



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALINE TEIXEIRA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPLEXOS ELETROLÍTICOS DE
QUITOSANA E METOTREXATO COM POTENCIAL APLICAÇÃO
ANTIRREUMÁTICA E ANTICANCERIGENA**

FORTALEZA

2025

ALINE TEIXEIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPLEXOS ELETROLÍTICOS DE QUITOSANA E
METOTREXATO COM POTENCIAL APLICAÇÃO ANTIRREUMÁTICA E
ANTICANCERIGENA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.
Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S233d Santos, Aline Teixeira dos.

Desenvolvimento de nanocomplexos eletrolíticos de quitosana e metotrexato com potencial aplicação antirreumática e anticancerígena / Aline Teixeira dos Santos. – 2025.
108 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

1. Artrite reumatóide. 2. câncer. 3. nanocomplexos. I. Título.

CDD 540

ALINE TEIXEIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPLEXOS ELETROLÍTICOS DE QUITOSANA E
METOTREXATO COM POTENCIAL APLICAÇÃO ANTIRREUMÁTICA E
ANTICANCERIGENA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: 03/12/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

À Instituição CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de pós-graduação.

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

Aos órgãos FUNCAP e INOMAT pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-graduação em Química por todo o suporte.

À Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Química (UFC) pelas análises térmicas e infravermelho.

À Central Analítica da UFC pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN – NPDM - UFC) pela análise de citotoxicidade celular.

Ao Laboratório de Bioensaios Químico-farmacológico e Ambiental (LABQFAM - UECE) pelos testes de toxicidade, dor e inflamação em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Ao Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação (LAFFIN-UECE) pelos testes de toxicidade, dor e inflamação em ratos.

A Prof^ª. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa, pelos ensinamentos, oportunidades, paciência e orientação.

Aos professores Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, Francisco Audísio Dias Filho, e Rondinelle Ribeiro Castro pelas contribuições para o trabalho durante o exame de qualificação.

Ao Laboratório de Polímeros e a todos que fizeram e fazem parte desse grupo de pesquisa e que tanto contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

A Nádia Aline, por sempre colaborar com sua amizade e conselhos, além de contribuir para a construção deste trabalho realizando com maestria seu ofício.

Ao Roberto Martins, por participar da construção desse trabalho e por sua dedicação como aluno de iniciação científica.

Aos meus colegas de trabalho da EEMTI Romeu de Castro Menezes, em especial as minhas amigas Dayane e Dryelen que sempre me apoiaram a continuar nessa árdua jornada dupla; por nossas brincadeiras, conselhos e rolês.

Aos meus alunos, meu combustível diário, que com carinho e atenção moldam constantemente a minha perspectiva de carreira e me tornam um ser humano melhor.

A todos os meus amigos que me ajudaram de forma direta e indireta, sempre dando apoio, com palavras de incentivo e conselhos para vida acadêmica e pessoal.

“É o meu desejo mais sério que alguns de vocês continuem a fazer o trabalho científico e mantenham a ambição e a determinação de fazer uma contribuição permanente para a ciência” (Marie Curie).

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação sinovial crônica. Ela está associada com incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e custos socioeconômicos. Um dos problemas relacionados ao tratamento são os efeitos colaterais indesejáveis. O metotrexato (MTX) é um medicamento antirreumático e anticâncer utilizado para o tratamento de AR e câncer de mama, leucemia, linfoma, pulmão, entre outros. Ele possui alguns efeitos colaterais sistêmicos, mesmo em baixas concentrações, devido, principalmente, ao acúmulo inespecífico do fármaco em alguns órgãos. Para minimizar os efeitos da administração tradicional desse fármaco, esse trabalho tem como objetivo desenvolver nanocomplexos eletrolíticos de quitosana e metotrexato com potencial aplicação antirreumática e anticancerígena. Os nanocomplexos eletrolíticos (NCEs) QTS/MTX foram caracterizados por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TGA), onde os sinais apresentados comprovam a presença dos materiais precursores nas nanoestruturas. A formação de nanopartículas foi observada pelo comportamento unimodal da distribuição de tamanhos obtidas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). As amostras com razões molares de QTS/MTX 0,75 e 1 apresentaram um índice de polidispersão (IPD) abaixo de 0,3, ou seja, melhor homogeneidade dos tamanhos de partículas em solução. As partículas apresentaram diâmetro menor que 300 nm, o que viabiliza a utilização desses sistemas como nanocarreadores. Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi possível comprovar que as nanoestruturas são esféricas. A eficiência do encapsulamento foi determinada por Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta/Visível (UV-Vis). A eficiência e a carga de fármaco mais elevada foi apresentada para a amostra QTS/MTX 0,75, sendo de 79% e 62%, respectivamente. Foi analisada a estabilidade em solução por 6 meses na presença e ausência do estabilizante (Pluronic® F-127) e foi observado que as nanopartículas com razão QTS/MTX 1 apresentaram melhor estabilidade. Os testes com a linhagem células leucêmicas HL-60 e células não tumorais MRC-5 mostraram seletividade diferenciada na presença de F-127. Os testes com Zebrafish mostraram que o NCE não apresenta toxicidade nas concentrações de 40, 200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, apresentou reversão da fase inflamatória nas três concentrações e na fase neurogênica apenas na concentração de 400 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O teste em ratos mostrou que o NCE reduziu o edema e a migração leucocitária ocasionada pelo modelo artrítico, além demonstrar na análise bioquímica que o NCE ocasiona menor dano hepático comparado com o MTX livre. A histopatologia dos órgãos evidenciou que a utilização do NCE ocasionou a preservação morfologia renal e hepática. Os NCEs apresentam resultados promissores para aplicação antirreumática e anticancerígena.

Palavras-chave: Artrite reumatóide; câncer; nanocomplexos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic synovial inflammation. It is associated with progressive disability, systemic complications, premature death, and socioeconomic costs. One of the challenges related to treatment is the occurrence of undesirable side effects. Methotrexate (MTX) is an antirheumatic and anticancer drug used in the treatment of RA, as well as breast cancer, leukemia, lymphoma, lung cancer, among others. It presents some systemic side effects, even at low concentrations, mainly due to the nonspecific accumulation of the drug in certain organs. To minimize the effects of traditional drug administration, this study aims to develop chitosan - methotrexate polyelectrolyte nanocomplexes with potential antirheumatic and anticancer applications. The polyelectrolyte nanocomplexes (PNCs) QTS/MTX were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric Analysis (TGA), with the resulting signals confirming the presence of the formulation components within the nanostructures. Nanoparticle formation was observed through the unimodal size distribution obtained by Dynamic Light Scattering (DLS). Samples with QTS/MTX molar ratios of 0.75 and 1 presented a polydispersity index (PDI) below 0.3, indicating better homogeneity of particle sizes in solutions. The particles exhibited diameters below 300 nm, making these systems suitable for use as nanocarriers. Scanning Electron Microscopy (SEM) confirmed that the nanostructures are spherical. Encapsulation efficiency was determined by Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy (UV-Vis), with the QTS/MTX 0.75 sample showing the highest drug encapsulation efficiency and loading, at 79% and 62%, respectively. Stability in solutions were analyzed over six months in the absence of the stabilizer Pluronic® F-127. Nanoparticles with a QTS/MTX ratio of 1 demonstrated better stability. Tests using HL-60 leukemia cells and non-tumoral MRC-5 cells showed differentiated selectivity in the presence of F-127. Zebrafish tests showed that the PNC was non-toxic at concentrations of 40, 200, and 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, reversed the inflammatory phase at all three concentrations, and reversed the neurogenic phase only at the 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentration. In rat models, the PNC reduced edema and leukocyte migration induced by the arthritis model and showed, through biochemical analysis, that it causes less hepatic damage compared to free MTX. Histopathology of the organs showed that the use of NCE resulted in the preservation of renal and hepatic morphology. The PNCs show promising results for antirheumatic and anticancer applications.

Keywords: Rheumatoid arthritis; cancer; nanocomplexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Anatomia da mão humana edemaciada.....	19
Figura 2	– Estrutura química da unidade de repetição da quitosana.....	30
Figura 3	– Estrutura química do MTX.....	32
Figura 4	– Estrutura geral de um poloxâmoro.....	35
Figura 5	Distribuição de tamanhos dos NCEs.....	52
Figura 6	– Formação do nanocomplexo polímero-fármaco: desenvolvimento de interações eletrostáticas entre quitosana (QTS) catiônica e metotrexato (MTX) aniônico.....	53
Figura 7	– Relação entre a razão molar e a variação de tamanhos de partículas, IPDs e potenciais zeta: 24 h após síntese e após diálise.....	54
Figura 8	– Relação entre a concentração de F-127 nas razões molares de QTS/MTX de 0,75, 1 e 1,25 e a variação de tamanhos de partículas, IPDs e potencial zeta (pós-diálise).....	56
Figura 9	– FTIR dos NCEs e materiais precursores	58
Figura 10	– Termograma dos materiais precursores	60
Figura 11	– Termogramas dos NCEs na presença e ausência de F-127.....	61
Figura 12	– Perfil de liberação in vitro do MTX, onde QTS/MTX 1 (A); QTS/MTX 1 – 0,075% F-127(B); QTS/MTX 0,75 (C) e QTS/MTX 0,75 – 0,075% F-127(D).	62
Figura 13	– Estabilidade da solução estoque dos nanocomplexos QTS/MTX 1 e QTS/MTX 1 – F-127(0,075%).....	65
Figura 14	– Análise morfológica das NCEs: em (A) $105,3 \pm 16,8$ nm para QTS/MTX 1, (B) $184,8 \pm 25,7$ nm QTS/MTX 1 – PF-127 e (C) aglomerados QTS/MTX 0,75.....	66
Figura 15	– Viabilidade celular das linhas celulares leucêmicas HL-60 e não tumorais MRC-5 após 72 horas. A) As linhas de células HL-60 e B) MRC-5 foram tratadas numa curva de concentração-resposta ($100 - 1,56 \mu\text{g. mL}^{-1}$) dos compostos e a viabilidade foi estimada definindo o grupo de controlo negativo	

(NC) como 100%. As barras representam o desvio padrão da média de 3 experiências independentes..... 68

Figura 16 – Efeito da amostra NCE na nocicepção induzida por formalina (0,1%) em zebrafish adulto na fase neurogênica (0 – 5 min) e fase inflamatória (15 – 30 min). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (n = 6/grupo). Controle (Veículo: DMSO a 3%; 20 μ L; v.o; Morfina: 8 mg kg⁻¹; 20 μ L; v.o.), NCE (40, 200 ou 400 μ g kg⁻¹; 20 μ L; v.o.). *One-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. (**p < 0,01; ****p < 0,0001 vs. Controle; ##p < 0,01 vs. Morfina) fase neurogênica. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 vs. Controle) fase inflamatória..... 70

Figura 17 – Efeito da cânfora na atividade antinociceptiva em zebrafish adulto na fase neurogênica (0 – 5 min) e inflamatória (15 – 30 min). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (n = 6/grupo). Controle: veículo (DMSO a 3 %; 20 μ L; i.p.), NCE (40, 200 ou 400 μ g kg⁻¹; 20 μ L; v.o.), Cânfora (30,4 mg kg⁻¹; 10 μ L; i.p.). *Two-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. (** p < 0,01; ****p < 0,0001 vs. Controle; ##p < 0,01; #####p < 0,0001 NCE vs. NCE + Cânfora)..... 71

Figura 18 – Efeito da amostra NCE no edema abdominal induzido por κ -carragenana 1,5% em zebrafish adulto, analisado durante o período da quarta hora de teste. Cada coluna representa uma média \pm erros padrão da média (n= 6/peixe). Controle (Veículo: DMSO a 3%; 20 μ L; v.o; Ibuprofeno: 20 μ L; v.o.), NCE (40, 200 ou 400 μ g kg⁻¹; 20 μ L; v.o.). *One-way* ANOVA, seguida do teste tukey: (**p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. DMSO 3%)... 72

Figura 19 – NCE e a hipernocicepção articular induzida por zymosan. NCE (40 e 20 μ g kg⁻¹; p.o.), ou MTX (40 μ g kg⁻¹; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por Zymosan (500 μ g/25 μ L; i.art). O grupo controle recebeu solução salina (0,9% NaCl; 25 μ L; i.art). Média \pm E.P.M., análise de variância de dois fatores, teste de Bonferroni. P<0,05. *vs. Solução salina; # vs. Zymosan..... 74

