diferentes tratamentos será apresentado a seguir.

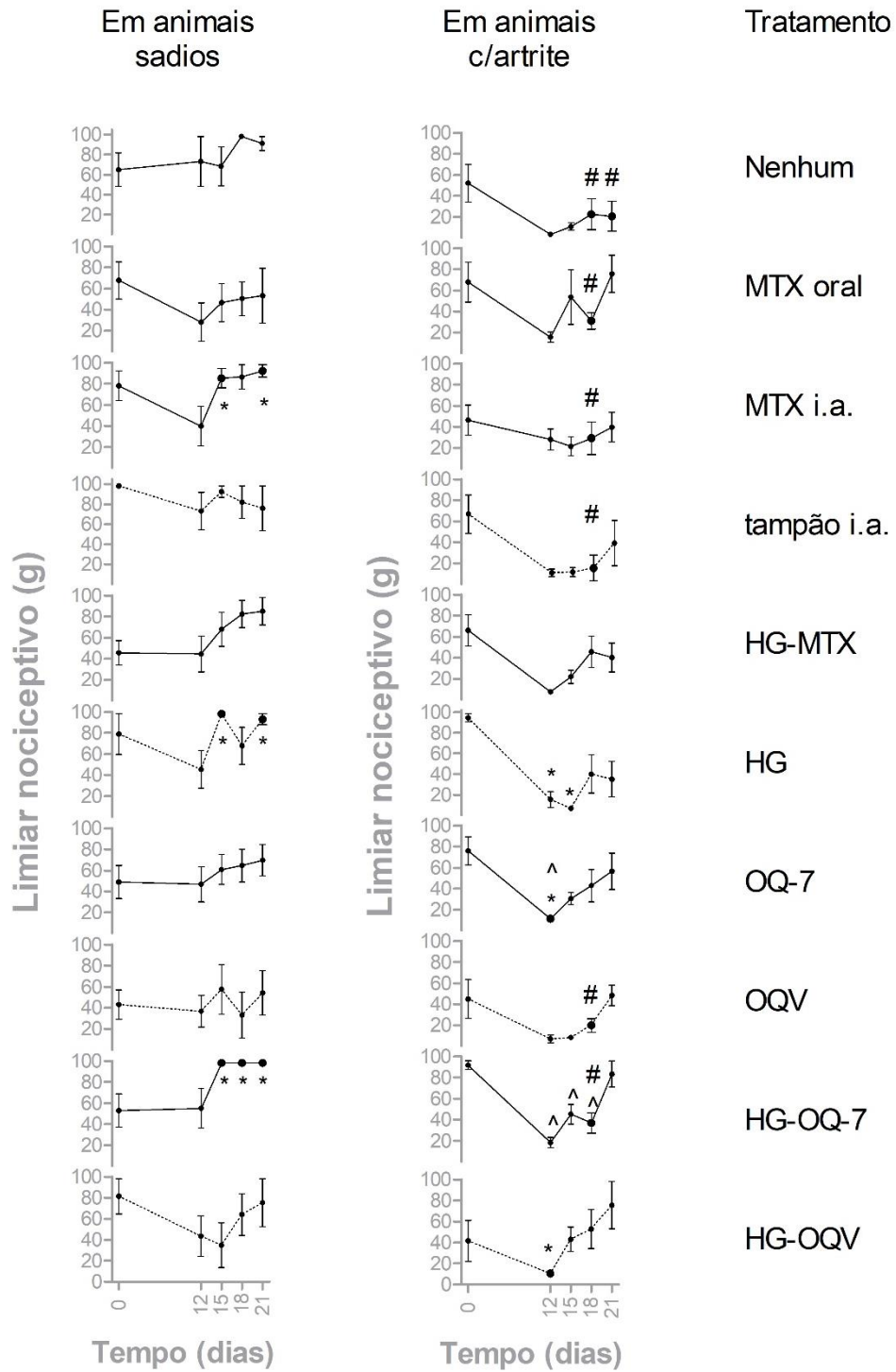
### 5.5.1 Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von Frey filamentos

Sendo a artrite reumatoide caracterizada por um processo inflamatório sinovial intenso, a dor é um dos principais sintomas associados a tal patologia. Portanto, uma das formas de se avaliar o potencial farmacológico dos sistemas desenvolvidos foi o monitoramento do limiar nociceptivo dos animais frente aos diversos tratamentos, para o que foi utilizada a técnica de von Frey de filamentos.

A Figura 46 apresenta a variação do limiar nociceptivo dos animais, avaliado pelo teste de filamentos de von Frey.

O limiar nociceptivo do grupo AR, constituído por animais que receberam indução de artrite reumatoide (CFA) mas não foram tratados, mostrou-se menor ( $P < 0,05$ ) nos dias 18 e 21 que o do grupo de animais sadios (Co), os quais receberam óleo mineral (veículo). Isso indica que o modelo proposto foi eficaz em induzir nocicepção. A maioria dos tratamentos aplicados não foi eficiente em reverter a hiperalgesia. Entretanto, dois tratamentos, OQ-7 e HG-OQV reverteram significativamente ( $P < 0,05$ ) a hiperalgesia no dia 12º dia após a indução da artrite, indicando que essas formulações controlaram o processo inflamatório no estágio inicial dessa patologia e, conseqüentemente, a dor.

Figura 46 - Efeito dos diversos tratamentos sobre o limiar nociceptivo dos animais



Legenda: \*= limiar nociceptivo maior em relação aos animais com artrite não tratados, no mesmo tempo; # = limiar nociceptivo menor em relação aos animais sadios não tratados, no mesmo tempo; ^ = limiar nociceptivo diferente do limiar nociceptivo basal do respectivo grupo. Nível de significância: 0,05. Linhas pontilhadas representam tratamentos com veículos. As barras verticais representam o erro padrão médio.

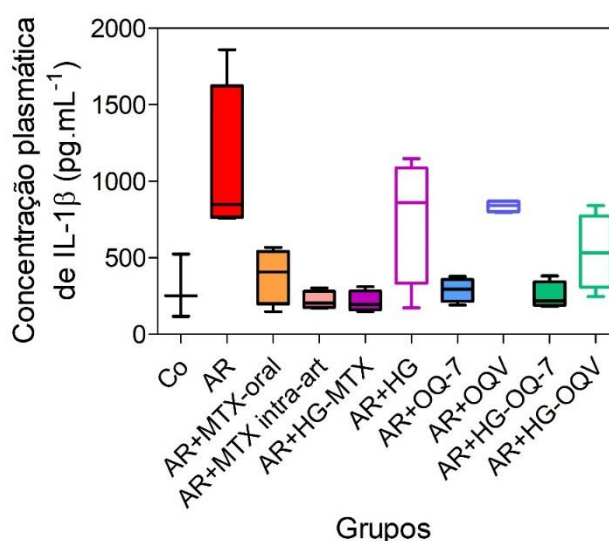
Fonte: DO AUTOR (2020)

Os resultados de von Frey apresentaram uma variância muito alta. A alta variabilidade das respostas pode ser inerente à subjetividade do analista na interpretação da resposta do animal. Além disso, em virtude do grande número de animais, foi impossível testá-los simultaneamente. Isso constitui um problema em estudos comportamentais porque por mais que se tente controlar as condições experimentais, os fatores externos não podem ser reproduzidos.

### 5.5.2 Quantificação de IL-1 $\beta$ plasmática

Outra forma de se avaliarem os diferentes tratamentos foi a pesquisa da citocina pró-inflamatória, IL-1 $\beta$  no plasma. A inflamação articular também foi evidenciada pela elevação significativa do teor plasmático de IL-1 $\beta$  ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo Co (FIGURA47). A pesquisa de citocina pró-inflamatória demonstrou que nos animais com artrite tratados com todas as formulações contendo fármaco (MTX oral, MTX i.a., HG-MTX, OQ-7 e HG-OQ7) e com os veículos HG e HG-OQV apresentaram IL-1 $\beta$  plasmática equivalente à de Co ( $P > 0,05$ ) e inferior a AR ( $P < 0,05$ ). O tratamento com o veículo OQV ( $P > 0,05$ ) não foi capaz de reverter a elevação de IL-1 $\beta$  resultante da artrite induzida.

Figura 47 - Efeito de diferentes tratamentos sobre a concentração plasmática de IL-1 $\beta$



Legenda: IL= interleucina  
Fonte: DO AUTOR (2020)

### 5.5.3 Avaliação histológica da articulação tibiofemoral

A avaliação histológica da articulação tibiofemoral permitiu acessar o nível de modificações estruturais induzidas pelo processo inflamatório, em resposta a cada tratamento, e pelas formulações aplicadas em animais sadios. Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a histologia da membrana e cartilagem sinovial da articulação tibiofemoral encontram-se plotados na Figura 48 e ilustrados nas Figuras 49 e 50.

A infiltração de células inflamatórias, provocada pela indução da artrite, promoveu o desaparecimento dos adipócitos presentes na sinóvia de ratos sadios. Nenhum dos tratamentos foi suficiente para reverter tal efeito, entretanto nenhum deles foi capaz de induzi-lo na ausência de artrite.

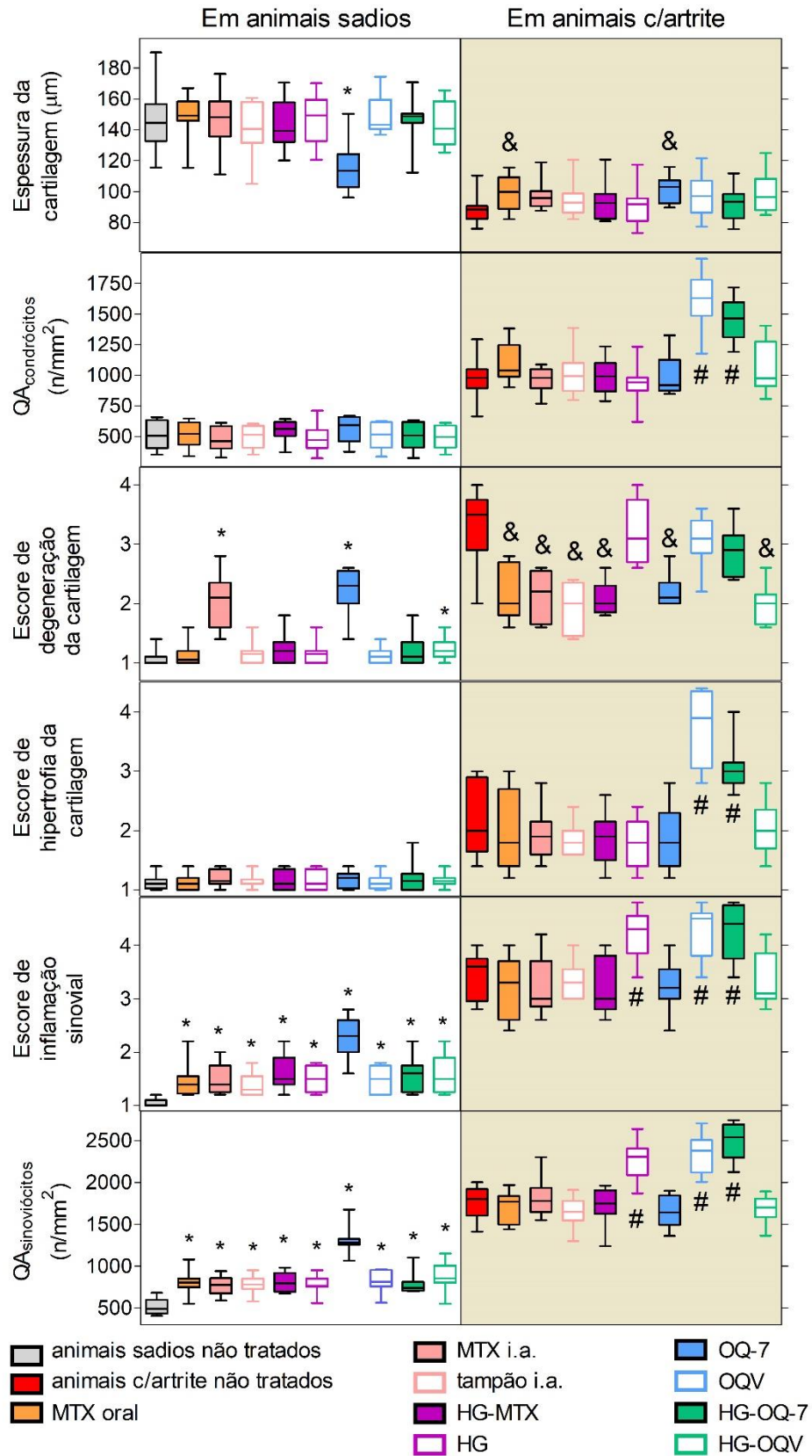
A indução da artrite nos animais elevou ( $P < 0,05$ ) os seguintes parâmetros: escore de degeneração da cartilagem, escore de hipertrofia da cartilagem, escore de inflamação sinovial e do QA de condrócitos e sinoviócitos. Outra alteração histológica decorrente do processo inflamatório foi a redução da espessura da cartilagem ( $P < 0,05$ ).