Figura 20 NCE e o edema articular induzida por Zymosan. NCE (40 e 20 μ g kg⁻¹; p.o.), ou MTX (40 μ g kg⁻¹; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução

	da artrite por Zymosan (500 µg/25 µL; i.art). O grupo controle recebeu solução salina (0,9% NaCl; 25 µL; i.art). Média ± E.P.M., análise de variância de dois fatores, teste de Bonferroni. P<0,05. *vs. Solução salina; # vs. Zymosan.....	76
Figura 21	NCE e a migração de leucócitos induzida por zymosan. NCE (40 e 20 µg kg ⁻¹ ; p.o.) ou MTX livre (40 µg kg ⁻¹ ; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por zymosan (500 µg/25 µL; i.art.). Após 6 horas, o líquido articular foi coletado para análise total e diferencial de leucócitos (A) e atividade da mieloperoxidase (B). O grupo de controle recebeu solução salina (0,9%; 25 µL; i.art.). Média ± E.P.M., análise de variância de dois fatores, teste de Bonferroni. P<0,05. *vs. Solução salina; #vs. Zymosan.....	78
Figura 22	Efeito da quitosana na migração de leucócitos induzida por zymosan. Quitosana (40 e 20 µg kg ⁻¹ ; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por zymosan (500 µg/25 µL; i.art.). Após 6 horas, o líquido articular foi coletado para análise total e diferenciais totais de leucócitos (A) e atividade da mieloperoxidase (B). O grupo de controle recebeu solução salina (0,9%; 25 µL; i.art.). Média ± E.P.M., ANOVA e teste de Bonferroni. P<0,05. *vs. Salina salina; # vs. Zymosan.....	79
Figura 23	Efeito do metotrexato livre a nanocomplexado com nanopartículas de quitosana em marcadores hepáticos e renais. Média ± EPM (n=6). ANOVA e Bonferroni *p<0.05 vs. QTS; # p<0.05 vs. MTX: metotrexato. NCE: Nanocomplexos eletrolíticos. QTS: quitosana.....	81
Figura 24	Perfil histológico de órgãos vitais de animais tratados com metotrexato livre e nanocomplexado com nanopartículas de quitosana. Baço (A-D), Fígado (E-H), Rins (I-L). Coluna 1 (controle); coluna 2 (MTX); coluna 3 (NCE), coluna 4 (QTS). MTX: metotrexato. NCE: nanocomplexos eletrolíticos. QTS: quitosana.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos utilizados no tratamento de AR	20
Tabela 2 – Números de internações relacionadas à AR e outras poliartropatias inflamatórias por faixa etária (maio/24 a maio/25)	21
Tabela 3 – Dados do Globocan para os tipos de câncer mais diagnosticados e com mais óbitos registrados no mundo no ano de 2022.....	22
Tabela 4 – Sistemas de liberação de MTX com quitosana.....	34
Tabela 5 – Valores médios para x, y e z para poloxâmeros com a designação comercial (Pluronic®).....	35
Tabela 6 – Modelos cinéticos de liberação.....	43
Tabela 7 – Proporções reacionais dos componentes presentes nas sínteses.....	51
Tabela 8 – Eficiência do encapsulamento e carga de fármaco.....	57
Tabela 9 – Modelos cinéticos para o perfil da liberação de MTX nas NCEs.....	63
Tabela 10 – Valores de k_s , k_{on} , k_{off} e ΔG	64
Tabela 11 – Concentração inibitória mediana (IC_{50}).....	69
Tabela 12 – Resultados dos testes de toxicidade aguda do composto NCE.....	69
Tabela 13 – Massa relativa dos órgãos.....	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Artrite reumatoide (AR).....	17
1.2	Câncer.....	22
1.3	Nanopartículas (NPs).....	24
1.3.1	<i>Complexação entre fármacos ionizáveis e polieletrólitos.....</i>	27
1.4	Atividades imunológicas dos polissacarídeos.....	28
1.5	Metotrexato (MTX).....	31
1.6	Poloxâmeros.....	34
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Materiais.....	39
3.2	Purificação da quitosana.....	39
3.3	Síntese dos NCEs.....	39
3.4	Caracterizações físico-químicas dos componentes de formação e dos NCEs.....	40
3.4.1	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....</i>	40
3.4.2	<i>Capacidade de incorporação do MTX aos NCEs.....</i>	41
3.4.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	41
3.4.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i>	41
3.4.5	<i>Ensaio de liberação in vitro.....</i>	42
3.4.6	<i>Cinética de liberação do MTX.....</i>	42
3.4.7	<i>Estudos de estabilidade de armazenamento.....</i>	44
3.4.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	44

3.5	Citotoxicidade.....	44
3.5.1	<i>Cultura celular</i>	44
3.5.2	<i>Avaliação da viabilidade celular através do ensaio Alamar Blue</i>	44
3.5.3	<i>Análises estatísticas</i>	45
3.6	Avaliação do efeito toxicológico, anti-inflamatório e anti-nociceptivo em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	45
3.6.1	<i>Amostra</i>	45
3.6.2	<i>Modelo animal zebrafish</i>	45
3.6.3	<i>Protocolo geral</i>	46
3.6.4	<i>Toxicidade aguda 96h</i>	46
3.6.5	<i>Tratamentos</i>	46
3.6.6	<i>Comportamento nociceptivo induzido por formalina</i>	47
3.6.7	<i>Indução de edema abdominal por k-carragenana</i>	47
3.6.8	<i>Análise estatística</i>	48
3.7	Análise do efeito anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo do NCE em ratos.....	48
3.7.1	<i>Artrite induzida por zymosan e tratamento</i>	48
3.7.2	<i>Mediação de edema e hipernocicepção articular</i>	49
3.7.3	<i>Migração de leucócitos para cavidade sinovial</i>	49
3.7.4	<i>Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	49
3.7.5	<i>Análise estatística</i>	50
3.8	Toxicidade aguda em ratos.....	50
3.8.1	<i>Peso corporal e massa relativa dos órgãos</i>	50
3.8.2	<i>Avaliação hematológica e bioquímica</i>	50
3.8.3	<i>Avaliação histopatológica dos órgãos</i>	50
3.8.4	<i>Análise estatística</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

4.1	Síntese dos NCEs.....	51
4.2	Caracterizações físico-químicas dos componentes da formação e dos NCEs.....	53
4.2.1	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i>	53
4.2.2	<i>Capacidade de incorporação do MTX aos NCEs</i>	56
4.2.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	57
4.2.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	58
4.2.5	<i>Ensaio de liberação in vitro</i>	61
4.2.6	<i>Cinética de liberação do MTX</i>	62
4.2.7	<i>Estudos de estabilidade</i>	64
4.2.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	65
4.3	Citotoxicidade.....	66
4.4	Avaliação do efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo das amostras em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	69
4.4.1	<i>Toxicidade aguda 96 h</i>	69
4.4.2	<i>Comportamento nociceptivo induzido por formalina</i>	69
4.4.3	<i>Edema abdominal induzido por carragenana</i>	71
4.5	Efeito anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo do NCE na artrite induzida por Zymosan em ratos.....	73
4.5.1	<i>Edema e hiper-nocicepção articular</i>	74
4.5.2	<i>Efeito do NCE na migração leucocitária e atividade da mieloperoxidase</i>	77
4.6	Toxicidade aguda em ratos.....	80
4.6.1	<i>Peso corporal e massa relativa dos órgãos</i>	80
4.6.2	<i>Avaliação bioquímica</i>	80
4.6.3	<i>Avaliação histopatológica dos órgãos</i>	81
5	CONCLUSÃO.....	83

6	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MTX EM TAMPÃO FOSFATO 7,4.....	101
	APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MTX EM TAMPÃO FOSFATO 5,0.....	102
	APÊNDICE C – VALORES DE HIPER-NOCICAPÇÃO DO NCE.....	103
	APÊNDICE D – VALORES DE HIPER-NOCICEPÇÃO DA QTS.....	104
	APÊNDICE E – VALORES DE EDEMA DO NCE.....	105
	APÊNDICE F – VALORES DE EDEMA DA QTS.....	106
	APÊNDICE G – VALORES DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA PARA O NCE.....	107
	APÊNDICE H – VALORES DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA PARA A QTS.....	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatoide (AR)

A artrite reumatoide é uma doença autoimune persistente e sistêmica e sua patogênese ainda permanece obscura. No entanto, avanços consideráveis foram feitos para compreender os mecanismos da doença. Tanto a predisposição genética quanto fatores ambientais contribuem para seu início e progressão, ressaltando a heterogeneidade da AR (Wen *et al.* 2023).

O tecido sinovial é um tipo de tecido que se encontra ao redor das articulações, composto principalmente de fibroblastos. Na artrite reumatoide, estes se proliferam e migram de maneira anormal e secretam citocinas e enzimas que intensificam reações sistêmicas, destruindo tecidos, cartilagens e ossos (Croft *et al.*, 2019). Para condições inflamatórias, como a artrite reumatoide, a terminação da fase inflamatória e a transição para a fase de reparo tecidual não são bem definidas, levando a uma inflamação crônica. A angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) associada ao tecido sinovial inflamatório na AR tem muitas semelhanças com a reestruturação vascular encontrada em tumores sólidos (Levick, 1981; Yuan *et al.*, 2012).

A inflamação é um mecanismo de defesa natural do corpo em resposta ao dano tecidual causado por lesões físicas, isquemia, infecções, exposição a toxinas ou outros traumas. Essa reação pode induzir alterações celulares e ativar o sistema imunológico para promover o reparo tecidual e o crescimento celular no local da lesão. No entanto, se a inflamação se tornar persistente ou crônica, pode ter efeitos nocivos, levando a vários distúrbios de saúde (Coussens; Werb, 2002).

A inflamação pode ser classificada em formas agudas e crônicas. É um fator-chave responsável pela progressão de muitas doenças crônicas. Entre elas, estão diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, problemas oculares, artrite, obesidade, doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais (Arulselvan *et al.*, 2016).

Os componentes imunológicos incluem, entre outros, barreiras físicas (pele e mucosas), fatores solúveis que mediam a chamada imunidade humoral (como anticorpos e proteínas do complemento) e células leucocitárias (imunidade celular) que podem se comunicar por meio de proteínas solúveis de baixa massa molecular, geralmente denominadas citocinas (Paul, 2012).

Vários tipos de células e citocinas desempenham um papel crucial na progressão da AR. Leucócitos e vários mediadores pró-inflamatórios invadem a membrana sinovial,

desencadeando cascatas de eventos inflamatórios que iniciam interações com outras células do sistema inato (mastócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas), e respostas imunes não inatas (células B e células T). Isso ocasiona uma resposta autoimune que eventualmente pode provocar degradação óssea causando danos na cartilagem (Vyawahare *et al.*, 2022).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa (indivíduos saudáveis), que não requer um encontro prévio com patógenos para responder apresentar uma resposta eficaz. Além das barreiras cutâneas e mucosas, ela inclui células fagocíticas, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, bem como diversas populações de células linfoides inatas. A imunidade adquirida depende de linfócitos B e T e células apresentadoras de antígenos. Embora mais específica, a imunidade adquirida leva tempo para se desenvolver após o estímulo antigênico inicial. No entanto, posteriormente, sua resposta é rápida. A ativação das respostas imunes inatas produz sinais que estimulam e direcionam as respostas imunes adaptativas subsequentes, que por sua vez podem amplificar ou regular os mecanismos imunes inatos (Fearon; Locksley, 1996). Portanto, a imunidade inata e adaptativa opera de forma cooperativa e interdependente.

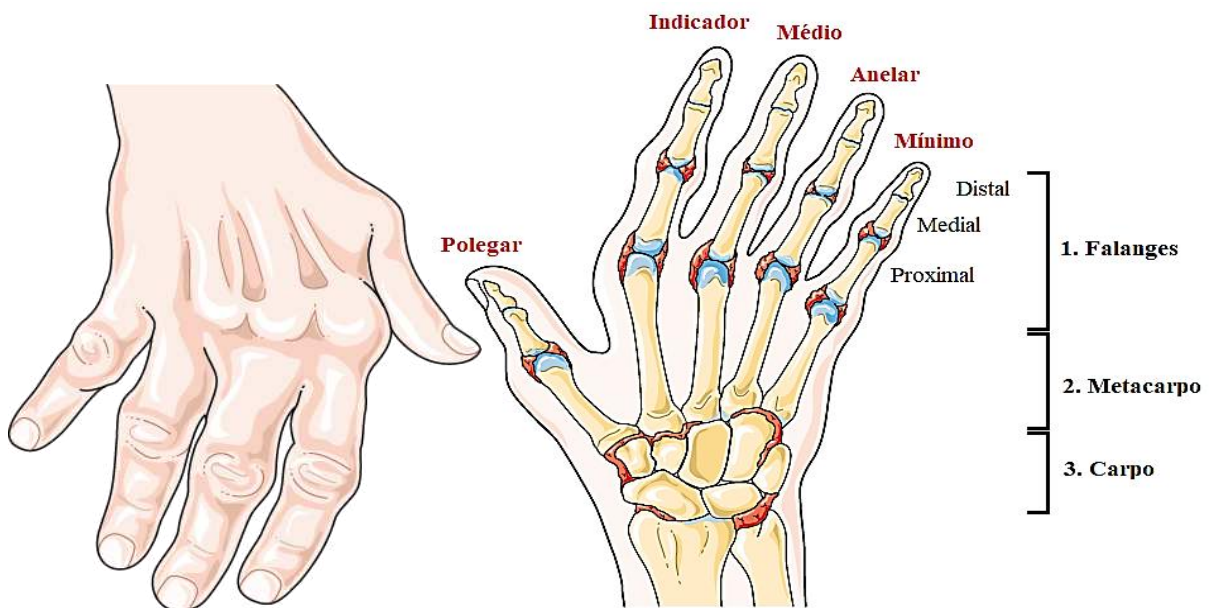
Em 2020, aproximadamente 17,6 milhões de pessoas em todo o mundo foram afetadas pela AR, e as projeções sugerem que esse número aumentará para 31,7 milhões até 2050, representando um aumento de 80,2% desde 2020. Mais de 17% dos pacientes apresentam destruição articular progressiva e deformidades, contribuindo para uma parcela substancial da carga global de incapacidade (0,1%) devido ao tratamento inadequado (Zhao *et al.*, 2025).