Os parâmetros QA de condrócitos, escore de hipertrofia da cartilagem, escore de inflamação sinovial e QA de sinoviócitos não foram alterados ( $P > 0,05$ ) por nenhum dos tratamentos contendo fármaco. Entretanto, tais parâmetros foram relevantes para se verificar a irritabilidade dos veículos HG e OQV.

Por outro lado, todos os tratamentos contendo MTX, exceto HG-OQ-7, melhoraram ( $P < 0,05$ ) o escore de degeneração da cartilagem. Tal resultado é bastante condizente com a redução observada na IL-1 $\beta$  plasmática, pois tal mediador já foi relacionado a dano à cartilagem (JOOSTEN *et al.*, 1999; KAY; CALABRESE, 2004).

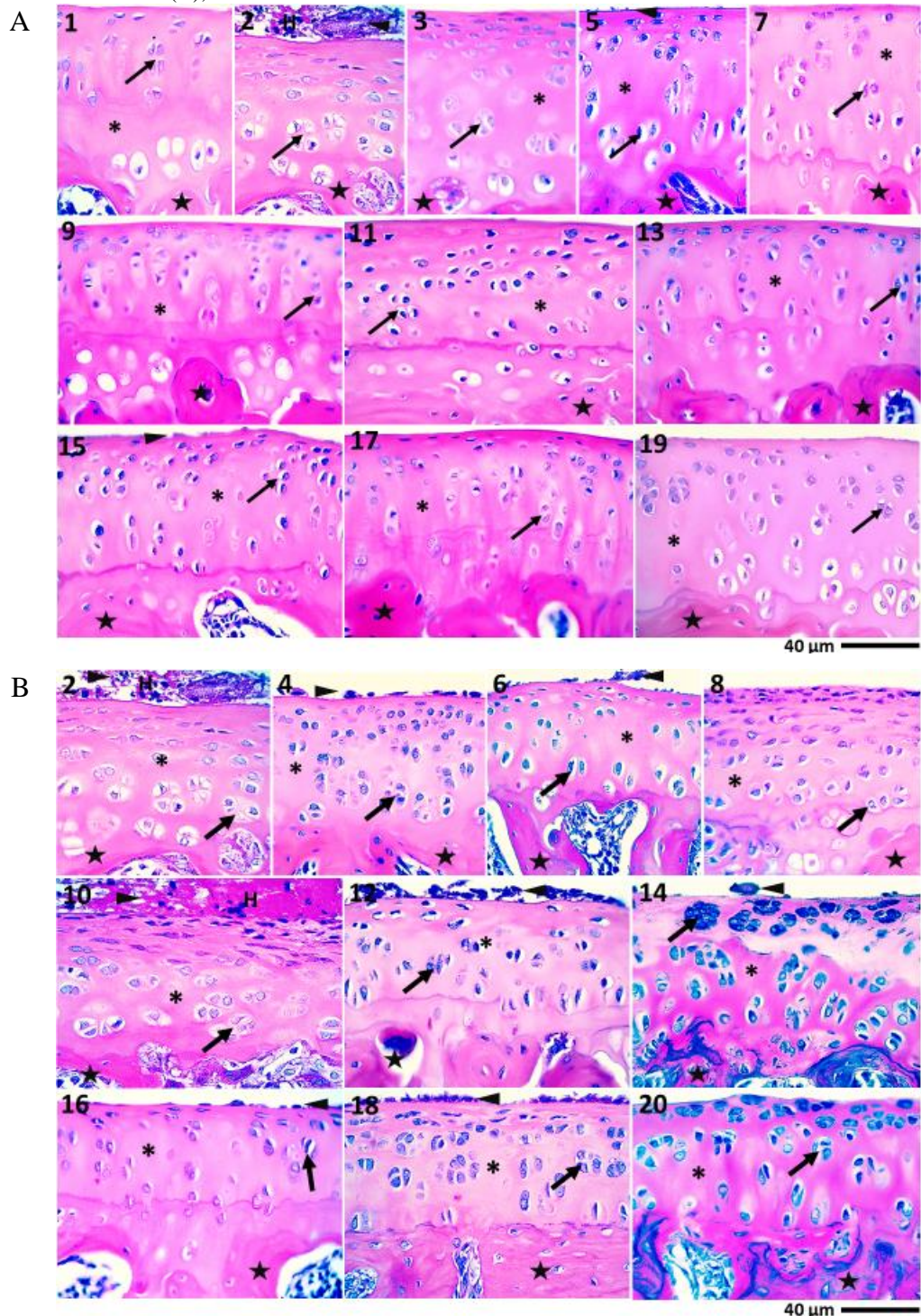
A redução do escore de degeneração da cartilagem foi o único parâmetro histológico melhorado pelo tratamento MTX i.a. Entretanto, seu veículo, tampão i.a. proporcionou o mesmo benefício. Portanto, a redução da atividade inflamatória nesse caso pode ser decorrente da irrigação da cavidade articular e não da administração do MTX livre em solução.

Figura 48 - Efeitos dos tratamentos sobre a histologia da articulação tíbio-femoral



Legenda: QA=densidade de n\u00famero; \*= efeito inflamat\u00f3rio em animais sadios; &= redu\u00e7\u00e3o da atividade inflamat\u00f3ria em animais com artrite induzida; #= exacerba\u00e7\u00e3o da rea\u00e7\u00e3o inflamat\u00f3ria em animais com artrite induzida. Fonte: DO AUTOR (2020)

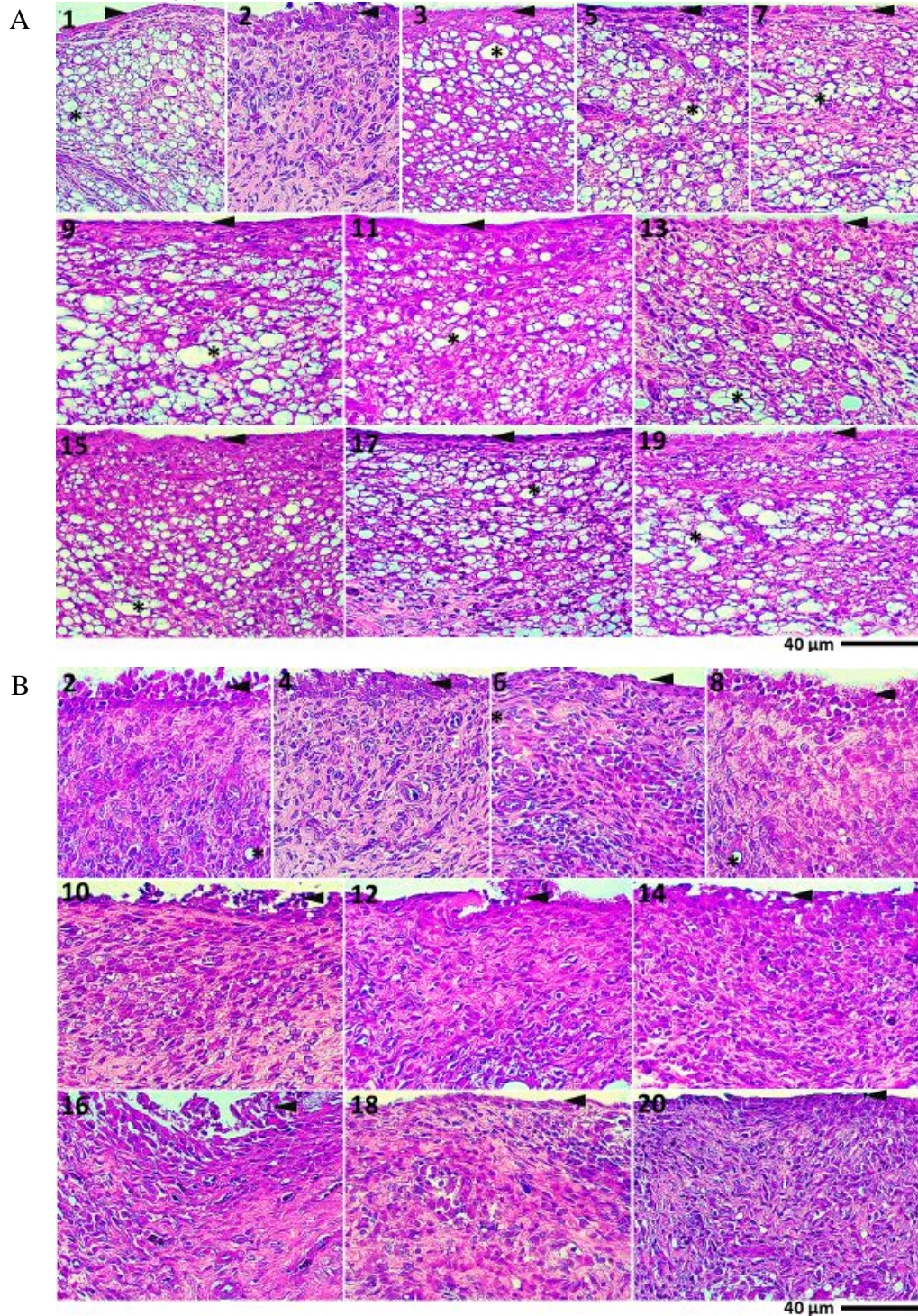
Figura 49 – Imagens da cartilagem da articulação tibiofemoral de ratos saudáveis (A, exceto grupo AR) e ratos com artrite induzida (B), submetidos aos diversos tratamentos



Legenda: 1=Co; 2=AR; 3=Co+tampão i.a.; 4=AR+tampão i.a.; 5=Co+MTX i.a.; 6=AR+MTX i.a.; 7= Co+HG-OQV; 8=AR+HG-OQV; 9=Co+HG; 10=AR+HG; 11=Co+HG-MTX; 12=AR+HG-MTX; 13=Co+OQV; 14=AR+OQV; 15=Co+OQ-7; 16=AR+OQ-7; 17=Co+MTX oral; 18=AR+MTX oral; 19=Co+HG-OQ-7; 20=AR+HG-OQ-7; seta= condrócitos; cabeça da seta=pannus; asterisco=matriz cartilaginosa; estrela=osso subcondral; H=foco hemorrágico.

Fonte: DO AUTOR (2020)

Figura 50 – Imagens da sinóvia da articulação tibiofemoral de ratos saudáveis (A, exceto grupo AR) e ratos com artrite induzida (B), submetidos aos diversos tratamentos



Legenda: 1=Co; 2=AR; 3=Co+tampão i.a.; 4=AR+tampão i.a.; 5=Co+MTX i.a.; 6=AR+MTX i.a.; 7= Co+HG-OQV; 8=AR+HG-OQV; 9=Co+HG; 10=AR+HG; 11=Co+HG-MTX; 12=AR+HG-MTX; 13=Co+OQV; 14=AR+OQV; 15=Co+OQ-7; 16=AR+OQ-7; 17=Co+MTX oral; 18=AR+MTX oral; 19=Co+HG-OQ-7; 20=AR+HG-OQ-7; cabeça de seta=epitélio sinovial; asterisco=adipócito.

Fonte: DO AUTOR (2020)

HG-MTX apresentou o mesmo desempenho que MTX i.a. Seu veículo, HG, embora tenha reduzido o nível plasmático de IL-1 $\beta$ , exacerbou a inflamação sinovial nos animais com artrite. Esse resultado denota que a segurança dos hidrogéis à base de poloxâmeros precisa ser melhor investigada. Há relatos sobre o efeito anti-inflamatório de poloxâmero 188 *in vivo* (HUNTER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2018) e *in vitro* (HARTING *et al.*, 2015; HOKETT *et al.*, 2000), porém constatou-se aqui que a associação de poloxâmero 188 e poloxâmero 407 foi pró-inflamatória.

O tratamento com MTX oral, além de melhorar o escore de degeneração da cartilagem e reduzir a IL-1 $\beta$  plasmática, amenizou a redução da espessura da cartilagem. A finalidade do grupo AR+MTX oral foi funcionar como um controle positivo de tratamento, sendo que a dosagem empregada foi embasada em dados da literatura que relatam sua eficiência na remissão de artrite reumatoide em ratos (BENDELE *et al.*, 1999). Além disso, na prática clínica atual o MTX é empregado principalmente por via oral para tratamento da artrite reumatoide e, portanto, seria importante comparar o desempenho obtido por tal via de administração com o das novas formulações propostas neste trabalho.