A AR pode se desenvolver em qualquer idade, mas o risco aumenta à medida que as pessoas envelhecem. Novos casos de AR são de duas a três vezes maiores nas mulheres do que nos homens. Variações em dezenas de genes foram estudados como fatores de risco para AR. A maioria desses genes são conhecidos ou suspeitos de estarem envolvidos em funções do sistema imunológico. A predominância dos fatores de risco genéticos significativos para evolução da AR são relacionadas às variações nos genes do antígeno leucocitário (HLA), particularmente o gene HLA-DRB1 (Houtman *et al.*, 2021). Fatores de risco ambientais associados ao AR são especialmente relacionados ao tabagismo e ingestão de álcool, que aumentam o risco até 40 vezes em comparação com pessoas não expostas. No entanto, outros fatores como peso ao nascer, amamentação, nível socioeconômico e região de nascimento pode aumentar a suscetibilidade (Liao; Alfredsson; Karlson, 2009).

O diagnóstico da artrite reumatoide é principalmente clínico. A apresentação típica é poliarticular, com dor, rigidez e edema de múltiplas articulações em um padrão simétrico bilateral. O início geralmente é inespecífico, com sintomas articulares surgindo ao longo de

semanas ou meses e frequentemente acompanhados por anorexia, fraqueza ou fadiga. Pacientes geralmente observam rigidez matinal com duração superior a uma hora. As articulações comumente envolvidas são: os punhos, interfalângicas proximais, metacarpofalângicas e metatarsofalangeanas (Figura 1). As articulações interfalângicas distais e articulações da coluna vertebral geralmente são poupadas. Os achados típicos do exame incluem inchaço, flacidez, sensibilidade e calor, com atrofia dos músculos próximos às articulações envolvidas (Harris, 2005).

Figura 1- Anatomia da mão humana edemaciada.



Fonte: Partes da figura foram desenhadas usando imagens da Servier Medical Art. A Servier Medical Art by Servier está licenciada sob uma Licença Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, acessado em 05 de julho de 2023).

Para o diagnóstico da AR são realizados alguns testes laboratoriais iniciais como: hemograma completo, fator reumatoide, velocidade de hemossedimentação (VHS) e/ou proteína C-reativa. Os testes de função renal e hepática são recomendados para orientar a escolha de medicamentos (American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, 2002).

Uma abordagem abrangente para o tratamento da artrite reumatoide consiste na reeducação de hábitos diários, terapia física/ocupacional e tratamento medicamentoso. Os pacientes devem ser informados sobre a doença e encaminhados a esses especialistas para manter a função articular e retardar a incapacidade (Majithia; Geraci, 2007). O tratamento

medicamentoso geralmente envolve uma abordagem em três frentes: anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), glicocorticóides (GCs) orais ou intra-articulares em baixas doses e fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), que podem ser subdivididos em: (1) Sintéticos convencionais, (2) Sintéticos direcionados e (3) Biológicos (representados na Tabela 1). Os AINEs, reduzem a dor nas articulações e inchaço, mas não alteram o curso da doença e não devem ser usados. Esteroides, tais como (prednisona 10 mg por dia ou equivalente) aliviam os sintomas e podem retardar o dano articular; eles devem ser prescritos em dose baixa por curta duração, principalmente como terapia combinada e com cálcio diário (1500 mg) e suplementos orais de vitamina D (400-800 UI) para limitar desmineralização óssea (American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, 2002).

Tabela 1 – Fármacos utilizados no tratamento de AR.

Categoria do Fármaco	Nome	Efeitos colaterais	Referências
Glicocorticóides	Cortisona	Osteoporose, úlceras gastrointestinais, risco cardiovascular, glaucoma, insônia, depressão, ansiedade, déficits cognitivos, e hiperglicemia.	Caplan <i>et al.</i> , 2017; Stout; Friedly; Standaert, 2019.
	Prednisona		
	Prednisolona		
	Metilprednisolona		
	Dexametasona		
	Hidrocortisona		
	Triancinolona		
Anti-inflamatório não esteróide drogas (AINEs)	Ácido acetilsalicílico	Riscos cardiovasculares, sangramento gastrointestinal e intracraniano	Marsico; Paolillo; Filardi, 2017.
	Ibuprofeno		
	Naproxeno		
	Meclofenamato		
	Diclofenaco		
	Indometacina		
	Etoricoxibe		
Celecoxibe			
	lumaricoxibe		
Fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs)	Metotrexato ¹	Hepatotoxicidade náuseas, vômitos, diarreia, fibrose e pneumonite intersticial	Wang; Zhou; Liu, 2018.
	Sulfassalazina ¹	Náusea e vômitos	Xu <i>et al.</i> , 2017.
	Leflunomida ¹	Diarreia, esofagite e colite.	Abbas <i>et al.</i> , 2022.
	Hidroxicloroquina ¹	Toxicidade oftálmica	Lin; Anzaghe; Schülke, 2020.
	Tofacitinibe ²	Aumento do risco de infecção grave	Deepak <i>et al.</i> , 2021.
	Baricitinibe ²	Reações alérgicas, coágulos sanguíneos, ataque cardíaco,	Xie; Zhang, 2020.

	infecção, lesão hepática e diminuição dos glóbulos vermelhos	
Adalimumabe ³	Infecção, pneumonia e celulites	Ling <i>et al.</i> , 2024.
Tocilizumab ³	Infecções	Parisil <i>et al.</i> , 2025.

(1) Sintéticos convencionais; (2) Sintéticos direcionados e (3) Biológicos.
Fonte: Dados da pesquisa.

No Brasil, o número de internações relacionadas à AR e outras poliartropatias inflamatórias durante o período de 1 ano (maio/2024 a maio/2025) foi de 17.731 o que correspondem a um valor total de despesas para o sistema único de saúde (SUS) de R\$ 14.602.968,52 reais como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Números de internações relacionadas à AR e outras poliartropatias inflamatórias por faixa etária (maio/24 a maio/2025).

Faixa Etária 1	Internações
Menor 1 ano	53
1 a 4 anos	489
5 a 9 anos	837
10 a 14 anos	855
15 a 19 anos	618
20 a 29 anos	1073
30 a 39 anos	1527
40 a 49 anos	2479
50 a 59 anos	3634
60 a 69 anos	3722
70 a 79 anos	1832
80 anos e mais	612

Fonte: Ministério da Saúde – Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

Apesar do conhecimento atual da fisiopatologia da AR, as modalidades de tratamento disponíveis têm eficácia limitada na obtenção de alívio completo dos sintomas. Os objetivos do tratamento estão associados a obtenção de remissão prolongada ou a diminuição da atividade da doença, associada a prevenção de danos e malformações articulares (Zhang; Zhang, 2023).

1.2 Câncer

O câncer é caracterizado por anormalidades nos mecanismos que regulam o ciclo celular, levando à sobrevivência e proliferação de células cancerígenas malignas. As vias intracelulares geralmente são alteradas quando o câncer ocorre. A inibição do apoptose fisiológica contribui para o desenvolvimento do câncer, bem como para a resistência à radioterapia e à quimioterapia (Mortezaei *et al.*, 2019).

O câncer representa um desafio significativo para a saúde pública global, afetando diversas dimensões do bem-estar geral do indivíduo e contribuindo para a redução da expectativa de vida em escala mundial. Apesar dos notáveis avanços na terapia antineoplásica contra o câncer, a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que, nos próximos vinte anos, a ocorrência de novos casos de câncer e morte a ele relacionados deverão aumentar em aproximadamente 50% e 70%, respectivamente, em todo o mundo (Andreani *et al.*, 2024).

Entre os tipos de câncer com maior número de casos registrados no mundo para o sexo masculino, o câncer de pulmão é o mais diagnosticado (1.572.045 – 15,5% de novos casos em 2022) e o que causa maior número de óbitos (1.233.241 – 22,7% óbitos em 2022). No sexo feminino o câncer de mama é o mais diagnosticado (2.296.840 – 23,8% novos casos em 2020) e o que causa maior número de óbitos (666.103 – 15,4% óbitos em 2020) (Globocan, 2022). A Tabela 3 apresenta os tipos de câncer com maior incidência e mortalidade no ano de 2022.

Tabela 3 – Dados do Globocan para os tipos de câncer mais diagnosticados e com mais óbitos registrados no mundo no ano de 2022.

Tipos de câncer	Novos casos	Óbitos registrados
Pulmão	2.480.675	1.817.469
Mama	2.296.840	666.103
Colorretal	1.926.425	904.019
Próstata	1.467.854	397.430
Estômago	968.784	660.175
Fígado	866.136	758.725
Tireoide	821.214	47.507
Colo do útero	662.301	348.874
Bexiga	614.298	220.596
Linfoma não-Hodgkin	553.389	250.679
Esôfago	511.054	445.391

Tipos de câncer	Novos casos	Óbitos registrados
Pâncreas	510.992	467.409
Leucemia	487.294	305.405
Rim	434.840	155.953
Corpo uterino	420.368	97.723
Lábio, cavidade oral	389.846	188.438
Ovário	331.722	206.956

Fonte: adaptado de Globocan (2022).

No Brasil, no ano de 2022 o câncer com maior incidência e óbitos registrados no sexo masculino foi o câncer de próstata (102.519 – 32.1% novos casos diagnosticados e 19.958 – 13.6% óbitos registrados) e no sexo feminino o câncer de mama (94.728 – 30.8% novos casos diagnosticados e 22.189 – 16.8% óbitos registrados). Além disso, estima-se a ocorrência de cerca de 12,6 milhões de novos casos de câncer, para ambos os sexos, no Brasil nos próximos 23 anos (2022 a 2045) (Globocan, 2022).

As ligações entre câncer e inflamação foram estabelecidas pela primeira vez no século XIX. Foi verificado o surgimento de tumores em locais de inflamação crônica e células inflamatórias foram observadas em biópsias de tumores (Balkwill; Mantovani *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos indicam que processos inflamatórios predis põe indivíduos a vários tipos de câncer. Estima-se que infecções subjacentes e respostas inflamatórias estejam associadas a 15–20% de mortes relacionadas a morte por câncer em escala global (Balkwill; Mantovani *et al.*, 2001). Existem muitos estímulos de inflamação crônica que aumentam o risco de desenvolver câncer. Dentre esses estímulos, a presença de infecções microbianas (por exemplo, a infecção por *Helicobacter pylori* está relacionada ao desenvolvimento de câncer gástrico e linfoma da mucosa gástrica), doenças autoimunes (por exemplo, a doença inflamatória intestinal está relacionada ao câncer de cólon) e condições inflamatórias de origem desconhecida (por exemplo, a prostatite está associada ao câncer de próstata) (Mantovani *et al.*, 2008).

O tratamento comum do câncer consiste em ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e terapia biológica. A cirurgia é uma medida eficaz para remover tumores sólidos malignos, especialmente em um estágio inicial do desenvolvimento do câncer. A aplicação da quimioterapia tem sido popular ao longo dos anos por sua simplicidade e conveniência no tratamento de pacientes com câncer (Jardim *et al.*, 2017; Arruebo *et al.*, 2011).

No entanto, a citotoxicidade indiscriminada da quimioterapia causa efeitos colaterais indesejáveis, visto que a quimioterapia também pode inibir o crescimento rápido de tecidos e células saudáveis, incluindo folículos capilares, células do trato gastrointestinal e medula óssea. O uso de quimioterapia também induz resistência a múltiplos medicamentos (MDR) e tem potencial associação com células-tronco cancerígenas (CSCs). Os medicamentos químicos citotóxicos usados em quimioterapias são inespecíficos e heterogêneos em termos de distribuição, o que contribui para a MDR no processo de tratamento (Wu *et al.*, 2014; Perez-Herrero *et al.*, 2015). Essa inespecificidade impede a eficácia da quimioterapia e prejudica a inibição do crescimento tumoral, facilitando a recorrência e estágio metastático.