OQ-7, formulação que consiste em MTX incorporado aos PECs de oligoquitosana, também reduziu o escore de degeneração da cartilagem e a concentração plasmática de IL-1 $\beta$  e atenuou a redução da espessura da cartilagem. Além disso, foi a única formulação contendo fármaco que elevou o limiar nociceptivo de animais com artrite. Seu veículo, OQV, não demonstrou qualquer benefício e exacerbou a inflamação nos animais com artrite tanto a nível sinovial quanto pela elevação do escore de hipertrofia da cartilagem e do QA de condrócitos.

HG-OQ-7, que corresponde aos PECs contendo MTX dispersos em hidrogel, reduziu a concentração plasmática de IL-1 $\beta$ , mas não melhorou nenhum dos parâmetros histológicos, pelo contrário, agravou o processo inflamatório nos animais com artrite, elevando o escore de degeneração da cartilagem, escore de hipertrofia da cartilagem, QA de condrócitos e QA de sinoviócitos. A ação irritante demonstrada por HG-OQ-7 parece não estar relacionada a seu veículo, HG-OQV, o qual melhorou o escore de degeneração da cartilagem. Como dito anteriormente, HG-OQV também melhorou o limiar nociceptivo dos animais com artrite induzida (dia 12).

Os efeitos benéficos de HG-OQV provavelmente decorrem da ação anti-inflamatória da oligoquitosana, a qual já foi reportada tanto *in vitro* (CHUNG; PARK; PARK, 2012; HYUNG *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SEO *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2012;

YANG *et al.*, 2018a; YOON *et al.*, 2007) quanto *in vivo* (DAVYDOVA *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; MEI *et al.*, 2013; QIAO; BAI; DU, 2011; YOON *et al.*, 2008), inclusive em humanos (HYUNG *et al.*, 2006). A redução da inflamação propiciada pela oligoquitosana foi evidenciada por: redução na secreção e expressão de citocinas pró-inflamatórias (CHUNG; PARK; PARK, 2012; HUANG *et al.*, 2016; HYUNG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2002; QIAO; BAI; DU, 2011; SEO *et al.*, 2003; TU *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018a; YOON *et al.*, 2007), como TNF- $\alpha$  e IL-6; aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias (DAVYDOVA *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016); redução na expressão da sintetase indutível de óxido nítrico (HYUNG *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2012); inibição da ativação do fator nuclear (NF)-kappaB (SEO *et al.*, 2003); aumento da atividade de enzimas antioxidantes (QIAO; BAI; DU, 2011; YOON *et al.*, 2008); redução na expressão de ciclo-oxigenase 2 e aumento da expressão de hemi-oxigenase 1 (HYUNG *et al.*, 2016). OQV, assim como HG-OQV, também é constituído por oligoquitosana e se mostrou irritativo. A diferença de efeito entre os dois veículos pode ser em virtude da diferença de pH, que em OQV é 5,9 e em HG-OQV, 6,6, portanto mais compatível com o pH sinovial.

Portanto, os estudos *in vivo* indicaram que a formulação OQ-7 é bastante promissora pois, em administração única e localizada, foi capaz de proporcionar os mesmos benefícios obtidos com a administração oral diária de MTX, nos animais com artrite induzida, tanto no que se refere ao reparo da cartilagem quanto ao controle do nível plasmático de IL-1 $\beta$ . Além disso, reduziu a hiperalgesia na etapa inicial do processo inflamatório, o que não foi observado com o tratamento MTX oral. Cumpre ressaltar que novos estudos precisam ser conduzidos em virtude da irritabilidade desencadeada por seu veículo. Apesar disso, o carreamento de MTX pelos PECs de oligoquitosana demonstrou eficácia no controle da artrite a partir de uma dose única de 175,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , a qual equivale a 23,4% da dose total administrada por via oral, indicando o potencial deste sistema para tratamento desta patologia.

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar *in vivo* sistemas de liberação contendo metotrexato, adequados para administração intra-articular, visando representarem alternativas para tratamento de artrite reumatoide. Como até o momento não se conhece cura para tal patologia, os pacientes por ela acometidos necessitam de medicação contínua e, não raro, de politerapia. O uso prolongado de medicamentos e principalmente de associações medicamentosas pode aumentar a incidência e/ou exacerbar a manifestação de efeitos adversos, comprometendo a qualidade de vida dos usuários e a adesão ao tratamento. Portanto, considera-se que a administração intra-articular possa ser útil no sentido de otimizar o efeito terapêutico e reduzir a exposição sistêmica ao fármaco.

Entretanto, a administração intra-articular tem suas limitações. Entre elas está o desconforto do paciente no momento da aplicação. Além do procedimento ser doloroso, o ato mecânico da injeção pode ocasionar lesão articular se for repetido dentro de curto intervalo de tempo. Portanto, as administrações por via intra-articular devem ser espaçadas por várias semanas. Além disso, a depuração das articulações ocorre de forma muito rápida. A soma desses fatores leva à necessidade de que a formulação seja capaz de se concentrar no espaço articular, formando um depósito, a partir do qual o fármaco seja liberado gradativamente. Para tentar atender a esta demanda foram desenvolvidos PECs, hidrogéis e associações de ambos.

Os PECs foram obtidos pela complexação polieletrólítica dos grupos amínicos presentes na quitosana (polimérica ou oligomérica) com carboxilas desprotonadas do polímero aniônico HPM Cp. Como a molécula de MTX possui esses mesmos grupos ionizáveis sua incorporação foi possível pela mesma técnica.

A complexação polieletrólítica é uma técnica muito simples, rápida e de baixo custo, porém um desafio à sua aplicação é a obtenção de carreadores pequenos e com uniformidade de tamanho. Tais características desfavoráveis foram observadas nos PECs de quitosana polimérica e puderam ser superadas com a modificação da força iônica do meio. Avaliando-se diferentes concentrações de cloreto de sódio adicionadas às dispersões poliméricas, foi possível constatar que a utilização de 200 ou 300 mmol.L<sup>-1</sup> do eletrólito proporcionou redução significativa do tamanho e do PdI, sem prejudicar o teor de fármaco incorporado ao carreador. A fim de se empregar a menor concentração efetiva de cloreto de sódio, QS200 foi selecionado como o PEC de quitosana polimérica mais promissor.

Devido a sua maior uniformidade, QS200 foi selecionado para o estudo de crioproteção. Proteger a estrutura dos PECs durante o processo de liofilização é um desafio que merece ser pesquisado porque tal processamento pode permitir a obtenção de formulações mais concentradas ou talvez prolongar a estabilidade dos PECs. Outra motivação é que algumas caracterizações importantes, como a espectroscopia no IV e a análise térmica, requerem que o material esteja liofilizado. Neste trabalho pesquisamos os açúcares mais reportados como crioprotetores para PECs de quitosana, a trealose e o manitol (ABDELWAHED *et al.*, 2006), e propusemos uma nova alternativa, a manose. Os resultados indicaram a manose como melhor crioprotetor para QS200 porque permitiu a conservação do tamanho, do PdI, da EE e do perfil de liberação *in vitro*.

Os PECs obtidos a partir da oligoquitosana foram um pouco maiores que os da quitosana, mas se mostraram tão uniformes quanto. Devido ao fato da oligoquitosana ser hidrossolúvel, os PECs puderam ser obtidos num pH mais favorável à solubilização do MTX, o que proporcionou um diferencial muito importante: os PECs de oligoquitosana apresentaram uma capacidade de incorporação de fármaco muito maior, de forma que na obtenção de OQ-7 utilizou-se uma concentração de MTX quatro vezes superior à usada para QS200 e sua EE foi mais que o dobro da obtida com a quitosana polimérica.

QS200 e OQ-7 foram satisfatoriamente caracterizados por DSC, TG e espectroscopia no IV. Os resultados proporcionados por tais técnicas indicaram êxito no processo de complexação polieletrólítica, uma vez que os PECs apresentaram características distintas em relação a seus materiais de partida isolados ou misturados fisicamente. Por microscopia de força atômica foi possível visualizar as partículas e constatar que OQ-7 é maior que QS200 e possui menor tendência a agregação. Evitar a formação de agregados é fundamental para a obtenção de formulações homogêneas e conseqüentemente com resultados mais reprodutíveis.

Além dos PECs, outra estratégia aqui proposta para se tentar aumentar o tempo de permanência do fármaco dentro da articulação foi o uso de hidrogel termorresponsivo, constituído por poloxâmeros. As dispersões de poloxâmeros normalmente se apresentam fluídas a temperatura ambiente, mas com a elevação da temperatura seus resíduos mais hidrofóbicos, PPO, desidratam. Para que haja uma estabilização do sistema, as cadeias poliméricas passam a se organizar em micelas nas quais os resíduos menos hidrofóbicos, PEO, se posicionam externamente, minimizando o contato de PPO com o meio aquoso. Tal organização aumenta a viscosidade da matriz e propicia a gelificação, a qual ocorre em temperatura dependente da concentração e dos tipos de poloxâmeros utilizados (MEZNARICH;

LOVE, 2011). Uma combinação de poloxâmeros 407 e 188, na proporção 2:1, foi escolhida com base em estudos de outros autores (DOS SANTOS *et al.*, 2015), e utilizada na concentração de 30% (m.m<sup>-1</sup>), o que deu origem à formulação base, HG. Ao HG foram incorporados fármaco livre (HG-MTX), PECs de quitosana (HG-QS200) e de oligoquitosana (HG-OQ-7). Embora por reometria oscilatória, aplicando-se uma rampa de aquecimento até 60°C, não tenha sido possível determinar a temperatura de gelificação de HG, HG-MTX e HG-QS, constatou-se que os hidrogéis desenvolvidos adquiriram consistência suficiente para impedir o escoamento entre 36 e 37°C. A 37°C foi possível inclusive caracterizá-los quanto a seu perfil de textura, determinando sua resistência a compressão, sua capacidade de adesão e sua coesão. A seringueabilidade dos hidrogéis também foi determinada e assegurou que os hidrogéis foram passíveis de serem injetados a temperatura ambiente. Portanto, o perfil termorresponsivo almejado foi obtido com êxito.

Concluído o desenvolvimento e caracterização dos sistemas, a próxima etapa foi a determinar o perfil de liberação. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que o perfil de liberação de MTX a partir de QS200 e de OQ-7 é similar ao de uma solução de fármaco livre, ou seja, os PECs não modificaram a velocidade de liberação do MTX. O HG-MTX apresentou um perfil diferenciado em relação à solução de fármaco livre, porém não o suficiente para prolongar por muito tempo a liberação. Uma liberação mais lenta foi exibida pelas associações de PECs a hidrogel (HG-QS200 e HG-OQ-7) e as possíveis causas que levaram a esse efeito merecem ser pesquisadas em estudos posteriores.

Os três sistemas propostos, PECs, hidrogel e PECs associados a hidrogel, foram submetidos a prova de princípio em modelo animal. Entre os PECs, selecionou-se OQ-7 por ter apresentado maior EE. Além da possibilidade de maior carregamento, o pH de OQ-7 é mais compatível com o articular, visto que o fluído sinovial de pacientes com artrite é 6,8 (WARD; STEIGBIGEL, 1978). Portanto, OQ-7, HG-MTX e HG-OQ-7 foram avaliados como tratamento intra-articular para ratos Wistar, nos quais se induziu artrite reumatoide. Paralelamente as respectivas formulações vazias (sem fármaco), OQV, HG e HG-OQV, também foram avaliadas. Para fins comparativos, também se avaliou o tratamento intra-articular com solução de MTX. Como controle positivo de tratamento utilizou-se solução de MTX por via oral (BENDELE *et al.*, 1999).

Para avaliar o desempenho dos sistemas desenvolvidos foi utilizado um modelo animal de artrite e os parâmetros avaliados *in vivo* foram o limiar nociceptivo, a concentração plasmática de IL-1 $\beta$  e a histologia da cartilagem e membrana sinovial.

Os experimentos *in vivo* apontaram que o tratamento com OQ-7, formulação onde o MTX está incorporado aos PECs de oligoquitosana, administrado via intra-articular em dose única, apresentou um desempenho tão eficaz quanto a administração oral diária de solução de MTX para o controle do processo inflamatório da articulação. Esse foi um resultado bastante promissor devido à possibilidade de se obter ação terapêutica com uma exposição sistêmica ao fármaco reduzida. É interessante notar que OQ-7 não apresentou *in vitro* um perfil de liberação mais lento em relação à solução de fármaco livre, ao contrário do que foi obtido a partir dos sistemas com hidrogel ou associação de PECs a hidrogel. Talvez *in vivo* tenha ocorrido uma interação de OQ-7 com o ácido hialurônico presente no fluido sinovial, visto que ambos possuem cargas opostas, e tal interação tenha proporcionado uma liberação mais gradativa do fármaco suficiente para contornar a rápida depuração articular. Tal hipótese pode ser investigada em estudos futuros.

Constatou-se também que o veículo de OQ-7, OQV, promoveu irritação à nível de cartilagem e sinóvia, exacerbando a artrite induzida nos animais. Isso aponta para a necessidade de se investigar melhor a formulação e efetuar ajustes necessários para maior segurança. Isso provavelmente poderá ser alcançado visto que outro veículo, HG-OQV, amenizou a inflamação articular. Provavelmente tal ação anti-inflamatória deva-se a ação da oligoquitosana, a qual já foi reportada por outros autores (CHUNG; PARK; PARK, 2012; DAVYDOVA *et al.*, 2016; HYUNG *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SEO *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2018a; YOON *et al.*, 2007). Outro motivo para acreditarmos que a oligoquitosana tenha sido responsável pelo efeito anti-inflamatório de HG-OQV foi a constatação de que HG, hidrogel base não associado aos PECs, acentuou a inflamação dos animais com artrite. Portanto, apesar do efeito irritativo de seu veículo, OQ-7 se revelou um sistema promissor para controle do processo inflamatório artrítico.

Enfim, com base nos resultados deste trabalho, foram lançadas propostas de pesquisas posteriores no sentido de aumentar a segurança da administração dos veículos propostos e compreender melhor a liberação do fármaco *in vivo* a partir de tais sistemas. Consideramos nossos resultados de grande relevância para melhorar o arsenal de opções terapêuticas para tratamento de artrite reumatoide. Tanto a possibilidade de tratamento localizado quanto a redução na frequência de administração podem prevenir o desenvolvimento de reações adversas e possíveis interações medicamentosas, uma vez que os pacientes com artrite reumatoide, na maioria das vezes, necessitam de politerapia. Portanto, de acordo com os estudos pré-clínicos, o tratamento intra-articular, em dose única, com MTX incorporado a PECs de oligoquitosana

demonstrou potencial para favorecer a adesão à terapia medicamentosa e melhorar a qualidade de vida dos usuários.

## 7. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos PECs contendo MTX com tamanho na faixa de 260 a 590 nm, dimensões que permitem a internalização das partículas pelas células. Além disso, os PECs apresentaram carga superficial positiva, o que favorece sua interação com as glicoproteínas negativas presentes na membrana das células do sistema imune.

Além de apresentarem as características físico-químicas desejáveis, os PECs foram obtidos por meio de uma técnica de simples execução, que é rápida, não requer o uso de equipamentos sofisticados e nem de solventes orgânicos ou reagentes tóxicos. Tais aspectos são importantes tanto para a preservação ambiental quanto para reduzir os custos financeiros associados ao processo produtivo.

Foi possível preservar as características físico-químicas dos PECs durante o processo de liofilização. Isso representa um quesito relevante quando se considera a possibilidade de transformar a formulação em um produto comercial, uma vez que pode propiciar um maior tempo de prateleira, permitir a concentração do princípio ativo e facilitar o armazenamento.

O sucesso na incorporação de MTX aos PECs pode representar também uma melhora na biodisponibilidade do fármaco, visto que trata-se de uma molécula hidrofílica, com baixa permeabilidade e pouco solúvel em água. Driblar tais desvantagens físico-químicas, embora não represente a preocupação primordial em sistemas destinados ao tratamento intra-lesional, é um ganho importante para formulações que empreguem outras vias de administração.

Paralelamente foram desenvolvidos hidrogéis termorresponsivos, os quais são fluídos à temperatura ambiente e rapidamente iniciam a gelificação quando são submetidos à temperatura corporal. Tal comportamento torna esses sistemas ideais para aplicação intra-articular porque podem ser injetados a partir de seringa e logo adquirem consistência suficiente para não serem depurados tão rapidamente do espaço sinovial. Além da formulação ter potencial para permanecer por mais tempo na articulação, constatou-se *in vitro* que a associação dos PECs ao hidrogel permitiu um controle efetivo da liberação do fármaco. Entretanto, tal controle da liberação *in vitro* não resultou em vantagem quanto ao desempenho farmacológico *in vivo*, indicando que interações das formulações com o ambiente sinovial merecem investigações posteriores.

Apesar dos sistemas de liberação terem sido desenvolvidos a partir de excipientes com biocompatibilidade reportada, cuja aplicação no ramo farmacêutico é amplamente reconhecida, constatou-se a necessidade de maiores estudos quanto à segurança dos veículos.

A avaliação pré-clínica dos sistemas foi promissora. A administração intra-articular, em dose única, de MTX incorporado a PECs de oligoquitosana, foi tão efetiva no controle da artrite induzida em animais quanto a administração oral diária de MTX, adotada como controle positivo de tratamento. Portanto, os objetivos primordiais do trabalho foram alcançados com êxito.

## REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. *et al.* Freeze-drying of nanoparticles : Formulation , process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688–1713, 2006.

ABOU-ELNOUR, M. *et al.* Triamcinolone acetone-loaded PLA/PEG-PDL microparticles for effective intra-articular delivery: synthesis, optimization, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 309, n. March, p. 125–144, 2019.

ABOU-ELNOUR, M. *et al.* Microparticles in thermoresponsive/bioadhesive hydrogels as a novel integrated platform for effective intra-articular delivery of triamcinolone acetone. **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 6, p. 1963-1978, 2020.

ADAN, N. *et al.* Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3902–3913, 2013.

ADHIKARI, H. S.; YADAV, P. N. Anticancer activity of chitosan , chitosan derivatives , and their mechanism of action. **International Journal of Biomaterials**, v. 1, p. 1–29, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Consulta a medicamentos e hemoderivados**. [Brasília], [2019?]. Disponível em: [portal.anvisa.gov.br/medicamentos/consultas](http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/consultas). Acesso em: 9 out. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). Consulta Pública nº 129. **Diário Oficial da União de 15 de fev. de 2016**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/legislacoes/abifisa-consulta-publica-n-129-de-12-de-fevereiro-de-2016.pdf> . Acesso em 22 set. 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Consultas/medicamentos**. [Brasília], [2017?]. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 set. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares**. Brasília, DF, fev. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). Resolução da Diretoria Colegiada nº 166. **Diário Oficial da União nº 141**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acesso em: 10 abr. 2018.

AHMED, O. A. *et al.* Optimization of self-nanoemulsifying systems for the enhancement of in vivo hypoglycemic efficacy of glimepiride transdermal. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 7, p. 1005–1013, 2014.

AHMED, S. *et al.* A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 849–862, 2018.

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation , characterization , and potential application of chitosan , chitosan derivatives , and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483–507, 2016.

AI, J.; LIAO, W.; REN, Z. Enhanced anticancer effect of copper-loaded chitosan nanoparticles against osteosarcoma. **RSC Advances**, v. 7, p. 15971–15977, 2017.

AKILO, O. D. *et al.* In situ thermo-co-electroresponsive mucogel for controlled release of bioactive agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, p. 255–270, 2019.

AL-MALAQ, H. M.; AL-ARFAJ, H. F.; AL-ARFAJ, A. S. Adverse drug reactions caused by methotrexate in Saudi population. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 4, p. 301–305, 2012.

ALAM, M. M. *et al.* Endogenous inspired biomineral-installed hyaluronan nanoparticles as pH-responsive carrier of methotrexate for rheumatoid arthritis. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 62–72, 2017.

ALBUQUERQUE, J. *et al.* Solid lipid nanoparticles: A potential multifunctional approach towards rheumatoid arthritis theranostics. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11103–11118, 2015.

ALEXA, I. F. *et al.* A comparative study on long-term MTX controlled release from intercalated nanocomposites for nanomedicine applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 135–139, 2013.

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 273–286, 2018.

AMBHORE, N. P.; DANDAGI, P. M.; GADAD, A. P. Formulation and comparative evaluation of HPMC and water soluble chitosan-based sparfloxacin nanosuspension for ophthalmic delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, p. 48–56, 2016.

ANRAKU, M. *et al.* Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, n. March, p. 141–149, 2018.

ANTONIOU, J. *et al.* Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 137–146, 2015.

ARACHCHIGE, M. C. M.; RESHETNYAK, Y. K.; ANDREEV, O. A. Advanced targeted nanomedicine. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 88–97, 2015.

ARTHANARI, S. *et al.* Chitosan – HPMC-blended microspheres as a vaccine carrier for the delivery of tetanus toxoid. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. Aug. 2014, p. 517–523, 2014.

ASAI, S. *et al.* Influence of methotrexate on gastrointestinal symptoms in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 22, p. 207–213, 2019.

ASTHANA, S. *et al.* Overexpressed macrophage mannose receptor targeted nanocapsules-mediated cargo delivery approach for eradication of resident parasite: In vitro and in vivo studies. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 8, p. 2663–2677, 2015.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AYYAPPAN, S. *et al.* Molecular structure , vibrational spectra and DFT molecular orbital calculations ( TD-DFT and NMR ) of the antiproliferative drug Methotrexate. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 77, p. 264–275, 2010.

AZUMA, K. *et al.* Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 33–49, 2015.

BANERJEE, A.; BANDOPADHYAY, R. Use of dextran nanoparticle : A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 295–301, 2016.

BARAR, J. Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters? **Bioimpacts**, v. 5, n. 3, p. 113–115, 2015.

BARBOSA, S. *et al.* The importance of the relationship between mechanical analyses and

- rheometry of mucoadhesive thermoresponsive polymeric materials for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, n. April, 2017.
- BARD, D. R.; KNIGHT, C. G.; PAGE-THOMAS, D. P. Effect of the intra-articular injection of lutetium-177 in chelator liposomes on the progress of an experimental arthritis in rabbits. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 3, n. 3, p. 237–242, 1985.
- BELLINI, D. *et al.* An in situ gelling system for bone regeneration of osteochondral defects. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 642–650, 2015.
- BENDELE, A. *et al.* Animal models of arthritis : Relevance to human disease . **Toxicologic Pathology**, v. 27, p. 134–142, 1999.
- BERTOLI, F. *et al.* The intracellular destiny of the protein corona: a study on its cellular internalization and evolution. **ACS Nano**, v. 10, p. 10471–10479, 2016.
- BETRE, H. *et al.* A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 115, p. 175–182, 2006.
- BHISE, K. S. *et al.* Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling , erosion , and drug release from chitosan matrices. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. 110–118, 2007.
- BIANCHI, G. *et al.* Methotrexate and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence Regarding Subcutaneous Versus Oral Routes of Administration. **Advances in Therapy**, v. 33, n. 3, p. 369–378, 2016.
- BOECHAT, A. L. *et al.* Methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules are highly effective in the control of inflammation in synovial cells and a chronic arthritis model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6603–6614, 2015.
- BOLOGNA, C. *et al.* METHOTREXATE CONCENTRATIONS IN SYNOVIAL MEMBRANE AND TRABECULAR AND CORTICAL BONE IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 12, p. 1770–1773, 1994.
- BONI, F. I. *et al.* Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73–82, 2018a.
- BONI, F. I. *et al.* Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the

- intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73–82, 2018b.
- BOURGANIS, V. *et al.* Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 111, p. 44–60, 2017.
- BRANCO, J. C. *et al.* Utilization of Subcutaneous Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Patients After Failure or Intolerance to Oral Methotrexate: A Multicenter Cohort Study. **Advances in Therapy**, v. 33, n. 1, p. 46–57, 2016.
- BRAUN, J. *et al.* Comparison of the clinical efficacy and safety of subcutaneous versus oral administration of methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 73–81, 2008.
- BREGOLI, L. *et al.* Nanomedicine applied to translational oncology : A future perspective on cancer treatment. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 81–103, 2016.
- BROOKS, P. J. *et al.* Pharmacokinetics of methotrexate administered by intramuscular and subcutaneous injections in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 1, p. 91–94, 1990.
- BROWN, K. E. *et al.* Gelatin/chondroitin 6-sulfate microspheres for the delivery of therapeutic proteins to the joint. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 12, p. 2185–2195, 1998.
- BRUSCHI, M. L. *et al.* Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 29–47, 2006.
- BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 318 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.
- 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. 99, n. 10, p. 4215–4227, 2007.
- BUTOESCU, N. *et al.* Dexamethasone-containing PLGA superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis. **Biomaterials**, v. 30, n. 9, p. 1772–1780, 2009.