A nanotecnologia tem sido extensivamente estudada para o tratamento do câncer, visto que as nanopartículas podem servir como um importante mecanismo para a administração de fármacos. Essa metodologia apresenta benefícios, incluindo maior estabilidade, biocompatibilidade, permeabilidade e efeitos de retenção, bem como direcionamento preciso, em contraste com os produtos farmacêuticos tradicionais. A utilização de nanopartículas híbridas, que combinam as características de várias nanopartículas, impulsionou esse sistema carreador de fármacos a níveis de sofisticação sem precedentes (Yao *et al.*, 2020).

1.3 Nanopartículas (NPs)

Os medicamentos nanoestruturados abrem novos caminhos para o tratamento de várias doenças, principalmente para tratamento de tumores, e assim apresentam grande perspectiva de aplicação. Os nanocarreadores não apenas apresentam uma estratégia eficiente para a administração de fármacos, como também oferecem a possibilidade de atingir o direcionamento preciso de tumores, e superar os efeitos colaterais dos fármacos tradicionais, que apresentam uma segmentação não específica (Liu *et al.*, 2023). Estas propriedades, especialmente para NPs biodegradáveis, viabilizam a administração de medicamentos em doses menores e ainda assim ser igualmente, se não mais eficaz, do que os medicamentos tradicionais, reduzindo o risco de efeitos adversos. As NPs ganharam recentemente a atenção do público, uma vez que as NPs lipídicas foram usadas como transportadores para as vacinas desenvolvidas para imunização contra o coronavírus (Schoenmaker *et al.*, 2021).

No entanto, após a administração, as nanopartículas biomédicas para aplicações terapêuticas ou diagnósticas enfrentam uma variedade de obstáculos. Dependendo da via de administração, como intramuscular (i.m.), subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.), oral, intravítrea, pulmonar ou nasal, barreiras biológicas complexas devem ser superadas. A liberação oral de

fármacos das nanopartículas, por exemplo, é prejudicada pelo ambiente gástrico ácido e pela secreção de muco que protege o trato gastrointestinal (GI) que pode capturar e remover eficientemente as partículas administradas (Bresinsky; Goepferich, 2025).

Um dos principais desafios para aplicação de medicamentos nanoestruturados é a complexidade da avaliação de segurança *in vivo*. Para diminuir a energia livre de superfície das nanopartículas, biomoléculas (por exemplo, proteínas, peptídeos e glicolípídios) adsorvem amplamente na superfície de nanopartículas quando estão dispersos em fluidos biológicos. Esta cobertura natural das nanopartículas é denominada de proteína corona, que fornece uma “identidade biológica” às NPs nos organismos vivos (Petry *et al.*, 2019).

A proteína corona desenvolve um comportamento dinâmico em função da composição das NPs, morfologia e reatividade, que compõem as características das NPs (Winzen *et al.*, 2016). Entretanto, algumas interações podem ser desfavoráveis ocasionando desestabilidade coloidal e diminuindo a resposta biológica desejada. Essa dificuldade resulta da alta força iônica de substâncias fisiológicas ou em meios fisiológicos simulados, que prejudicam a estabilidade devido à diminuição de seu potencial elétrico da superfície das NPs. Uma maneira de superar esses problemas, é utilização de agentes com capacidade de estabilização coloidal em suas formulações, mediante a adição de polímeros, por exemplo (Petry *et al.*, 2019).

A administração de fármacos via NPs poliméricas oferece vários benefícios para o tratamento do câncer. Em tumores sólidos, a vascularização permite que macromoléculas, como a albumina plasmática, fiquem retidas preferencialmente nos locais tumorais, onde são eliminadas localmente devido à presença de um sistema de drenagem linfática pouco desenvolvido. Esse fenômeno levou Matsumaura e Maeda (1986) a propor o chamado “efeito de permeabilidade e retenção aprimorada” (EPR), que tem inspirado o desenvolvimento de nanomedicamentos para câncer há quase três décadas. As nanopartículas melhoram o direcionamento e solubilidade de fármacos antitumorais, prolongam o tempo de circulação deles, impedindo a depuração sanguínea/renal rápida e aumentam seu acúmulo de fármacos em torno de tumores sólidos, ocasionando um aumento do EPR. As NPs podem ser utilizadas *in vivo* por meio de mecanismos de segmentação ativa e passiva. Na segmentação passiva, as nanopartículas podem ser fagocitadas por macrófagos sem a necessidade de alterações em sua superfície, uma vez que há um aumento na quantidade de macrófagos durante processos inflamatórios. Na segmentação ativa, é imprescindível o uso de ligantes direcionadores para otimizar a distribuição de sistemas nanoparticulados no local pretendido (Tian; Hua; Liu, 2023; Pham, 2011).

O tempo de circulação das NPs no sangue depende de seu estado físico e características químicas como hidrofobicidade, carga superficial e peso/tamanho molecular. Melhores efeitos terapêuticos também podem ser alcançados explorando a sensibilidade dos polímeros (pH, calor, estímulos mecânicos ou fotossensíveis) para entrega específica do fármaco (Kumar *et al.*, 2023).

As NPs também auxiliam no tratamento de doenças que comprometem a degradação articular e óssea, sendo usadas para administração de fármacos para osteoartrite, artrite reumatoide e osteoporose. Além disso, as NPs impedem a absorção inespecífica por outros órgãos e aceleram a remoção de substâncias, como resíduos e células, do espaço articular, enquanto aumentam a retenção de fármacos na cartilagem, bem como no líquido sinovial presente nas articulações, melhorando assim a eficácia terapêutica (Rabiei *et al.*, 2021).

O diâmetro padrão dos portadores lipídicos nanoestruturados (PLN), também conhecidos como portadores de materiais hidrofóbicos, oscila entre 10 e 1000 nm. Entretanto, para liberação específica no local, uma faixa de 50 a 300 nm é recomendada, particularmente para condições que afetam o sistema nervoso central e agentes quimioterápicos. NPs com tais dimensões oferecem melhor penetração nas barreiras, maior absorção pelas células e conseqüentemente, uma ação mais rápida (Khosha; Reddia; Sahab, 2018). NPs injetadas intravenosamente são mais propensas a agregar no fígado, baço, pulmão, medula óssea e alguns órgãos inflamatórios. Partículas menores que 100 nm podem escapar da fagocitose no sistema reticuloendotelial (RES), enquanto partículas menores que 5,5 nm são filtradas pelos rins e eliminadas na urina (Li *et al.*, 2023).

Os polímeros naturais são menos tóxicos, mais biocompatíveis, biodegradáveis, facilmente disponíveis e de baixo custo em comparação com os polímeros sintéticos. Dessa forma, os polímeros naturais ganharam reconhecimento como potenciais carreadores de fármacos (Tian; Hua; Liu, 2023).

A nanomedicina tradicional é constituída principalmente por carreadores que apresentam uma preparação complexa, baixa carga de fármaco, baixa reprodutibilidade e dificuldade na produção em larga escala. Os medicamentos nanoestruturados automontados tomam um ou mais fármacos como unidade de construção por meio de interações específicas, utilizando as propriedades estruturais dos próprios fármacos. A nanomedicina automontada pode reduzir muito o uso de carreadores, melhorar taxa de encapsulamento e capacidade de carga do fármaco (Xu *et al.*, 2023). Um dos maiores obstáculos para a aprovação dessas formulações nos estágios de avaliações pré-clínicas são referentes à utilização de solventes

orgânicos durante o processo de síntese (Kumar *et al.*, 2023). Dessa forma, surge a necessidade de obtenção de nanocarreadores desenvolvidos em meios aquosos.

1.3.1 Complexação entre fármacos ionizáveis e polieletrólitos (PE)

A complexação entre fármacos ionizáveis e polieletrólitos com cargas opostas (PE) para formar complexos (fármaco-PE) tem sido amplamente investigada para preparar novos sistemas de liberação de fármacos com diversas funcionalidades, como: (i) liberação controlada de fármacos (Moustafine *et al.*, 2017) (ii) aumento da solubilidade (Liu *et al.*, 2018), (iii) aumento da estabilidade hidrolítica do fármaco (Jimenez-Kairuz *et al.*, 2004) e (iv) modificação de sabores (De Robertis *et al.*, 2015).

A formação do nanocomplexo de fármaco é iniciada pela complexação eletrostática entre moléculas de fármaco ionizadas e polieletrólitos com cargas opostas para produzir complexos solúveis de fármaco-PE, os quais formam agregados entre si como resultado das interações hidrofóbicas entre as moléculas de medicamento ligadas no complexo. Além disso, a interação entre moléculas de medicamento livres e moléculas de medicamento ligadas no complexo também contribui para o crescimento da massa do agregado. Ao atingir uma massa crítica do agregado, cujo valor é ditado pela hidrofobicidade do fármaco, os agregados complexos precipitam em solução (Lim; Hadinoto, 2020).

O nanocomplexo de fármacos amorfos possui uma vantagem fundamental sobre as formulações nanofarmacêuticas amorfas convencionais, pois sua preparação é mais simples e apresenta um consumo mínimo de energia. As técnicas de preparação de nanofármacos amorfos convencionais podem ocorrer através da homogeneização de alta pressão, moagem úmida, nanosecagem por pulverização, nanoprecipitação controlada, precipitação microfluídica, exibem um alto consumo energético, produção lenta ou altamente complexas, com amplo uso de solventes orgânicos (Dong, Hadinoto, 2019). Além de sua simplicidade, apresentam como vantagens o não uso de solventes orgânicos, consumo mínimo de energia e a formação do nanocomplexo também é caracterizada por altas taxas de utilização do fármaco (>80%*m/m*). Essa alta taxa de utilização do fármaco leva não apenas ao desperdício mínimo, mas também a uma alta carga útil do fármaco.

Estudos mostraram que as características físicas dos nanocomplexos eram dependentes de três variáveis de processo: (1) concentração do fármaco, (2) razão de carga de PE para fármaco (RPE/fármaco) e (3) pH que influencia o grau de ionização dos fármacos ácido/base fracos (Cheow; Hadinoto, 2012; Nguyen *et al.*, 2012). Características físico-químicas, como massa molar, tamanho de partícula, funcionalidades químicas, potencial zeta e

hidrofilicidade-hidrofobicidade, são aspectos-chave que contribuem para o desempenho global do sistema em formulações farmacêuticas e aplicações bioquímicas e biomédicas. Macromoléculas anfifílicas, como polímeros, oferecem uma maneira robusta de regular o tamanho, forma e a superfície das nanoestruturas dispersíveis em água. Além disso, a mistura de moléculas anfifílicas com cargas opostas pode produzir morfologias diferentes daquelas formadas por moléculas individuais. De acordo com a literatura, complexos e conjugados à base de polímeros (por exemplo, carboximetilcelulose com fármacos, proteínas etc.) podem dar origem à formação de estruturas supramoleculares, referentes à organização estrutural das moléculas de polímeros à base de carboidratos, além da molécula individual devido às fortes interações intra e intermoleculares associadas a fármacos de cargas opostas (Carvalho *et al.*, 2018).

Ao contrário das nanopartículas estericamente estabilizadas, o nanocomplexo do fármaco é isento de surfactantes e sua estabilização depende exclusivamente da estabilização de carga pelo PE. A eficiência de dissociação dos flocos do nanocomplexo ainda precisa ser investigada devido à ausência do surfactante estabilizador. Além disso, como o nanocomplexo (fármaco-PE) é mantido por ligação eletrostática, o enfraquecimento das cargas do fármaco e do PE na presença de contra íons do sal pode levar ao enfraquecimento da interação (fármaco-PE), o que pode resultar na descomplexação prematura do fármaco do nanocomplexos (Dong; Sin Cheow; Hadinoto, 2020).

1.4 Atividades imunológicas dos polissacarídeos

A farmacoterapia com substâncias naturais pode ser considerada atualmente uma alternativa muito promissora à terapia convencional. Como macromoléculas biológicas, os polissacarídeos, juntamente com proteínas e polinucleotídeos, são biomacromoléculas extremamente importantes que desempenham papéis essenciais no crescimento e desenvolvimento de organismos vivos. Na literatura estão relatadas investigações sobre a bioatividade e aplicações farmacológicas desses materiais, como a atividade imunorreguladora, antitumoral, antiviral, antioxidante e hipoglicemiante (Yu *et al.*, 2018).