- BUTOESCU, N.; JORDAN, O.; DOELKER, E. Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: A review of the factors influencing their performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 205–218, 2009.
- CALVO-ROMERO, J. M. Severe pancytopenia associated with low-dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 35, n. 12, p. 1575–1577, 2001.
- CANCINO-BERNARDI, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanomedicine. In: DE OLIVEIRA JR, O. *et al.* (Eds.). **Nanoscience and its applications**. 1 st ed. [s.l.] William Andrew, 2017. p. 71–85.
- CANELLA, K. M. N. D. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13–17, 2001.
- CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados para administração nasal de zidovudina**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2012.
- CASADIDIO, C. *et al.* Chitin and chitosans : characteristics , eco-friendly processes , and applications in cosmetic science. **Marine Drugs**, v. 17, p. 369–398, 2019.
- CHAE, K.-S.; SHIN, C.; SHIN, W.-S. Characteristics of cricket (*Gryllus bimaculatus*) chitosan and chitosan-based nanoparticles. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 631–639, 2018.
- CHANDAK, A. R.; VERMA, P. R. P. Design and development of hydroxypropyl methylcellulose ( HPMC ) based polymeric films of methotrexate : physicochemical and pharmacokinetic evaluations. **Yakugaku Zasshi**, v. 128, n. 7, p. 1057–1066, 2008.
- CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **The Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55–63, 1994.
- CHEN, M. *et al.* Folate receptor-targeting and reactive oxygen species-responsive liposomal formulation of methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, 2019.
- CHEN, Y. *et al.* Phytantriol-based in situ liquid crystals with long-term release for intra-articular administration. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 846–854, 2015.

CHEN, Z. *et al.* Development of brucine-loaded microsphere / thermally responsive hydrogel combination system for intra-articular administration. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 3, p. 628–635, 2012.

CHOI, K. Y. *et al.* Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 99, p. 82–94, 1 nov. 2012.

CHONDREX, I. **Protocol for the successful induction of collagen-induced arthritis (CIA) in rats**. RedmondChondrew, Inc., , 2015.

CHUNG, M. J.; PARK, J. K.; PARK, Y. IL. Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 453–459, 2012.

CIPRIANI, P. *et al.* Methotrexate in rheumatoid arthritis: Optimizing therapy among different formulations. Current and emerging paradigms. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 427–435, 2014a.

CIPRIANI, P. *et al.* Methotrexate in rheumatoid arthritis: Optimizing therapy among different formulations. Current and emerging paradigms. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 427–435, 2014b.

CIPRIANI, P. *et al.* Methotrexate in Rheumatoid Arthritis : Optimizing therapy among different formulations . Current and emerging paradigms mechanism of action. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 427–435, 2014c.

COKELAERE, S. M. *et al.* Sustained intra-articular release of celecoxib in an equine repeated LPS synovitis model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, n. August 2017, p. 327–336, 2018.

CONWAY, R. *et al.* Risk of liver injury among methotrexate users: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 2, p. 156–162, 2015.

CONWAY, R.; CAREY, J. J. Risk of liver disease in methotrexate treated patients. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 26, p. 1092–1100, 2017.

COSTA, C. N. *et al.* Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid / sodium acetate and acetic acid / sodium chloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 245–250, 2015.

- COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141–153, 2002.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.
- CRONSTEIN, B. N. Methotrexate and its mechanism of action. **Arthritis & Rheumatism**, v. 39, n. 12, p. 1951–1960, 1996.
- CRONSTEIN, B. N.; BERTINO, J. R. **Methotrexate**. Basel: Springer Basel AG, 2000. v. 53
- DAUTZENBERG, H. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: Polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl. **Macromolecules**, v. 30, n. 25, p. 7810–7815, 1997.
- DAVIGNON, J. L. *et al.* Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 52, n. 4, p. 590–598, 2013.
- DAVYDOVA, V. N. *et al.* Cytokine-inducing and anti-inflammatory activity of chitosan and its low-molecular derivative. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya**, v. 52, n. 5, p. 460–466, 2016.
- DE MENDIBURU, F. **Statistical Procedures for Agricultural Research**, 2017. Disponível em: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>
- DE OLIVEIRA, L. B. P.; ALVES, R. DE O. S. P.; PEREIRA, T. DE A. **Avaliação da solubilidade de metotrexato em microemulsões e cristais líquidos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.
- DE SOUZA FERREIRA, S. B. *et al.* Rheological, mucoadhesive and textural properties of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 55, p. 164–178, 2015.
- DERVIEUX, T.; ZABLOCKI, R.; KREMER, J. Red blood cell methotrexate polyglutamates emerge as a function of dosage intensity and route of administration during pulse methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 49, n. 12, p. 2337–2345, 2010.
- DHAON, P. *et al.* Oral Methotrexate in split dose weekly versus oral or parenteral

Methotrexate once weekly in rheumatoid arthritis: a short-term study. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 21, n. 5, p. 1010–1017, 2018.

DHAWADE, P. P.; JAGTAP, R. N. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 3, p. 1372–1382, 2012.

DING, L. *et al.* Impact of pH , ionic strength and chitosan charge density on chitosan / casein complexation and phase behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, n. April 2018, p. 133–141, 2019.

DIONÍSIO, M. *et al.* Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 102–113, 2013.

DIXON, W. J. EXPERIMENTAL OBSERVATIONS. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 441–462, 1980.

DOS SANTOS, A. C. M. *et al.* Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: Sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2391–2401, 2015.

DUAN, W.; LI, H. Combination of NF - kB targeted siRNA and methotrexate in a hybrid nanocarrier towards the effective treatment in rheumatoid arthritis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 58, p. 1–9, 2018.

DUAN, Y. *et al.* Novel in situ gel systems based on P123 / TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 322–330, 2015.

DUARTE, A. C. *et al.* Portuguese recommendations for the use of methotrexate in rheumatic diseases - 2016 update. **Acta reumatologica portuguesa**, v. 42, n. 2, p. 127–140, 2017.

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

DYONDI, D.; SARKAR, A.; BANERJEE, R. Joint Surface-Active Phospholipid-Mimetic Liposomes for Intra-Articular Delivery of Paclitaxel. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, p. 1–11, 2015.

- ELSAID, K. A. *et al.* Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 6, p. 1746–1755, 2005.
- ERDEMLI, O. *et al.* In vitro evaluation of effects of sustained anti-TNF release from MPEG-PCL-MPEG and PCL microspheres on human rheumatoid arthritis synoviocytes. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 4, p. 524–542, 2014.
- EUROPEAN Pharmacopoeia 6.0. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008.
- EVANS, C. H.; KRAUS, V. B.; SETTON, L. A. Progress in intra-articular therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 1, p. 11–22, 2014.
- Exponent Lite Software: Introduction to texture analysis.** TA-XT Plus, Stable Micro Systems, 2009.
- FERRARI, P. C. *et al.* In vitro characterization of coevaporates containing chitosan for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 557–563, 2009.
- FIEHN, C. *et al.* Targeted drug delivery by in vivo coupling to endogenous albumin : an albumin-binding prodrug of methotrexate ( MTX ) is better than MTX in the treatment of murine collagen-induced arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, p. 1188–1191, 2008.
- FIEHN, C. Methotrexate transport mechanisms : the basis for targeted drug delivery and  $\beta$  -folate-receptor-specific treatment. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 28, p. S40–S45, 2010.
- FILIPOVIC-GRCIC, J. *et al.* Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres : preparation and characterisation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 921–931, 2003.
- FIRTH, J.; CRITCHLEY, S. Treating to target in rheumatoid arthritis: biologic therapies. **British Journal of Nursing**, v. 20, p. 1284–1291, 2011.
- FRAGOULIS, G. E.; CONWAY, R.; NIKIPHOROU, E. Methotrexate and interstitial lung disease: Controversies and questions. A narrative review of the literature. **Rheumatology**, v. 58, n. 11, p. 1900–1906, 2019.
- FREAG, M. S.; SALEH, W. M.; ABDALLAH, O. Y. Exploiting polymer blending approach

for fabrication of buccal chitosan- based composite sponges with augmented mucoadhesive characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 120, p. 10–19, 2018.

FU, J.; SCHLENOFF, J. B. Driving forces for oppositely charged polyion association in aqueous solutions: enthalpic, entropic, but not electrostatic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 3, p. 980–990, 2016.

FURLANI, F. *et al.* Chitosan Acetylation Degree Influences the Physical Properties of Polysaccharide Nanoparticles: Implication for the Innate Immune Cells Response. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 10, p. 9794–9803, 2019.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 65, p. 1–9, 2012.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.

GARG, N. K. *et al.* Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF-  $\kappa$  B and FOXO1. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, n. 1–2, p. 301–320, 2016a.

GARG, N. K. *et al.* Effective transdermal delivery of methotrexate through nanostructured lipid carriers in an experimentally induced arthritis model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 17–24, 2016b.

GHOSH, S. *et al.* Methotrexate Aspasomes Against Rheumatoid Arthritis : Optimized Hydrogel Loaded Liposomal Formulation with In Vivo Evaluation in Wistar Rats. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 3, p. 1320–1336, 2017.

GOLDIE, I. *et al.* Synovial pH in Rheumatoid Knee-Joints I . The Effect of Synovectomy. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 40, p. 634–641, 1969.

GOMES, R. P. *et al.* Standardization of an experimental model suitable for studies on the effect of exercise on arthritis Padronização de modelo experimental adequado a estudos do efeito do exercício na artrite. **Einstein**, v. 11, n. 55 48, p. 76–82, 2013.

GOMIDES, A. P. M. *et al.* Causes of synthetic disease-modifying drug discontinuation in rheumatoid arthritis: Data from a large real-life cohort. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–8, 2019.

GONG, Y. *et al.* An improved injectable polysaccharide hydrogel : modified gellan gum for

long-term cartilage regeneration in vitro. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 1968–1977, 2009.

GONZÁLEZ-SUÁREZ, I. *et al.* Leukoencephalopathy due to Oral Methotrexate. **Cerebellum**, v. 13, p. 178–183, 2014.

GOODMAN, S. M.; CRONSTEIN, B. N.; BYKERK, V. P. Outcomes related to methotrexate dose and route of administration in patients with rheumatoid arthritis: A systematic literature review. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 272–278, 2015.

GOTTSCHALK, O. *et al.* Therapeutic effect of methotrexate encapsulated in cationic liposomes ( EndoMTX ) in comparison to free methotrexate in an antigen-induced arthritis study in vivo. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 44, p. 456–463, 2015.

GRENHA, A.; RODRIGUES, S. Pullulan-based nanoparticles : future therapeutic applications in transmucosal protein delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 4, n. 11, p. 1339–1341, 2013.

GUO, Q. *et al.* Rheumatoid arthritis : pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. **Bone Research**, v. 6, p. 1–14, 2018.

GUSTAFSON, H. H. *et al.* Nanoparticle uptake : The phagocyte problem. **Nano Today**, v. 10, n. 4, p. 487–510, 2015.

HA, Y. *et al.* Methotrexate-loaded multifunctional nanoparticles with near-infrared irradiation for the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 22, n. 146, p. 1–13, 2020.

HALAMODA-KENZAOU, B. *et al.* The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 48, p. 1–15, 2017.

HANSCH, C.; LEO, A. **Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995.

HAO, F. *et al.* Hybrid micelles containing methotrexate-conjugated polymer and co-loaded with microRNA-124 for rheumatoid arthritis therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 18, p. 5282–5297, 2019.

HARTING, M. T. *et al.* Effects of Poloxamer 188 on human PMN cells. **Surgery**, v. 144, n.

2, p. 198–203, 2015.

HAWBOLDT, J.; BADER, M. Intramuscular methotrexate-induced aseptic meningitis. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, p. 1906–1911, 2007.

HAZLEWOOD, G. S. *et al.* The comparative effectiveness of oral versus subcutaneous methotrexate for the treatment of early rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 6, p. 1003–1008, 2016.

HEMBRAM, K. C. *et al.* Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. May 2014, p. 305–314, 2016.

HERNÁNDEZ-VAENCIA, C. G. *et al.* Cross-linking chitosan into hydroxypropylmethylcellulose for the preparation of neem oil coating for postharvest storage of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*). **Molecules**, v. 24, p. 219–239, 2019.

HOEKSTRA, M. *et al.* Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 4, p. 645–648, 2004.

HOKETT, S. D. *et al.* Pluronic polyol effects on human gingival. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 5, p. 803–809, 2000.

HOLLANDER, J. L. *et al.* Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints; comparative effects of and use of hydrocortisone as a local antiarthritic agent. **Journal of the American Medical Association**, v. 147, n. 17, p. 1629–1635, 1951.

HOPE, H. F. *et al.* The predictors of and reasons for non-adherence in an observational cohort of patients with rheumatoid arthritis commencing methotrexate. **Rheumatology**, v. 59, n. 1, p. 213–223, 2020.

HRUBÝ, M.; FILIPPOV, S. K.; ŠTĚPÁNEK, P. Smart polymers in drug delivery systems on crossroads: Which way deserves following? **European Polymer Journal**, v. 65, p. 82–97, 2015.

HUANG, B. *et al.* Chitosan Oligosaccharide Reduces Intestinal Inflammation That Involves Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Activation in Lipopolysaccharide (LPS)-Challenged Piglets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 245–252, 2016.

- HUANG, Y.; LAPITSKY, Y. Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10392–10399, 2011.
- HUANG, Y.; LAPITSKY, Y. On the kinetics of chitosan/tripolyphosphate micro- and nanogel aggregation and their effects on particle polydispersity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 486, p. 27–37, 2017.
- HUI, A. Y. *et al.* A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 15–37, 2012.
- HUNTER, R. L. *et al.* Poloxamer 188 Inhibition of Ischemia / Reperfusion Injury : Evidence for a Novel Anti-adhesive Mechanism. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 40, n. 2, p. 115–125, 2010.
- HYUNG, J. H. *et al.* Involvement of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in anti-inflammatory action of chitosan oligosaccharides through MAPK activation in murine macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 793, n. May, p. 43–48, 2016.
- HYUNG, M. K. *et al.* Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 3, p. 427–430, 2006.
- IAGNOCCO, A. *et al.* Intra-articular methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: A clinical and sonographic study. **Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 159–163, 2006.
- INOUE, K.; YUASA, H. Molecular Basis for Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Therapy. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 29, n. 1, p. 12–19, 2014.
- INSTITUTE, N. C. **NCI alliance for nanotechnology**. Disponível em: [www.nano.cancer.gov/learn/](http://www.nano.cancer.gov/learn/). Acesso em: 23 out. 2016.
- JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 1, p. 27–47, 2010.
- JALEH, V. *et al.* Development and in vitro/in vivo evaluation of HPMC/chitosan gel containing simvastatin loaded self-assembled nanomicelles as potent wound healing agent. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 2, p. 276–288, 2018.

JAMES, H. P. *et al.* Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 2, p. 120–127, 2014.

JANKOVIC, D. *et al.* 90Y-labeled tin fluoride colloid as a promising therapeutic agent : preparation , characterization , and biological study in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 6, p. 2194–2203, 2012.

JANSEN, M. A. A. *et al.* Lipidoid-polymer hybrid nanoparticles loaded with TNF siRNA suppress inflammation after intra-articular administration in a murine experimental arthritis model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, n. April, p. 38–48, 2019.

JAY, R. Methotrexate revisited: considerations for subcutaneous administration in RA. **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 2, p. 201–205, 2015.

JIANG, Q. *et al.* Hypromellose succinate-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 85–91, 2016.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 457–463, 2003.

JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A. L.; HIORTH, M. Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 10, p. 919–929, 2012.

JONES, D. S. *et al.* Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 49–58, 2009.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 450–457, 1997.

JOOSTEN, L. A. B. *et al.* IL-1 alpha/beta prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 5049–5055, 1999.

JOSHI, N. *et al.* Towards an arthritis flare-responsive drug delivery system. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1275–1375, 2018.

JUNDT, J. X. *et al.* A comparison of low dose methotrexate bioavailability: oral solution, oral tablet, subcutaneous and intramuscular dosing. **The Journal of Rheumatology**, v. 20, n. 11, p. 1845–1849, 1993.

KANAZAWA, T. *et al.* Intra-articular retention and anti-arthritic effects in collagen-induced arthritis model mice by injectable small interfering RNA containing hydrogel. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 11, p. 1929–1933, 2017.

KARANDIKAR, H. *et al.* Systematic identification of thermal degradation products of HPMCP during hot melt extrusion process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, p. 252–258, 2015.

KASAAI, M. R. Calculation of Mark – Houwink – Sakurada ( MHS ) equation viscometric constants for chitosan in any solvent – temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477–488, 2007.

KAY, J.; CALABRESE, L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 43, p. iii2–iii9, 2004.

KHAN, Z. A.; TRIPATHI, R.; MISHRA, B. Methotrexate : a detailed review on drug delivery and clinical aspects. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 2, p. 151–169, 2012.

KHANG, G. *et al.* Biological evaluation of intervertebral disc cells in different formulations of gellan gum-based hydrogels. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, p. 265–275, 2015.

KIM, H. J. *et al.* Drug-loaded gold/iron/gold plasmonic nanoparticles for magnetic targeted chemo-photothermal treatment of rheumatoid arthritis. **Biomaterials**, v. 61, p. 95–102, 2015.

KIM, J. *et al.* Synergistic Oxygen Generation and Reactive Oxygen Species Scavenging by Manganese Ferrite/Ceria Co-decorated Nanoparticles for Rheumatoid Arthritis Treatment. **ACS Nano**, v. 13, n. 3, p. 3206–3217, 2019.

KIM, K. *et al.* An Injectable , Click-Cross-Linked Small Intestinal Submucosa Drug Depot for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, p. 3105–3117, 2016a.

KIM, K. S. *et al.* Injectable hyaluronic acid – tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 666–674, 2011.

KIM, M. S. *et al.* Water-soluble chitosan inhibits the production of pro-inflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid  $\beta$  peptide and interleukin-1 $\beta$ . **Neuroscience Letters**, v. 321, n. 1–2, p. 105–109, 2002.

KIM, S. R. *et al.* Increased localized delivery of piroxicam by cationic nanoparticles after intra-articular injection. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3779–3787, 2016b.

KIM, Y.; SONG, M.; RYU, J. Mechanisms underlying methotrexate-induced pulmonary toxicity. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 8, n. 4, p. 451–458, 2009.

KINDER, A. J. *et al.* The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice : treatment duration and incidence of adverse drug reactions. **Rheumatology**, v. 44, n. 1, p. 61–66, 2005.

KISSIN, E. Y. The “dirty little secret” exposed in the 2013 EULAR recommendations for rheumatoid arthritis therapy. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 7, p. 1114–1116, 2014.

KOLLI, V. K. *et al.* Neutrophil Infiltration and Oxidative Stress May Play a Critical Role in Methotrexate-Induced Renal Damage. **Experimental Chemotherapy**, v. 55, p. 83–90, 2009.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

KOSINSKA, M. K. *et al.* Articular joint lubricants during osteoarthritis and rheumatoid arthritis display altered levels and molecular species. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–18, 2015.

KUHN, D. A. *et al.* Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, p. 1625–1636, 2014.

KUMAR, A. *et al.* Efficacy of methylprednisolone acetate versus triamcinolone acetonide intra-articular knee injection in patients with chronic inflammatory arthritis : A 24-week randomized controlled trial. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 1, p. 150–158, 2017a.

KUMAR, V. *et al.* Preparation and evaluation of biopolymeric nanoparticles as drug delivery system in effective treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmaceutical Research**, v. 34, p. 654–667, 2017b.

- KUMBHAR, A. B.; RAKDE, A. K.; CHAUDHARI, P. D. In situ gel forming injectable drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 2, p. 597–609, 2013.
- KUMIRSKA, J. *et al.* Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1567–1636, 2010.
- LAI, W. F.; SHUM, H. C. Hypromellose-graft-chitosan and its polyelectrolyte complex as novel systems for sustained drug delivery. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 19, p. 10501–10510, 2015.
- LANGENBUCHER, F. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 979–981, 1972.
- LAPITSKY, Y. Ionically crosslinked polyelectrolyte nanocarriers: Recent advances and open problems. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 2, p. 122–130, 2014.
- LARSEN, C. *et al.* Intra-articular depot formulation principles: role in the management of postoperative pain and arthritic disorders. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 11, p. 4622–4654, 2008.
- LAU, B. K. *et al.* Micellization to Gelation of a Triblock Copolymer in Water : Thermoreversibility and Scaling. **J. Polym. Sci. Phys.**, v. 42, p. 2014–2025, 2014.
- LEBBE, C. *et al.* Intraindividual variability of the bioavailability of low dose methotrexate after oral administration in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 53, p. 475–477, 1994.
- LEE, S. M. *et al.* Targeted chemo-photothermal treatments of rheumatoid arthritis using gold half-shell multifunctional nanoparticles. **ACS Nano**, v. 7, n. 1, p. 50–57, 2013.
- LEE, S. W. *et al.* Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1563–1572, 2012.
- LEWIS, R. J. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 13th. ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- LI, C. L. *et al.* The use of hypromellose in oral drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 533–546, 2005.
- LI, D. *et al.* Subcutaneous administration of methotrexate at high doses makes a better

performance in the treatment of rheumatoid arthritis compared with oral administration of methotrexate: A systematic review and meta-analysis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 6, p. 656–662, 2016.

LI, L. *et al.* Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 1–11, 2014.

LI, Q. *et al.* Cubic Liquid Crystalline Gels Based on Glycerol Monooleate for Intra-articular Injection. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 858–865, 2018.

LI, S.; XIONG, Y.; ZHANG, X. Poloxamer surface modified trimethyl chitosan nanoparticles for the effective delivery of methotrexate in osteosarcoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 872–879, 2017.

LI, X. *et al.* Development of Albumin Coupled , Cholesterol Stabilized , Lipid Nanoemulsion of Methotrexate , and TNF-  $\alpha$  Inhibitor for Improved In Vivo Efficacy Against Rheumatoid Arthritis. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 7, p. 2774–2782, 2017.

LI, X. *et al.* Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) Targeted Self-Assembled Nanoparticles Loaded with Methotrexate for Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 8204–8212, 2019.

LI, Y.; RODRIGUES, J.; TOMÁS, H. Injectable and biodegradable hydrogels : gelation , biodegradation and biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2193–2221, 2012.

LI, Y.; ZHANG, X.; CAO, D. Nanoparticle hardness controls the internalization pathway for drug delivery. **Nanoscale**, v. 7, p. 2758–2769, 2015.

LIANG, L. S. *et al.* Methotrexate Loaded Poly ( L -Lactic Acid ) Microspheres for Intra-Articular Delivery of Methotrexate to the Joint. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 4, p. 943–956, 2004.

LIANG, L. S. *et al.* Intra-articular treatment of inflammatory arthritis with microsphere formulations of methotrexate: Pharmacokinetics and efficacy determination in antigen-induced arthritic rabbits. **Inflammation Research**, v. 58, n. 8, p. 445–456, 2009.

LIANG, S.; SUN, Y.; DAI, X. A review of the preparation, analysis and biological functions of chitooligosaccharide. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2197–2215, 2018.

LIANG, X. *et al.* In situ hexagonal liquid crystal for intra-articular delivery of sinomenine hydrochloride. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, n. March, p. 1–8, 2019.

LIAQAT, F.; ELTEM, R. Chitooligosaccharides and their biological activities : A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 243–259, 2018.

LIM, L. M. *et al.* Biointerfaces Amorphous ternary nanoparticle complex of curcumin-chitosan-hypromellose exhibiting built-in solubility enhancement and physical stability of curcumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 483–491, 2018.

LIU, H. *et al.* Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

LOPES, M. *et al.* Preparation methods and applications behind alginate-based particles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 14, n. 6, p. 769–782, 2016.

LU, Y. *et al.* Preparation and evaluation of biodegradable flubiprofen gelatin micro-spheres for intra-articular administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 6, p. 515–524, 2007.

LU, Z. *et al.* Matrix Polymeric Excipients : Comparing a Novel Interpolyelectrolyte Complex with Hydroxypropylmethylcellulose Matrix Polymeric Excipients : Comparing a Novel Interpolyelectrolyte Complex with Hydroxypropylmethylcellulose. **Drug Delivery**, v. 15, n. 2, p. 87–96, 2008.

LUCAS, C. J.; DIMMITT, S. B.; MARTIN, J. H. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis—A review. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 10, p. 2228–2234, 2019.

MA, Y. *et al.* The in vivo fate of nanoparticles and nanoparticle-loaded microcapsules after oral administration in mice : Evaluation of their potential for colon-specific delivery. **European Journal OF Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 393–403, 2015.

MA, Z.; GARRIDO-MAESTU, A.; JEONG, K. C. Application , mode of action , and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents : A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, n. July, p. 257–265, 2017.