Polissacarídeo é um carboidrato polimérico constituído por mais de 10 monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas, que pode ser encontrado em animais, plantas e microrganismos (Wang *et al.*, 2021). Os principais monossacarídeos que contribuem para as propriedades anti-inflamatórias dos polissacarídeos incluem glicose (Glc), ácido glicurônico (GlcA), manose (Man), ramnose (Rha), fucose (Fuc), frutose (Fru), galactose (Gal), arabinose (Ara), ácido galacturônico (GalA), sorbose (Sor), talose (Tal), xilose (Xyl) e ribose (Rib). Esses

monossacarídeos desempenharam um papel crucial na formação das estruturas dos polissacarídeos. Além de contribuir nos padrões de ramificação, eles são essenciais para as atividades biológicas. Isso incluiu sua capacidade de interagir com receptores e vias de sinalização que modulam a inflamação (Wang *et al.*, 2024).

Os polissacarídeos têm sido amplamente estudados como polieletrólitos no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. As interações eletrostáticas entre moléculas de cargas opostas (como polímero-polímero, polímero-fármaco e polímero-fármaco-polímero) dão origem aos complexos polieletrólíticos (CPEs). Isso elimina a necessidade de usar compostos adicionais como agentes de reticulação, que podem se tornar tóxicos em certas situações, diminuindo, dessa forma, os efeitos indesejáveis (Di Martino *et al.*, 2019).

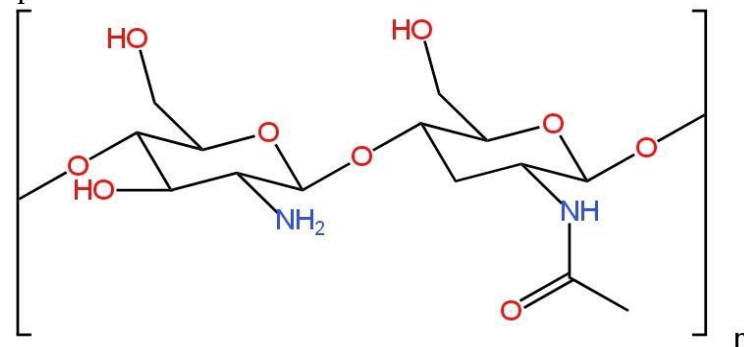
Polissacarídeos imunoestimulatórios podem interagir direta ou indiretamente com o sistema imunológico. Monócitos, macrófagos e neutrófilos são os principais alvos descritos que respondem a essas moléculas. Ao pesquisar atividades imunoestimuladoras relatadas de polissacarídeos, a maioria dos estudos trazem maior atividade dos macrófagos (Ferreira *et al.*, 2015).

Em particular, diferentes fármacos anti-inflamatórios e antirreumáticos foram encapsulados em um derivado da quitina a quitosana. A quitina, uma importante fonte renovável de crustáceos, representa até 14–27% dos resíduos do processamento de camarão e 13–15% dos resíduos do processamento de caranguejo, e reforça a estrutura polissacarídica com uma matriz proteica. A insolubilidade da quitina em água e na maioria dos solventes é uma grande barreira físico-química para o uso comercial e, para superar essa limitação, foi desenvolvida a quitosana, um derivado mais solúvel da quitina. Essa modificação expande significativamente sua gama de aplicações, permitindo seu uso em áreas como biomedicina, agricultura e processamento de alimentos. A solubilidade aprimorada da quitosana em pH mais baixo a torna um material versátil, abrindo novas possibilidades de inovação e uso prático (Afrifa; Awuah, 2026).

Em 1859, o fisiologista francês Charles Rouget demonstrou o processo de formação da quitosana (QTS) expondo a quitina a altas temperaturas na presença de hidróxido de potássio para induzir a desacetilação da quitina (Grifoll-Romero *et al.*, 2018). A QTS é um biomaterial versátil com propriedades únicas: biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, incluindo solubilidade em diferentes pH, tornando-a ideal para diversas aplicações biomédicas. Com produção comercial em países como Índia, China, Japão, Noruega, Polônia, EUA e Austrália (Azeez *et al.*, 2025).

Sua estrutura é composta de ligações β -(1-4) D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina dispostas aleatoriamente na cadeia do polímero (Motieia *et al.*, 2020) (Figura 2). Apresenta dois grupos reativos (amino e hidroxila) que conferem ao polissacarídeo uma vasta aplicabilidade em diversos segmentos industriais. Esses grupos funcionais dentro da cadeia principal da QTS, particularmente o grupo amino, desempenham um papel vital na formação de suas propriedades estruturais e físico-químicas devido às ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Com uma fórmula molecular representada como $(C_6H_{11}O_4)_n$, sofre alteração na atividade desse composto quando submetido a tratamento alcalino ou ácido, resultando em proporções variáveis de glucosamina e N-acetil glucosamina (Azeez *et al.*, 2025).

Figura 2 – Estrutura química da unidade de repetição da quitosana



Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença desses grupos confere à quitosana uma natureza catiônica com a redução do pH, o que a torna capaz de se ligar prontamente a superfícies carregadas negativamente, como membranas mucosas, incluindo ácido siálico, bem como componentes superficiais epiteliais. A ligação de hidrogênio e a interação hidrofóbica também desempenham um papel importante na mucoadesão da quitosana (Ways; Lau; Khutoryanskiy, 2018).

A abundância de grupos amino permitem que o polímero crie uma rede semicristalina de ligações de hidrogênio e/ou hidrofóbicas no estado sólido, além de favorecer uma boa solubilidade em ambientes ácidos. Assim, os valores de DA (grau de desacetilação) devem ter efeitos significativos na interação intermolecular da quitosana e podem influenciar ainda mais nas suas propriedades mecânicas, biológicas e físico-químicas, como conformações da cadeia e propriedades eletrostáticas (Lim; Hwang; Lee, 2021). A modificação química da quitosana é uma estratégia eficaz para gerenciar a interação desse polímero com diferentes elementos, como íons metálicos e compostos orgânicos, incluindo medicamentos. Além de ser

um excelente recurso para a preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos (Negm *et al.*, 2020).

Entre 2017 e 2022, a demanda global por QTS cresceu a uma taxa anual de 14,5%, para aplicação em áreas, como engenharia de tecidos (Li *et al.*, 2025), cicatrização de feridas (Zhou *et al.*, 2025), administração de fármacos (Manohar *et al.*, 2025), administração de genes (Rahimi *et al.*, 2025), adsorção de íons metálicos (Arafa *et al.*, 2024) e corantes (Yang; Lou; Wang, 2025), indústria alimentícia (Qiu *et al.*, 2024), revestimento de fertilizantes (Eddarai *et al.*, 2023) e cosméticos (Madihalli *et al.*, 2025).

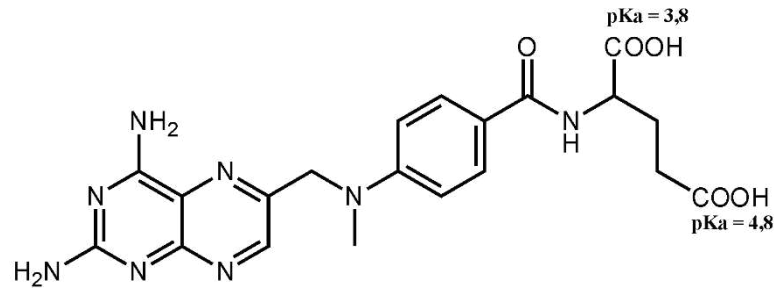
Os sistemas de liberação de fármacos são essencialmente compostos por um ou mais fármacos aderidos a um carreador adequado. Os principais critérios para sistemas de liberação ideais envolvem a capacidade de fornecer a dosagem precisa da substância ativa em uma taxa apropriada ao longo de um período específico, com forte preferência por garantir que o agente ativo seja direcionado exclusivamente ao local de ação designado dentro do corpo. Uma característica fundamental desses sistemas é sua capacidade de atingir concentrações plasmáticas do fármaco que se enquadram na janela terapêutica do fármaco (OBEIDAT; Lahlouh, 2025).

A QTS tem sido amplamente explorada para sistemas de carreadores vesiculares baseados em lipossomas, micelas, microemulsões, microesferas, nanopartículas, nanoesferas, nanoemulsões e pontos quânticos. Dentre esses sistemas de carreadores, o interesse de pesquisa em nanopartículas à base de quitosana são notavelmente maiores com relação aos demais (Manohar *et al.*, 2025).

1.5 Metotrexato (MTX)

O MTX é um ácido dicarboxílico com massa molar de 454,5 g mol⁻¹ e fórmula molecular C₂₀H₂₂N₈O₅. O pKa dos ácidos carboxílicos presentes na estrutura foi avaliado entre 3,8 e 4,8, com baixa permeabilidade em membranas (log P = 0,53). A solubilidade do MTX em água destilada (20°C) é de 0,01 mg mL⁻¹ sendo dependente do pH (Abolmaali; Tamaddon; Dinarvand, 2013). Sua nomenclatura oficial segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) é (S)-2-(4-(((2,4-diaminopteridin-6-il) metil) metilamino) benzamido) ácido pentanedioico. Foi sintetizado por Seeger *et al.* (1950) e tem sua estrutura ilustrada na Figura 3 (Choi; Seeger; Kuntz, 2000).

Figura 3 – Estrutura química do MTX.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O metotrexato foi inicialmente desenvolvido para inibir a síntese de purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina, uracila e citosina), necessários para a síntese de DNA e RNA durante a proliferação celular. Embora este mecanismo possa contribuir para a supressão do processo inflamatório, outros mecanismos de ação foram postulados, incluindo liberação aumentada de adenosina, inibição de reações de transmetilação que são necessárias para algumas funções celulares, acúmulo diminuído de poliaminas e desacoplamento de síntese de óxido nítrico. O MTX controla, tanto de forma direta quanto indireta, a atividade de quase todas as células envolvidas na inflamação, como neutrófilos, monócitos, células T, células B, células endoteliais e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (Cronstein; Aune, 2020).

Por causa de sua atividade antineoplásicas e imunossupressoras, o MTX é comumente usado no tratamento de neoplasias e doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide e psoríase. Atualmente, o MTX é um dos quimioterápicos mais aplicados, utilizado isoladamente ou em terapia combinada para diferentes tipos de câncer, principalmente na leucemia linfoblástica aguda. É também prescrito para neoplasias trofoblásticas, cânceres de mama, pulmão, cabeça e pescoço, osteossarcomas, linfomas cutâneos de células T ou linfomas não Hodgkin (Kozminski *et al.*, 2020). Além disso, o MTX é uma alternativa bem conhecida ao tratamento cirúrgico da gravidez ectópica (Verberne *et al.*, 2019).

Significativamente, o MTX se tornou a droga primária para AR, devido ao seu baixo preço e notável eficácia, fazendo parte do tratamento padrão global para a AR. Esse fármaco é frequentemente usado em combinação com outros agentes biológicos para melhorar o efeito terapêutico (Sasaki *et al.*, 2021). Sua administração pode ser por via oral ou parenteral em baixas doses. Apresenta uma meia-vida relativamente curta de aproximadamente 6 horas e é indetectável no soro depois das 18 horas. A biodisponibilidade do medicamento administrado por via oral é altamente variável devido à capacidade limitada do intestino de absorver o

metotrexato, e a absorção máxima de uma dose oral única é menor que 25 mg (Herman *et al.*, 1989; Schiff; Sadowski, 2017).

No entanto, o uso prolongado e em altas doses por via sistêmica têm sido relacionado à resistência medicamentosa e a efeitos colaterais indesejados (Zhao *et al.*, 2017). Feridas na boca, estomatite e redução na contagem de glóbulos brancos são alguns dos efeitos colaterais mais comuns associados ao uso de MTX. Uma dose elevada administrada por um período prolongado pode causar hepatotoxicidade grave, nefrotoxicidade e supressão da medula óssea. Erupções cutâneas, coceira, tontura, queda de cabelo e sonolência são outros efeitos colaterais associados ao MTX (Dhanka; Shetty; Srivastava, 2017). Para superar essas dificuldades e aprimorar as propriedades farmacocinéticas, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas de administração sistêmica.

Nas últimas décadas, a administração de fármacos mediada por nanossistemas avançados, especialmente o sistema de administração direcionada de fármacos, tem sido amplamente estudada para reduzir a toxicidade sistêmica de fármacos no tratamento de diversas doenças crônicas (Chen *et al.*, 2022).

As nanopartículas de quitosana atuam como carreadores para proteger o MTX da degradação pelo ácido gástrico, enzimas e fígado (HOU *et al.*, 2025). Com o objetivo de aumentar a circulação do fármaco e a absorção celular, foram desenvolvidos alguns sistemas de liberação MTX com quitosana que podem ser verificados na Tabela 4.