MAJUMDAR, S. *et al.* Methotrexate ( MTX )– cIBR Conjugate for Targeting MTX to Leukocytes : Conjugate Stability and In Vivo Efficacy in. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3275–3291, 2012.

- MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 445–451, 2011.
- MALVERN, I. **Zetasizer Nano Series User Manual**. Malvern: Malvern Instruments Ltda., 2004.
- MARESCA, M. *et al.* Acute effect of Capparis spinosa root extracts on rat articular pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 456–465, 2016.
- MARQUES, M. R.; LOEBENGER, R.; ALMUKAINZI, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p. 15–28, 2011.
- MASCARIN, L. Z. **Padronização do modelo de incapacitação articular induzida por monoiodoacetado de sódio para estudo pré-clínico da osteoartrite**. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.
- MAZAUD, C.; FARDET, L. Relative risk of and determinants for adverse events of methotrexate prescribed at a low dose: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 4, p. 978–986, 2017.
- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.
- MEEHAN, E. Characterisation of hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP) by GPC using a modified organic solvent. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, n. 1–2, p. 2–6, 2006.
- MEI, Y. XIA *et al.* Protective effect of chitooligosaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 330–335, 2013.
- MELLO, S. B. V *et al.* Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: Anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 443–449, 2013.
- MENDES, I. T. *et al.* Development and characterization of nanostructured lipid carrier-based gels for the transdermal delivery of donepezil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 177, p. 274–281, 2019.

- MERZEL, R. L. *et al.* Folate binding protein : therapeutic natural nanotechnology for folic acid , methotrexate , and. **Nanoscale**, v. 9, p. 2603–2615, 2017.
- MEYER, L. M. *et al.* Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroyl glutamic acid). **Acta Haematologica**, v. 4, n. 3, p. 157–167, 1950.
- MEZMARICH, N. A. K.; LOVE, B. J. The kinetics of gel formation for PEO-PPO-PEO triblock copolymer solutions and the effects of added methylparaben. **Macromolecules**, v. 44, p. 3548–3555, 2011.
- MIAO, B.; SONG, C.; MA, G. Injectable thermosensitive hydrogels for intra-articular delivery of methotrexate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, p. 2139–2145, 2011.
- MIMA, S. *et al.* Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 28, p. 1909–1917, 1983.
- MIODUSZEWSKA, K. *et al.* Overview of experimental and computational methods for the determination of the pKa values of 5- fluorouracil , cyclophosphamide , ifosfamide , imatinib and methotrexate. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 283–296, 2017.
- MISAK, H. E. *et al.* Albumin-based nanocomposite spheres for advanced drug delivery systems. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 1, p. 163–170, 2014.
- MOHAMMED, M. A. *et al.* An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 53–78, 2017.
- MÖNKKÖNEN, J. *et al.* Studies on liposome formulations for intra-articular delivery of clodronate. **Journal of Controlled Release**, v. 35, n. 2–3, p. 145–154, 1995.
- MORADO-URBINA, C. E. *et al.* Early, middle, or late administration of zoledronate alleviates spontaneous nociceptive behavior and restores functional outcomes in a mouse model of CFA-induced arthritis. **Drug Development Research**, v. 75, n. 7, p. 438–448, 2014.
- MORTADA, M. A.; ABDELWHAB, S. M.; ELGAWISH, M. H. Intra-articular methotrexate versus corticosteroid injections in medium-sized joints of rheumatoid arthritis patients — an intervention study. **Clinical Rheumatology**, v. 37, p. 331–337, 2018.
- MOURA, C. C. *et al.* Co-association of methotrexate and SPIONs into anti-CD64 antibody-conjugated PLGA nanoparticles for theranostic application. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 4911–4922, 2014.

- 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, 2018.
- NATARAJAN, V. *et al.* Formulation and Evaluation of Quercetin Polycaprolactone Microspheres for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 195–205, 2011.
- NAVES, V. DE M. L. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e ftalato de hidroxipropilmetil celulose contendo metotrexato para potencial tratamento de glioblastoma**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
- ND, A.; GIMBUN, J.; AKMM, A. An overview of chitosan nanofibers and their applications in the drug delivery process . **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 4, p. 272–294, 2019.
- NOGUEIRA, E. *et al.* Enhancing Methotrexate Tolerance with Folate Tagged Liposomes in Arthritic Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 12, p. 2243–2252, 2015.
- NOTARIO-PÉREZ, F. *et al.* Optimization of tenofovir release from mucoadhesive vaginal tablets by polymer combination to prevent sexual transmission of HIV. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 305–316, 2018.
- NOVAES, R. D. *et al.* Trypanosoma cruzi infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2873–2881, 2015.
- NUNTHANID, J. *et al.* Development of time-, pH-, and enzyme-controlled colonic drug delivery using spray-dried chitosan acetate and hydroxypropyl methylcellulose. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 253–259, 2008.
- OCAL, Y. *et al.* Characterization and evaluation of triamcinolone , raloxifene , and their dual-loaded microspheres as prospective local Treatment system in rheumatic rat joints. **Pharmaceutics, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology**, v. 103, p. 2396–2405, 2014.
- OLIVEIRA, E. G. *et al.* Monitoring thermal , structural properties , methotrexate release and biological activity from biocompatible spray-dried microparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, p. 1481–1490, 2017.

- OLIVEIRA, M. I. *et al.* Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. **European Cells and Materials**, v. 24, p. 136–153, 2012.
- ØSTERGAARD, M.; HALBERG, P. Intra-Articular Corticosteroids in Arthritic Disease A Guide to Treatment. **Disease Management**, v. 9, n. 2, p. 95–103, 1998.
- PALMER, D.; EL MIEDANY, Y. Rheumatoid arthritis: recommendations for treat to target. **British Journal of Nursing** (, v. 23, n. 6, p. 310–315, 2014.
- PAN, W. *et al.* PRP-chitosan thermoresponsive hydrogel combined with black phosphorus nanosheets as injectable biomaterial for biotherapy and phototherapy treatment of rheumatoid arthritis. **Biomaterials**, v. 239, p. 119851, 2020.
- PANDEY, P. *et al.* Formulation , functional evaluation and ex vivo performance of thermoresponsive soluble gels - A platform for therapeutic delivery to mucosal sinus tissue. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 499–507, 2017.
- PANDEY, S. *et al.* Co-delivery of teriflunomide and methotrexate from hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of rheumatoid arthritis : *In vitro* characterization, pharmacodynamic and biochemical investigations. **Pharmaceutical Research**, v. 35, p. 201, 2018.
- PARK, J. H. *et al.* An injectable, electrostatically interacting drug depot for the treatment of rheumatoid arthritis. **Biomaterials**, v. 154, p. 86–98, 2018.
- PATIL, J. S. *et al.* Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.
- PATIL, J. S. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation : The novel techniques to design hydrogel particulate sustained , modulated drug delivery system : A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.
- PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.
- PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEDREIRO, L. N.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive nanostructured

polyelectrolyte complexes as potential carrier to improve zidovudine permeability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1248–1256, 2016.

PENG, P. *et al.* Assessment of Photodynamic Inactivation against Periodontal Bacteria Mediated by a Chitosan Hydrogel in a 3D Gingival Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1821–1833, 2016.

PENTECOST, A. *et al.* Immunomodulatory nanodiamond aggregate-based platform for the treatment of rheumatoid arthritis. **Regenerative Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 163–174, 2019.

PEPTU, C. A. *et al.* Carbohydrate based nanoparticles for drug delivery across biological barriers. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2107–48, set. 2014.

PHIL, L. *et al.* Chitooligosaccharide : An evaluation of physicochemical and biological properties with the proposition for determination of thermal degradation products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, n. March, p. 438–451, 2018.

POSADOWSKA, U.; BRZYCHCZY-WLOCH, M.; PAMULA, E. Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2016.

PRABHU, P. *et al.* Investigation of nano lipid vesicles of methotrexate for anti-rheumatoid activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 177–186, 2012.

PRÉSUMEY, J. *et al.* PLGA microspheres encapsulating siRNA anti-TNFalpha: Efficient RNAi-mediated treatment of arthritic joints. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 457–464, 2012.

PUEBLA, P. *et al.* PEG-derivative effectively modifies the characteristics of indomethacin-PLGA microspheres destined to intra-articular administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 7, p. 793–808, 2005.

PUT, S. *et al.* SPECT Imaging of Joint Inflammation with Nanobodies Targeting the Macrophage Mannose Receptor in a Mouse Model for Rheumatoid Arthritis. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 5, p. 807–814, 2013.

QI, R. *et al.* Folate receptor-targeted dendrimer-methotrexate conjugated for inflammatory arthritis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1431–1441, 2015.

QI, X. *et al.* Intra-articular Administration of Chitosan Thermosensitive In Situ Hydrogels

Combined With Diclofenac Sodium-Loaded Alginate Microspheres. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 1, p. 122–30, jan. 2016a.

QI, Y. *et al.* Intra-articular administration of chitosan thermosensitive in situ hydrogels combined with diclofenac sodium-loaded alginate microspheres. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 122–130, 2016b.

QIAO, Y.; BAI, X. F.; DU, Y. G. Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 121–127, 2011.

QUINTEIRO, M. S. *et al.* 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 58–65, 2014.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, p. 887–913, 2011.

RODRIGUES, S.; COSTA, A. M. R. DA; GRENHA, A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 282–288, 2012.

ROON, E. N. VAN; LAAR, M. A. F. J. VAN DE. Methotrexate bioavailability. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 28, n. 5, Suppl. 61, p. 27–32, 2010.

ROSENBERG, O. A. *et al.* Prolongation of anti-inflammatory activity of glucocorticosteroids encapsulated in large oligolamellar liposomes in treatment of arthritis in rabbits. **International Journal of Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 131–134, 2017.

RUIZ-CARO, R. *et al.* Mucoadhesive tablets for controlled release of acyclovir. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. October, p. 1249–1257, 2012.

RUSSO, E. *et al.* Chitosan-clodronate nanoparticles loaded in poloxamer gel for intra-articular administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 88–96, 2016.

RYAN, S. M. *et al.* An intra-articular salmon calcitonin-based nanocomplex reduces experimental inflammatory arthritis. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 2, p. 120–129, 2013.

SADARANI, B. *et al.* Enhanced skin permeation of methotrexate from penetration enhancer

- containing vesicles : *In vitro* optimization and in vivo evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, n. March, p. 108770, 2019.
- SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives : A review of the structure-activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 2017.
- SALEHI, M.; MILLER, R.; KHAING, M. Methotrexate-induced hypersensitivity pneumonitis appearing after 30 years of use : a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 11, p. 174–177, 2017.
- SALOPEK, B.; KRASI, D.; FILIPOVIC, S. Measurement and application of zeta-potential. **Rudarsko-geolosko-naftini zbornik**, v. 4, p. 147–151, 1992.
- SANTOS, J. E. DOS *et al.* Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.
- SAWTARIE, N.; CAI, Y.; LAPITSKY, Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 110–117, 2017.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–733, 2003.
- SCHMOLKA, I. R. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. **Journal of biomedical materials research**, v. 6, n. 6, p. 571–582, nov. 1972.
- SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.
- SEGAL, R.; YARON, M.; TARTAKOVSKY, B. Methotrexate: mechanism of action in rheumatoid arthritis. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 20, n. 3, p. 190–200, dez. 1990.
- SEO, J. *et al.* Injectable click-crosslinked hyaluronic acid depot to prolong therapeutic activity in articular joints affected by rheumatoid arthritis. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 28, p. 24984–24998, 2019.
- SEO, S. B. *et al.* Inhibitory effect of high molecular weight water-soluble chitosan on hypoxia-induced inflammatory cytokine production. **Biological and Pharmaceutical**

**Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 717–721, 2003.

SEQUETTO, P. L. *et al.* Low doses of simvastatin potentiate the effect of sodium alendronate in inhibiting bone resorption and restore microstructural and mechanical bone properties in glucocorticoid-induced osteoporosis. **Microscopy and Microanalysis**, v. 23, n. 5, p. 989–1001, 2017.

SEVASTRE, A.-S. *et al.* Benefits of nanomedicine for therapeutic intervention in malignant diseases. **Coatings**, v. 9, p. 628–644, 2019.

SHAIKH, R. G. *et al.* A review on polymers used in in-situ gel drug delivery systems. **International Journal for Pharmaceutical Research Scholars**, v. 1, n. 2, p. 17–34, 2012.

SHANG, L. *et al.* Nanoparticle interactions with live cells: Quantitative fluorescence microscopy of nanoparticle size effects. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, p. 2388–2397, 2014.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, p. 1–11, 3 fev. 2014.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131–194, 2019.