As formulações mostram que existem vários fatores que não estão bem elucidados com relação à formação de nanopartículas desenvolvidas na presença de quitosana e metotrexato, dessa forma, surge a necessidade de investigar de maneira mais aprofundada, novas rotas sintéticas, estudos de estabilidade, melhoramento da capacidade de incorporação e aprimoramento de ensaios biológicos.

Tabela 4 – Sistemas de liberação de MTX com quitosana.

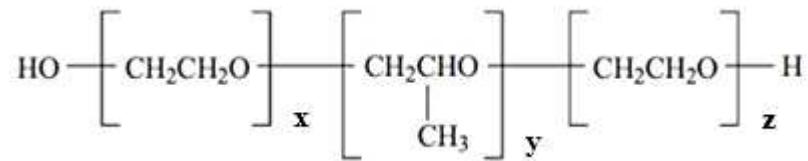
Formulação	Objetivo	Limitações	Referências
QTS modificada com sílica mesoporosa para liberação de MTX	Câncer de mama	(1) O reticulador glutaraldeído apresenta toxicidade; (2) As NPs com ~75 nm estão susceptíveis a fagocitose pelo sistema imunológico; (3) Apresenta baixa carga (%CF = 12,2) e eficiência de encapsulamento (%EE = 13,9)	Shakeran <i>et al.</i> , 2021.
Nanopartículas QTS-MTX carregadas com 5-fluorouracil	Câncer de colorretal	(1) Índice de polidispersão (IPD) acima de 0,3 evidenciando heterogeneidade em solução; (2) As NPs maiores que 300 nm dificultam a penetração de barreiras e captação celular; (3) Não apresenta estudo de estabilidade que é crucial para confirmar se não houve agregação.	Dos Santos <i>et al.</i> , 2025.
Nanopartículas de MIL 100 (Fe) revestidas de QTS-ácido hialurônico	Artrite Reumatoide	(1) Síntese complexa; (2) Índice de polidispersão (IPD) acima de 0,3 evidenciando heterogeneidade em solução; (3) As NPs maiores que 300 nm dificultam a penetração de barreiras e captação celular; (4) Não apresenta estudo de estabilidade.	Pouyanfar <i>et al.</i> , 2024.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.6 Poloxâmeros

Conforme descrito no *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook* (Gottschalek e McEwen, 2004), os poloxâmeros são definidos como polímeros em blocos de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) [PEO-PPO-PEO]. Vários poloxâmeros são conhecidos pelo nome comercial Pluronic®, seguido por uma letra e um número, L, F ou P, que se referem às formas físicas líquida, em flocos ou pastosa, respectivamente (Loyd, 1997). Os poloxâmeros geralmente obedecem à fórmula mostrada na Figura 4, onde os valores médios de x, y e z são definidos na Tabela 5.

Figura 4 – Estrutura geral de um poloxâmero.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Valores médios para x, y e z para poloxâmeros com a designação comercial (Pluronic®).

Poloxâmero	X	Y	Z	Pluronic nº
101	2	16	2	L-31
105	11	16	11	L-35
108	46	16	46	F-38
122	5	21	5	-
123	7	21	7	L-43
124	11	21	11	L-44
181	3	30	3	L-61
182	8	30	8	L-62
183	10	30	10	-
184	13	30	13	-
185	19	30	19	-
188	75	30	75	F-68
212	8	35	8	-
215	24	35	24	-
217	52	35	52	F-77
231	6	39	6	L-81
234	22	39	22	P-84
235	27	39	27	P-85
237	62	39	62	F-77
238	97	39	97	F-87
282	10	47	10	L-92
284	21	47	21	-
288	122	47	122	F-98
331	7	54	7	L-101
333	20	54	20	P-103
334	31	54	31	P-104
335	38	54	38	P-105
338	128	54	128	F-108
401	6	67	6	L-121
402	13	67	13	-
403	21	67	21	P-123
407	98	67	98	F-127

Fonte: adaptado de Singh-Joy e McLain (2008).

Os poloxâmeros são surfactantes não iônicos ou agentes tensoativo, não biodegradáveis, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e incluídos nas farmacopeias europeia e americana. Como não são tóxicos ou irritantes, podem ser usados como solubilizantes, estabilizantes e emulsificantes (Russo; Villa, 2019). São comumente utilizados em diversas aplicações industriais, como espumas, detergentes, cosméticos e, em particular, na indústria farmacêutica para a liberação controlada de substâncias ativas e fármacos, devido à sua biocompatibilidade. Em soluções aquosas, e em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), eles se automontam em micelas com um núcleo de PPO hidrofóbico circundado por uma coroa de PEO hidrofílica, proporcionando interessantes propriedades de automontagem e termogeleificação (Fonseca-García; Jiménez-Regalado; Aguirre-Loredo, 2021).

O poloxâmero 407 (Pluronic® F-127) destaca-se entre a família mais ampla de poloxâmeros devido ao seu comportamento termogelificante favorável que ocorre à temperatura fisiológica em soluções aquosas concentradas. Essa automontagem espontânea sob condições de baixa temperatura tornou o F-127 o atual biomaterial padrão ouro de seu tipo, com uma ampla gama de aplicações biomédicas. As propriedades anfifílicas do F-127 o tornam um modelo de estrutura para encapsulamento de uma ampla variedade de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas, incluindo fármacos, células e nanomateriais. Além disso, o F-127 está atualmente listado como ingrediente inativo em 16 diferentes medicamentos oftálmicos, orais e tópicos aprovados pela FDA, entre outros (Clerkin *et al.*, 2025).

Os estabilizantes desempenham um papel essencial na preparação e manutenção de nanopartículas. A alta energia de superfície das nanopartículas pode levar à aglomeração ou agregação de cristais de fármacos na ausência de um estabilizante apropriado. As principais funções de um estabilizante incluem a umectação completa das partículas de fármacos, a prevenção da maturação de Ostwald e a aglomeração da nanosuspensão para fornecer uma formulação fisicamente estável com barreiras estéricas ou iônicas. O tipo e a quantidade do estabilizante têm uma influência substancial na estabilidade física e no desempenho *in vivo* da nanosuspensão (Abou El Ela *et al.*, 2021).

Micelas de Pluronic F-127 carregadas de bufalin apresentaram melhor atividade antitumoral, levando a altos níveis de apoptose de células tumorais, ocasionando uma redução significativa no volume do tumor (Wang *et al.*, 2019). A curcumina encapsulada em micelas de Pluronic F-127 exibiu boa estabilidade em solução estoque em condições ambientais (Ganguly *et al.*, 2020). A solubilização dos fármacos antirreumáticos modificadores da doença (metotrexato, leflunomida e sulfassalazina) foi feita em micelas do copolímero tribloco

anfifílico Pluronic F127 (Agafonov *et al.*, 2019). Utilização de F-127 mostra a redução no efeito hemolítico (ruptura da membrana das hemácias), enquanto mantêm a atividade antitumoral *in vitro* do fármaco miltefosine (Feitosa *et al.*, 2019). Nesse contexto, a influência do Pluronic F127 na solubilidade, taxa de liberação e biodisponibilidade do MTX será avaliado.

No intuito de fomentar a pesquisa na área da artrite reumatoide e câncer, este trabalho busca propor uma maneira de produção de nanocarreadores de baixo custo na ausência de solventes orgânicos, baseado na formação de nanoestruturas através da atração eletrostática entre a forma catiônica da quitosana e a aniônica do metotrexato e avaliar o efeito da presença de Pluronic® F-127 como estabilizante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um nanocomplexos eletrolítico (NCEs) de quitosana (QTS) e metotrexato (MTX) em solução aquosa com potencial ação antirreumática e anticancerígena.

2.2 Objetivos específicos

Verificar o efeito da razão molar de QTS/MTX na formação dos NCEs;

Estudar os fatores de proporção, ordem de adição e a presença de F-127 na formação dos NCE;

Caracterizar os NCEs quanto à capacidade de incorporação do MTX, tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, FTIR, TGA e MEV;

Determinar a estabilidade dos NCE em solução estoque;

Demonstrar o perfil cinético de liberação dos NCEs em tampão fosfato (PBS) simulando pH do ambiente inflamatório;

Avaliar o efeito citotóxico dos NCEs sobre células leucêmicas HL-60 e a linha de células não tumorais MRC-5;

Analisar o efeito toxicológico, anti-inflamatório e anti-hipernocetivo dos NCEs em Zebrafish (*Danio rerio*) e em modelo de artrite induzida por zymosan em ratos;

Avaliar a toxicidade sobre os parâmetros renais e hepáticos em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A quitosana comercial (grau de desacetilação = 77% e $M_v 1,4 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) foi obtida da Polymar. O metotrexato (Padrão Secundário Farmacêutico acreditado pelas normas NA/IEC 17025 e NA 17034), o Pluronic F-127 e o Zymosan foram oriundos da Sigma-Aldrich®. Ácido acético (CH_3COOH), álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), formalina (formaldeído; 0,1%), cânfora, morfina foram obtidos da Synth®. O hidróxido de sódio (NaOH), o fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico (Na_2HPO_4) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) são oriundos da Vetec®. Dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Cequímica. A κ -carragenana foi obtida Palazzo do Diet Light e ibuprofeno obtido do Advil.

3.2 Purificação da quitosana

A quitosana foi purificada pela metodologia descrita por Nati *et al.* (2009), com modificações. Cerca de 10 g de quitosana comercial foram dissolvidas em 1000 mL de ácido acético (2 %v/v). Essa solução permaneceu sob agitação magnética de 300 rpm durante 24 h até completa solubilização. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 min a 6000 rpm, o sobrenadante foi precipitado com $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 10 sob agitação constante. Posteriormente, a solução passou por um processo de centrifugação de maneira análoga à anterior, mas nessa nova etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (sal de quitosana) foi recolhido. O precipitado foi lavado com água destilada até que a condutividade da solução se equiparasse à condutividade do solvente. Em seguida, o material foi lavado utilizando álcool etílico 96 %v/v. Após a lavagem, o precipitado passou por processo de secagem utilizando acetona e jatos de ar quente.

3.3 Síntese dos NCEs

A formação dos NCEs seguiu a metodologia descrita por Carvalho *et al.* (2018), com modificações. A solução de quitosana ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo 500 mg de QTS em 100 mL de ácido acético (0,5 %v/v); com agitação à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h para completa dissolução. Os grupamentos amino da quitosana se encontram protonados, formando a porção catiônica ($-\text{NH}_3^+$) do complexo obtendo um pH final $4,5 \pm 0,5$.

A solução de metotrexato ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo 125 mg de MTX em 15 mL de água ultra purificada (deionizada); com agitação à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em meio alcalinizado com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 10. Em seguida, o volume foi aferido para 25 mL com água

deionizada. Nessas condições, os grupos ácidos carboxílicos se encontram desprotonados na presença de base formando a porção aniônica ($-\text{COO}^-$) do complexo.

Inicialmente, foram testadas razões molares de QTS/MTX 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 para observar a influência das proporções e da ordem de adição. Para o cálculo da quantidade em mol da quitosana utilizou-se a massa molar da unidade monomérica média considerando o grau de acetilação ($171,9 \text{ g mol}^{-1}$). Para o cálculo da carga, foi considerada a desprotonação dos dois ácidos carboxílicos presentes na estrutura do MTX. No entanto, foi observada que a adição de MTX sobre a QTS em todas as proporções mencionadas provocavam a formação de grandes aglomerados, sendo descartada como opção para produção dos NCEs.

Apenas a ordem de adição QTS sobre MTX foi avaliada, pois durante a preparação foi observada apenas a turvação do sistema sem a presença de precipitados. As duas soluções foram filtradas em funil de placa sinterizada de porosidade 3 e 4 e, posteriormente, diluídas nas concentrações desejadas. Os complexos polímero-fármaco foram preparados por gotejamento de $700 \mu\text{L}$ da solução de MTX em água deionizada e o volume aferido para 10 mL . Essa mistura foi colocada em um béquer de 25 mL sob agitação magnética (300 rpm ; 25°C ; 10 min). Em seguida, foram gotejados [(1 gota a cada 3s) com auxílio de uma micropipeta ($100 - 1000 \mu\text{L}$)] cerca de $460 \mu\text{L}$ de QTS (quantidade constante para as demais razões molares), deixando sob agitação durante 5 min (razão molar QTS/MTX 1,75). Para as demais razões molares 1,5; 1,25; 1; 0,75 foram usados respectivamente, $835 \mu\text{L}$, $1002 \mu\text{L}$, $1250 \mu\text{L}$, $1671 \mu\text{L}$ de MTX.

Os testes com a presença de F-127 foram realizados com os NCEs que apresentaram melhores resultados de estabilidade. Solução aquosa de F-127 na concentração de 4 \%m/v foi gotejada em $130 \mu\text{L}$, $196 \mu\text{L}$ e $261 \mu\text{L}$, que apresentam concentrações finais de $0,05$; $0,075$; $0,1 \text{ \%m/v}$, respectivamente nas soluções de NCEs pré-formados. Em seguida, os NCEs foram mantidos por 24 h em repouso. Posteriormente, as soluções foram dialisadas em membrana de diálise de acetato de celulose ($14.000 \text{ g mol}^{-1}$) por 12 h em 5 L de água destilada (na ausência de luz) e foram liofilizadas para obtenção dos NCEs secos.

3.4 Caracterizações físico-químicas dos materiais precursores e dos NCEs

3.4.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas foram obtidas por DLS com espalhamento de contracorrente não invasivo (DLS-NIBS) na temperatura de 37°C , em concentrações variadas. A amostra foi exposta a um laser vermelho (633 nm), com detecção realizada em um ângulo de 173° . O potencial zeta dos copolímeros foi avaliado por meio do velocímetro laser Doppler com

análise de fase de troca de luz (M3PALS). O equipamento Nanosizer ZS 3600 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) foi usado para ambos os estudos.

3.4.2 Capacidade de incorporação do MTX aos NCEs

As soluções de NCEs foram liofilizadas, e o material obtido foi dissolvido em tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) por 24 horas e centrifugado a 15.000 rpm por 30 minutos, a fim de romper as matrizes dos NCEs e liberar o fármaco na solução, sendo possível quantificar a sua incorporação. A concentração de MTX foi medida por espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-vis) em 302 nm após a centrifugação. Um espectrofotômetro Shimadzu® modelo UV-1800 foi empregado.

A eficiência foi determinada e a carga de fármaco calculada por meio de uma curva de calibração (APÊNDICE A), que relacionou a absorvância à concentração (R = 0,9997).

A Equação 1 foi usada para determinar a concentração de MTX.

$$ABS = 0,00887 + 47,91c \quad (1)$$

onde c é a concentração de MTX em mg mL⁻¹.

As Equações 2 e 3 foram utilizadas para determinar a Eficiência de Encapsulamento (EE) e o Conteúdo de Fármaco (CF), respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{\text{Massa de fármaco extraído do nanocomplexo}}{\text{Massa inicial de fármaco adicionado na síntese}} \times 100 \quad (2)$$

$$CF(\%) = \frac{\text{Massa de fármaco extraído do nanocomplexo}}{\text{Massa do nanocomplexo}} \times 100 \quad (3)$$

3.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os materiais precursores e os NCEs foram analisados em pastilhas de brometo de potássio utilizando o espectrofotômetro Shimadzu modelo IRTracer100 (Kyoto, Japão), na faixa espectral de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.4.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise TGA dos materiais precursores e dos NCEs foi conduzida após liofilização utilizando o equipamento Q-50 TA, em ambiente nitrogenado, com fluxo de 50

mL/min. Uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto foi aplicada em uma faixa de 25 °C a 900 °C. Amostras de cerca de 10,0 mg foram analisadas em cadinho de platina.

3.4.5 *Ensaio de liberação in vitro*

O ensaio de liberação do MTX foi conduzido utilizando um sistema de diálise (Yua *et al.*, 2019). Os NCEs nas razões molares QTS/MTX 1 e 0,75 foram diluídos em tampão fosfato com pH 5, simulando o ambiente ácido de células inflamatórias. As soluções foram inseridas em sistemas que continham uma membrana de acetato de celulose, com corte de 14.000 g mol⁻¹. O sistema foi dialisado por 96 horas a 37 °C, utilizando 40 mL de solução tampão (pH 5; 0,1 mol L⁻¹). A liberação de MTX foi monitorada em intervalos de tempo (0,5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 24; 48; 72 e 96 h) por espectrofotometria na região ultravioleta-visível (UV-vis) a 302 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de liberação utilizando a curva de calibração (APÊNDICE B), estabelecendo uma relação entre absorbância com a concentração (R = 0,9998).

A Equação 4 foi utilizada para determinar a concentração liberada de MTX durante o intervalo de tempo analisado.

$$ABS = 0,00136 + 48,10c \quad (4)$$

onde c é a concentração de MTX em mg mL⁻¹.

3.4.6 *Cinética de liberação do MTX*

Foram propostos cinco modelos matemáticos diferentes para investigar a cinética de liberação do MTX com base em dados de liberação *in vitro*. A otimização da cinética de liberação é necessária para a interpretação do perfil de liberação adequado para o sistema desenvolvido. A Tabela 6 mostra os modelos empregados para interpretação do perfil de liberação do MTX.

Tabela 6 – Modelos cinéticos de liberação.

Nome do modelo	Equação	Variáveis e definições
Ordem zero	$Q_t = Q_0 + k_0t$	<p>Q_0 é a concentração inicial do medicamento no momento (t_0); Q_t é a quantidade de medicamento liberada no momento (t), e k_0 é a constante de velocidade de ordem zero.</p>
	$\text{Log } Q_t = \text{log } Q_0 + k_1t$	<p>k_1 é a constante de velocidade de primeira ordem (expressa em tempo⁻¹ ou por hora).</p>
Higuchi	$Q_t = Q_0 + k_Ht^{1/2}$	<p>k_H é a constante de dissolução de Higuchi.</p>
Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{Q_t} - \sqrt[3]{Q_0} = k_{HC}t$	<p>onde k_{HC} é a constante de Hixson-Crowell.</p>
Korsmeyer -Peppas	$Q_t = k_{KP}t^n$	<p>k_{KP} é a constante de proporcionalidade e n é o índice de liberação como um indicador do mecanismo de liberação do fármaco.</p>
Zeng	$\frac{M_t}{M_0} = \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_s t}) + \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_{off} t})$	<p>k_s é a taxa de difusão do fármaco, k_{on} é a taxa de associação do fármaco e k_{off} é a taxa de dissociação do fármaco.</p>

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4.7 Estudos de estabilidade de armazenamento

Como parâmetros de estabilidade das nanopartículas, analisou-se o diâmetro médio (Z-Ave) e o índice de polidispersão (IPD). Esses parâmetros foram analisados com base em soluções obtidas após diálise a 4 ± 2 °C (Temperatura recomendada para o armazenamento do fármaco) em água destilada por um período de 6 meses (DOS SANTOS *et al.*, 2023). As medições foram determinadas a 37 °C em triplicata usando soluções de NCEs em concentrações variadas, no equipamento modelo Malvern Nano Zetasizer ZS 3600.

3.4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura, obtidas com o microscópio FEI® modelo Quanta 450 FEG, permitiram a observação da morfologia dos NCEs. A voltagem de aceleração foi ajustada para 20 kV, e a ampliação das imagens foi configurada para 150.000 vezes. As soluções foram gotejadas em um suporte de aço com fita de carbono para a preparação das amostras que foram submetidas a rotação promovida pelo Spin Coater KM-4^a – SPI Supplies em dois estágios de velocidades: estágio 1 – 1500 rpm por 15s e estágio 2 – 6000 rpm por 45 s, para melhor aderência das amostras à fita de carbono. As amostras secas foram metalizadas na metalizadora Quorum® modelo QT150 ES, com cobertura de ouro em atmosfera de argônio.

3.5 Citotoxicidade

3.5.1 Cultura celular

A HL-60 (Gallagher *et al.*, 1979) e a linha celular de fibroblastos pulmonares não tumorais MRC-5 (Jacobs; Jones; Baille, 1970) foram utilizadas neste estudo como modelo *in vitro* para estudos de toxicidade. A linhagem HL-60 foi mantida em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco ®), enquanto a linhagem de células não tumorais MRC-5 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco ®). Ambos os meios de crescimento foram suplementados com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Gibco®), 1 % (v/v) de penicilina (100 U mL^{-1}) e estreptomicina (100 mg mL^{-1}) (Invitrogen®), e as células foram mantidas numa atmosfera de 5 % de CO₂, umidificada pelo ar, a 37°C.

3.5.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio Alamar Blue

A linha de células leucêmicas HL-60 e a linha de células não tumorais MRC-5

foram colocadas em uma placa de 96 poços a uma concentração de 5×10^3 e 3×10^3 células por poço, respectivamente. Após 24 horas, as células e as amostras foram tratadas em uma curva de concentração-resposta ($100 - 1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 72 horas. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada com a adição de Alamer Blue ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 3 horas (Rampersad, 2012) e a fluorescência (Ex/Em: 560/590 nm) foi medida no leitor de microplacas Biotek Synergy™ HI (Agilent) e a concentração inibitória máxima (IC_{50}) foi determinada.

3.5.3 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em três experiências independentes (triplicata), e os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). A análise da distribuição normal foi feita utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O grupo de controle negativo (CN) foi definido como 100% da viabilidade celular e a concentração inibitória meio-máxima (IC_{50}) foi estimada através da percentagem de inibição \times log da concentração, sendo a IC_{50} e o seu intervalo de confiança (95%) determinados a partir de regressão não linear. O software GraphPad Prism 5.01 foi utilizado para a análise dos dados.

3.6 Avaliação do efeito toxicológico, anti-inflamatório e anti-nociceptivo em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Os experimentos expressos a seguir refletem os resultados obtidos para NCE na razão QTS/MTX 1 na ausência de F-127.

3.6.1 Amostra

NCE nas doses de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $400 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.6.2 Modelo animal zebrafish

Peixe-zebra (*Danio rerio*) (com idade entre 90 e 120 dias; peso de $0,4 \pm 0,1$ g e comprimento de $3,5 \pm 0,5$ cm), de origem silvestre e de ambos os sexos, foi comprado em uma loja local em Fortaleza, CE. Os animais foram mantidos em um aquário de vidro de 10 L ($n = 3/L$), com dimensões de $30 \times 15 \times 20$ cm, a uma temperatura de 25 ± 2 °C. O aquário foi submetido a ciclos de claro-escuro de 24 h, utilizando água clorada (ProtecPlus®) e bomba de ar com filtros submersos. A temperatura foi mantida em 25 °C, com pH de 7,0 e ciclo circadiano de 10 – 14 h (claro/escuro). Os peixes foram alimentados com ração (Spirulina®) à vontade 24 horas antes dos experimentos. Antes da administração dos medicamentos, os animais foram

anestesiados em água gelada. Após os experimentos, foram sacrificados por imersão em água gelada (2 e 4 °C) por 1 minuto, até que os movimentos operculares cessassem. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; n.º 04983945/2021), em conformidade com os Princípios Éticos da Experimentação Animal. Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Bioensaios Químico-farmacológico e Ambiental (LABQFAM – UECE).

3.6.3 Protocolo geral

Zebrafish adultos de ambos os sexos foram escolhidos de forma aleatória para os experimentos. Eles foram colocados em uma esponja úmida e submetidos ao tratamento com a amostra teste ou controles (DMSO 3% ou morfina) por via intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.), seguindo as metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017) e Bezerra *et al.* (2021). Posteriormente, os animais foram colocados individualmente em um recipiente de 500 mL, contendo 350 mL de água do aquário, e deixados em repouso. Foram empregadas seringas de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com agulha de calibre 30G para tratamentos intraperitoneais (i.p.), enquanto a micropipetadora automática monocal (10 – 100 µL) foi utilizada para tratamentos orais. Todos os grupos de animais que receberam os compostos passaram por testes de toxicidade aguda, nocicepção e inflamação.

3.6.4 Toxicidade aguda 96 h

Neste experimento, os peixes (n = 6/grupo) receberam a amostra NCE (40; 200 e 400 µg kg⁻¹; 20 µL) ou veículo (grupo controle: DMSO a 3 %; 20 µL; i.p.) por via oral (v.o.). Após os tratamentos, os animais foram deixados em repouso para análise da taxa de mortalidade por um período de 96 h. A cada 24 h, registrou-se o número de peixes mortos em cada grupo. A dose letal capaz de matar 50% dos animais (DL50) foi determinada pelo método matemático Trimmed Spearman-Kärber, com intervalo de confiança de 95% (OECD 2019; Arellano-Aguilar *et al.*, 2015).

3.6.5 Tratamentos

Para realização dos testes de nocicepção os animais (n = 6/grupo) foram tratados com a amostra NCE (40; 200 e 400 µg kg⁻¹; 20 µL; v.o.), morfina (8 mg kg⁻¹; 20 µL; v.o. – controle positivo) ou veículo (solução de DMSO a 3%; 20 µL; v.o.) e formalina (nas fases neurogênica e inflamatória 0,1 %; 5,0 µL).

No teste inflamatório, os animais ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados por via oral (20 μL) com a amostra NCE (40; 200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$; v.o.); ibuprofeno (100 mg kg^{-1} , v.o. – Controle positivo); carragenana 1,5% (20 μL , i.p. – indutor do edema e controle negativo) e veículo (solução de DMSO a 3%; 20 μL ; v.o.).

3.6.6 Comportamento nociceptivo induzido por formalina

Peixes adultos ($n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados (20 μL ; v.o.) com a amostra NCE nas diferentes doses (40; 200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$; v.o.). Um segundo grupo de animais foi pré-tratado com morfina (8 mg kg^{-1} ; controle positivo) e um terceiro grupo foi pré-tratado com veículo (solução de DMSO a 3%; controle negativo). Após 60 min de realizados os pré-tratamentos, foi realizada a aplicação i.m. (intramuscular) do agente nocivo – formalina (0,1%; agonista de TRPA1) administrada na cauda dos animais. A analgesia foi avaliada através da atividade locomotora pelo número de cruzamentos realizado no teste de campo aberto em placa de Petri durante 30 min de análise, calculada tanto na fase neurogênica (0 – 5 min) quanto na fase inflamatória (15 – 30 min) (Silva *et al.* 2020).

Para avaliação da participação do receptor TRPA1 no efeito antinociceptivo dos NCE, um novo grupo de animais adultos ($n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratado intraperitonealmente (10 μL ; i.p.) com cânfora (30,4 mg kg^{-1}), e após 30 min, os animais receberam tratamento com a melhor dose efetiva (antinociceptiva) da amostra de NCE (400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [F1] e 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [F2]; 10 μL ; v.o.). Um outro grupo foi pré-tratado com veículo (solução de DMSO a 3%; controle negativo), morfina (8 mg kg^{-1} ; controle positivo) e um grupo tratado com cânfora (30,4 mg kg^{-1}) foram incluídos na análise. Após 60 min, os grupos foram tratados por via i.m. (intramuscular) com formalina (0,1%; agonista de TRPA1; 5 μL) aplicada na cauda dos animais e em seguida, levados para o teste de campo aberto. A analgesia foi avaliada como descrito anteriormente (Lima *et al.* 2020).

3.6.7 Indução de edema abdominal por κ -carragenana

No teste de inflamação observa-se a formação de edema abdominal e o aumento de peso do peixe induzido pela κ -carragenana 1,5% por um período de 4 horas seguidas (Silva *et al.*, 2020). Os peixes sem tratamento foram inicialmente identificados e pesados e em seguida 3 grupos ($n=6$, cada) foram tratados com a amostra NCE com concentrações de MTX de 40; 200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$; v.o., em outro grupo foi aplicado o anti-inflamatório ibuprofeno (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, v.o. – Controle positivo) e um grupo com DMSO 3% (veículo – controle negativo). Após o período de 1 hora em repouso foi realizada a aplicação em todos os grupos por via

intraperitoneal (i.p.) da κ -carragenana a 1,5%, permanecendo em repouso por mais 1 hora. Após esse período os peixes seguiram para pesagem a cada hora por um período de 4 horas seguidas. Esses dados foram plotados e calculada a diferença entre o peso inicial do peixe sem tratamento em relação ao peso do peixe após cada hora de aplicação da κ -carragenana até o tempo final de 4h (Alves *et al.*, 2022).

3.6.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média para cada grupo de seis animais. Após verificar a normalidade da distribuição e a homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram analisadas por meio da ANOVA unidirecional (one-way ANOVA). Para os mecanismos de ação e teste de inflamação, utilizou-se a ANOVA bidirecional (two-way ANOVA), seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism v. 8.0. O nível de significância estatística foi definido como 5% ($p < 0,05$).

3.7 Análise do efeito anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo do NCE em ratos

Os experimentos expressos a seguir refletem os resultados obtidos para NCE na razão QTS/MTX 1 ausência de F-127.

Ratos machos da linhagem Wistar (200 – 220 g) foram mantidos sob condições controladas (22 – 25 °C, ciclo de luz de 12 h) e receberam água e comida à vontade. Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do NIH (publicação nº 85-23, revisada em 2011) e do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovados pelo comitê de ética local (CEUA/UECE nº 03610944/2023). Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação (LAFFIN-UECE).

3.7.1 Artrite induzida por Zymosan e tratamento

A artrite foi induzida pela injeção de Zymosan (500 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) na articulação tibio-tarsal direita de ratos sedados e anestesiados (xilazina 10 mg kg^{-1} + cetamina 80 mg kg^{-1} , i.m) (Bringel *et al.*, 2020). Os animais do grupo controle receberam 0,9 %m/v NaCl (solução salina estéril; 25 μL i. art.). Os animais receberam MTX através das NCEs (MTX-NCE: 20 – 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ou MTX (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) por via subcutânea (sc) 30 min antes da indução da artrite por Zymosan (Rafik *et al.*, 2023).

3.7.2 Medição de edema e hipernocicepção articular

O edema e a hipernocicepção (termo que se refere a dor do animal) articular foram avaliados por até 6 horas após a indução da artrite. O edema foi mensurado em milímetros usando um paquímetro digital. Para avaliar a hipernocicepção, os animais foram colocados individualmente em caixas de plexiglas com piso de rede maleável para permitir acesso à superfície ventral das patas traseiras. Uma sonda de área larga (4,15 mm²) acoplada a um algosímetro digital EFF 302 (Insight®) posicionada no centro da almofada da pata, foi utilizada a fim de causar flexão da articulação. Um limiar mecânico reduzido (g) necessário para evocar a resposta de retirada da pata é indicativo de hipernocicepção (Bringel *et al.*, 2020).

3.7.3 Migração de leucócitos para a cavidade sinovial

Na sexta hora após a indução, os animais foram eutanasiados. As articulações tibiotársicas foram lavadas duas vezes com 100 µL de tampão fosfato (PBS), com 10 mmol L⁻¹ de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Uma câmara de Neubauer foi usada para contar o total de leucócitos do lavado articular. O líquido coletado foi submetido à centrifugação a 670 G por 15 min. O sobrenadante foi armazenado (-80 °C), e o pellet resultante foi ressuspensão com 50 µL de PBS e utilizado para a confecção de lâminas de esfregaço, coradas com H&E e realizada contagem diferencial de leucócitos (Bringel *et al.*, 2020).

3.7.4 Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), empregada como indicador da presença de neutrófilos, foi avaliada em amostras de líquido articular. As amostras do lavado articular foram incubadas em uma solução de HTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio), centrifugadas (4.500 G; 15 min; 4 °C) e o sobrenadante foi coletado. Posteriormente, as amostras foram plaqueadas e adicionou-se 200 µL da solução de leitura, composta por 5 mg de Odianisidina, 15 µL de H₂O₂ a 1%, 3 mL de tampão fosfato e 27 mL de H₂O. A atividade da MPO foi medida pela velocidade de oxidação do substrato O-dianisidina na presença de H₂O₂, resultando na formação de um composto de cor marrom. Em diferentes momentos (t 0 min; t 1 min e t 3 min), a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas (Apollo LB913, Berthold Technologies). Os resultados foram apresentados como atividade de MPO por mililitro de fluido articular (Bradley; Christensen; Rothstein, 1982).

3.7.5 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (n=6) e analisados por meio da análise de variância de um fator (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.8 Toxicidade aguda em ratos

3.8.1 Peso corporal e massa relativa dos órgãos

Imediatamente após a eutanásia, a massa relativa dos órgãos (fígado, rins, baço) foi medida usando a relação:

$$\text{Massa relativa dos órgãos (\%)} = \text{massa dos órgãos/peso corporal} \times 100 \quad (5)$$

3.8.2 Avaliação hematológica e bioquímica

Os animais foram sedados com xilazina (10 mg kg⁻¹) e cetamina (100 mg kg⁻¹) antes da coleta de sangue e eutanásia por inalação de CO₂. Os níveis séricos de ureia, creatinina e a atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) foram medidos utilizando kits Randox.

3.8.3 Avaliação histopatológica dos órgãos

Para análise de alterações histopatológicas dos órgãos-alvo, rim, baço e fígado, os mesmos foram fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina, seccionados (5 μ m) e corados com H&E. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica e imagens ampliadas foram capturadas para avaliar a presença e a extensão das alterações morfológicas.

3.8.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (EPM) ou mediana (intervalo interquartil). O teste t foi utilizado para analisar a comparação entre dois grupos, enquanto a ANOVA, acompanhada pelo teste de Bonferroni, foi empregada para comparar três ou mais grupos. A triagem hipocrática de Malone foi analisada utilizando o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos NCEs

A síntese dos NCEs foi possível devido à natureza eletrostática dos materiais precursores. A quitosana é um polissacarídeo linear de natureza catiônica amplamente utilizado na indústria farmacêutica, esses aspectos podem facilitar a taxa de carregamento de fármacos carregados negativamente (Han *et al.*, 2023). O metotrexato apresenta em sua estrutura química dois ácidos carboxílicos que, em meio alcalino, sofrem desprotonação levando à formação do carboxilato, o que confere o caráter aniônico ao fármaco. A formação do complexo envolve o monitoramento do comportamento molecular em solução, sua estabilização ou agregação, formação complexa e/ou interação com o solvente, que é consequência do equilíbrio das interações intermoleculares, sendo cruciais quando se considera sua atividade biológica. (Carvalho *et al.*, 2018).

Para as formulações das proporções estudadas foi observada a resposta relacionada ao tamanho médio de partícula (*Z-Ave*), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ) com relação as razões molares entre os componentes. A Tabela 7 mostra as quantidades presentes de cada um dos componentes nas sínteses realizadas.

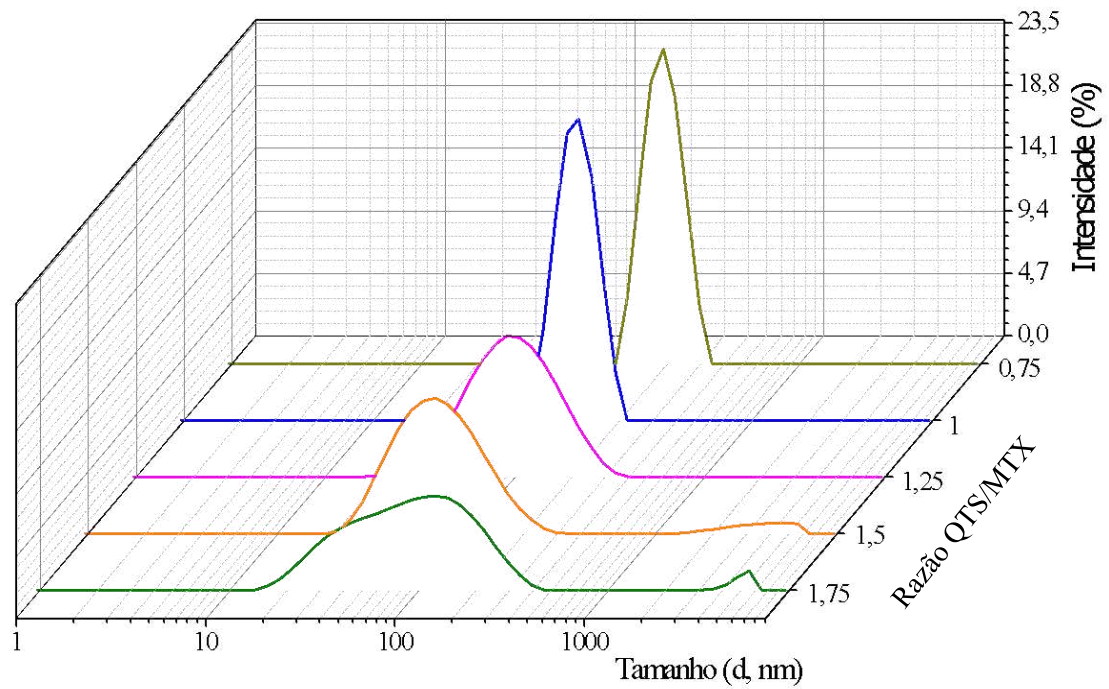
Tabela 7 – Proporções reacionais dos componentes presentes nas sínteses.

Nomenclatura das amostras	Razão molar	Razão de cargas (n^+/n^-)	QTS/MTX (%m/m)
QTS/MTX 1,75	1,75	0,66	39,6 / 60,3
QTS/MTX 1,5	1,50	0,56	35,5 / 64,5
QTS/MTX 1,25	1,25	0,47	31,5 / 68,5
QTS/MTX 1	1,00	0,37	26,9 / 73,1
QTS/MTX 0,75	0,75	0,28	21,6 / 78,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

O intervalo de razões molares foi selecionado após uma série de tentativas. Foi observado que razões inferiores a 0,75 ocasionavam a precipitação dos materiais, sendo esse o limite para formulações de soluções coloidais estáveis. Por outro lado, razões superiores a 1,75 não foram capazes de formar nanoestruturas com boa uniformidade, como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Distribuição de tamanhos dos NCEs.