SHARMA, P.; SCOTT, D. G. I. Optimizing Methotrexate Treatment in Rheumatoid Arthritis: The Case for Subcutaneous Methotrexate Prior to Biologics. **Drugs**, v. 75, n. 17, p. 1953–1956, 2015.

SHIN, E. H. *et al.* Membrane potential mediates the cellular binding of nanoparticles. **Nanoscale**, v. 5, n. 13, p. 5879–5886, 7 jul. 2013.

SHIN, J. M. *et al.* A hyaluronic acid-methotrexate conjugate for targeted therapy of rheumatoid arthritis. **Chemical Communications**, v. 50, n. 57, p. 7632–7635, 2014.

SHINDE, C. G. *et al.* Intra-articular delivery of a methotrexate loaded nanostructured lipid carrier based smart gel for effective treatment of rheumatic diseases. **RSC Advances**, v. 6, n. 16, p. 12913–12924, 2016a.

SHINDE, C. G. *et al.* Intra-articular delivery of a methotrexate loaded nanostructured lipid carrier based smart gel for effective treatment of rheumatic diseases. **RSC Advances**, v. 6, p. 12913–12924, 2016b.

SHUKLA, R. K.; TIWARI, A. Carbohydrate polymers : applications and recent advances in delivering drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 399–416, 2012.

SLEDGE, C. B. *et al.* Treatment of rheumatoid synovitis of the knee with intraarticular injection of dysprosium 165-ferric hydroxide macroaggregates. **Arthritis and Rheumatism**, v. 29, n. 2, p. 153–159, 1986.

SNEKHALATHA, U. *et al.* Evaluation of complete Freund ' s adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model Comparison of thermography and histopathology. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 72, p. 375–382, 2013.

SOLOMON, D. H. *et al.* Adverse Effects of Low-Dose Methotrexate. **Annals of Internal Medicine**, v. 172, n. 6, p. 369–380, 2020.

SON, R. A. *et al.* Direct chemotherapeutic dual drug delivery through intra-articular injection for synergistic enhancement of rheumatoid arthritis treatment. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14713, 2015.

SONG, J. *et al.* A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 28, n. 4, p. 489–497, 2001.

STAHL, P.; GORDON, S. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. **The Journal of Cell Biology**, v. 93, p. 49–56, 1982.

STAMP, L. *et al.* The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis — are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics ? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 678–687, 2006.

SUEMORI, K. *et al.* Methotrexate-associated Lymphoproliferative Disease with Multiple Pulmonary Nodules in a Patient with Rheumatoid Arthritis. **Internal Medicine**, v. 54, p. 1421–1425, 2015.

SUKSAEREE, J. *et al.* Formulation , physicochemical characterization , and in vitro study of chitosan / HPMC blends-based herbal blended patches. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 1, p. 171–181, 2015.

SYSTAT SOFTWARE INC. **Sigmaplot for Windows versão 10.0** San Jose, 2006.

Disponível em: <http://www.systat.com/products/sigmaplot>

- TAMURA, T. *et al.* Novel hyaluronic acid–methotrexate conjugate suppresses joint inflammation in the rat knee: efficacy and safety evaluation in two rat arthritis models. **Arthritis Research & Therapy**, v. 18, n. 1, p. 79, 2016.
- TEAM, R. C. **R: a language and environment for statistical computing** ViennaR Foundation for statistical Computing, , 2018. Disponível em: <https://www.r-project.org/>
- THAKKAR, H. *et al.* Efficacy of chitosan microspheres for controlled intra-articular delivery of celecoxib in inflamed joints. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1091–1099, set. 2004.
- TILLING, L.; TOWNSEND, S.; DAVID, J. Methotrexate and Hepatic Toxicity in Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis. **Clinical Drug Investigation**, v. 26, n. 2, p. 55–62, 2006.
- TRIF, M. *et al.* Designing lipid nanostructures for local delivery of biologically active macromolecules. **Journal of Liposome Research**, v. 17, n. 3–4, p. 237–248, 2007.
- TRUJILLO-NOLASCO, R. M. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of radiolabeled HA-PLGA nanoparticles as novel MTX delivery system for local treatment of rheumatoid arthritis. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, n. January, p. 109766, 2019.
- TU, J. *et al.* Chitosan nanoparticles reduce LPS-induced inflammatory reaction via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway in Caco-2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 848–856, 2016.
- TUNÇAY, M. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of diclofenac sodium loaded albumin microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 2, p. 145–155, 2000.
- TÜRKER, S. *et al.* Scintigraphic imaging of radiolabelled drug delivery systems in rabbits with arthritis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 34–43, 2005.
- TÜRKER, S. *et al.* Enhanced efficacy of diclofenac sodium-loaded lipogelosome formulation in intra-articular treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 1, p. 51–57, jan. 2008.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products**. Disponível em: [ccessdata.fda.gov/scripts/cder/daf](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf). Acesso em: 9 out. 2019.
- UEMATSU, T. *et al.* Intra-articular administration of tachykinin NK 1 receptor antagonists

reduces hyperalgesia and cartilage destruction in the inflammatory joint in rats with adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1–2, p. 163–168, 2011.

VAF AEI, S. Y. *et al.* Self assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential carrier for targeting the inflamed intestinal mucosa. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 371–381, 2016.

VANNI, K. M. M.; LYU, H.; SOLOMON, D. H. Cytopenias among patients with rheumatic diseases using methotrexate : a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Rheumatology**, v. 59, p. 709–717, 2020.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, maio 2009.

VENTOLA, C. L. The Nanomedicine Revolution Part 1 : Emerging Concepts. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 9, p. 512–518, 2012.

VERMA, A. *et al.* Chitosan-Hydroxypropyl Methylcellulose Matrices as Carriers for Hydrodynamically Balanced Capsules of Moxifloxacin HCl. **Current Drug Delivery**, v. 14, n. 1, p. 83–90, 2017.

VERMA, A. *et al.* Folate Conjugated Double Liposomes Bearing Prednisolone and Methotrexate for Targeting Rheumatoid Arthritis. **Pharmaceutical Research**, v. 36, p. 123, 2019.

WAHBA, S. M. R. *et al.* Sugarcane bagasse lignin, and silica gel and magneto-silica as drug vehicles for development of innocuous methotrexate drug against rheumatoid arthritis disease in albino rats. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 599–610, 2015.

WANG, L. *et al.* Effects of Yunke (technetium-99 conjugated with methylene diphosphonate; <sup>99</sup>Tc-MDP) and/or colloidal chromic phosphate phosphonium-32, alone and in combination, in rats with adjuvant arthritis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 1, p. 23–28, 2008.

WANG, S. J. *et al.* Rhenium-188 sulphur colloid as a radiation synovectomy agent. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 22, n. 6, p. 505–507, 1995.

WANG, T. *et al.* Preparation and properties of a novel thermo-sensitive hydrogel based on chitosan / hydroxypropyl methylcellulose / glycerol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 775–782, 2016.

- WANG, W.; ZHOU, H.; LIU, L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 502–516, 2018.
- WARD, T. T.; STEIGBIGEL, R. T. Acidosis of synovial fluid correlates with synovial fluid leukocytosis. **The American Journal of Medicine**, v. 64, p. 933–936, 1978.
- WASIAK, I. *et al.* Dextran Nanoparticle Synthesis and Properties. **PlosOne**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2016.
- WGRZYN, J.; ADELEINE, P.; MIOSSEC, P. Better efficacy of methotrexate given by intramuscular injection than orally in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, p. 1232–1234, 2004.
- WEI, P. *et al.* Chitosan oligosaccharides suppress production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced N9 murine microglial cells in vitro. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, n. 5–6, p. 285–295, 2012.
- WEN, Y.; OH, J. K. Recent strategies to develop polysaccharide-based nanomaterials for biomedical applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 35, n. 21, p. 1819–1832, nov. 2014.
- WIGGINTON, S. M. *et al.* Methotrexate pharmacokinetics after intraarticular injection in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 23, n. 1, p. 119–122, 1980.
- WORTHLEY, S. G.; MCNEIL, J. D. Leukoencephalopathy in a patient taking low dose oral methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 335–337, 1995.
- WU, H. *et al.* Novel self-assembled tacrolimus nanoparticles cross-linking thermosensitive hydrogels for local rheumatoid arthritis therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 97–104, 2017.
- WUNDER, A. *et al.* Albumin-Based Drug Delivery as Novel Therapeutic Approach for Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4793–4801, 2003.
- XU, X. *et al.* Endogenous sialic acid-engineered micelles: a multifunctional platform for on-demand methotrexate delivery and bone repair of rheumatoid arthritis. **Nanoscale**, v. 10, p. 2923–2935, 2018a.
- XU, Y. Q. *et al.* Pre-protective effects of dietary chitosan supplementation against oxidative

stress induced by diquat in weaned piglets. **Cell Stress and Chaperones**, v. 23, n. 4, p. 703–710, 2018b.

XUAN, J.-J. *et al.* Development of thermo-sensitive injectable hydrogel with sustained release of doxorubicin: Rheological characterization and in vivo evaluation in rats. **Drug Delivery**, v. 18, n. 5, p. 305–311, 2011.

XUAN, J. J. *et al.* Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 317–323, 2010.

YANG, J. W. *et al.* Involvement of PKA signalling in anti-inflammatory effects of chitosan oligosaccharides in IPEC-J2 porcine epithelial cells. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 252–259, 2018a.

YANG, Y. *et al.* Preparation of an environmentally friendly formulation of the insecticide nicotine hydrochloride through encapsulation in chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1067–1074, 2018b.

YAPAR, E. A.; INAL, Ö. Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-based copolymers for transdermal drug delivery: An overview. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 5, p. 855–866, 2012.

YAZICI, Y.; BATA, Y. Parenteral methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. **Bulletin of the Hospital Joint Diseases**, v. 71, n. Suppl 1, p. 46–48, 2013.

YOON, H. J. *et al.* Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 3, p. 954–959, 2007.

YOON, H. J. *et al.* Effects of chitosan oligosaccharide (COS) on the glycerol-induced acute renal failure in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 710–716, 2008.

YUAN, X. *et al.* A review on the preparation of chitosan oligosaccharides and application to human health, animal husbandry and agricultural production. **Carbohydrate Polymers**, v. 220, n. May, p. 60–70, 2019.

YUDOH, K. *et al.* Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 217–225, 2009.

- ZEB, A. *et al.* Enhanced anti-rheumatic activity of methotrexate-entrapped ultradeformable liposomal gel in adjuvant-induced arthritis rat model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 525, n. 1, p. 92–100, 2017.
- ZHANG, E. *et al.* Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, n. May, p. 115004, 2019.
- ZHANG, J. X. *et al.* Local delivery of indomethacin to arthritis-bearing rats through polymeric micelles based on amphiphilic polyphosphazenes. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 10, p. 1944–1953, 2007.
- ZHANG, N.; WARDWELL, P. R.; BADER, R. A. In Vitro Efficacy of Polysaccharide-Based Nanoparticles Containing Disease-Modifying Antirheumatic Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 2326, 2014.
- ZHANG, Y. *et al.* Treatment of Traumatic Brain Injury with Vepoloxamer (Purified Poloxamer 188). **Journal of Neurotrauma**, v. 35, p. 661–670, 2018.
- ZHANG, Z. *et al.* Enhanced targeting efficiency of PLGA microspheres loaded with lornoxicam for intra-articular administration. **Drug Delivery**, v. 18, n. 7, p. 536–44, 2011.
- ZHAO, D. *et al.* Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. **Polymers**, v. 10, p. 462–478, 2018a.
- ZHAO, G.; ZHANG, H. Notch-1 siRNA and Methotrexate towards a Multifunctional Approach in Rheumatoid Arthritis Management : a Nanomedicine Approach. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 4, p. 123, 2018.
- ZHAO, J. *et al.* Multifunctional folate receptor-targeting and pH- responsive nanocarriers loaded with methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6735–6746, 2017.
- ZHAO, J. *et al.* Dual-functional lipid polymeric hybrid pH-responsive nanoparticles decorated with cell penetrating peptide and folate for therapy against rheumatoid arthritis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 130, n. January, p. 39–47, 2018b.
- ZILLE, H. *et al.* Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 20, n. 3, p. 235–242, 2010.

ZOU, P. *et al.* Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, n. 12, p. 1174–1181, 2016.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL**

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada " Avaliação do desempenho de sistemas de liberação contendo metotrexato sobre o limiar nociceptivo de ratos com artrite reumatoide induzida", registrada com o nº 55/2018, sob a responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 08/12/2018 a 08/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	96
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 30 de Novembro de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG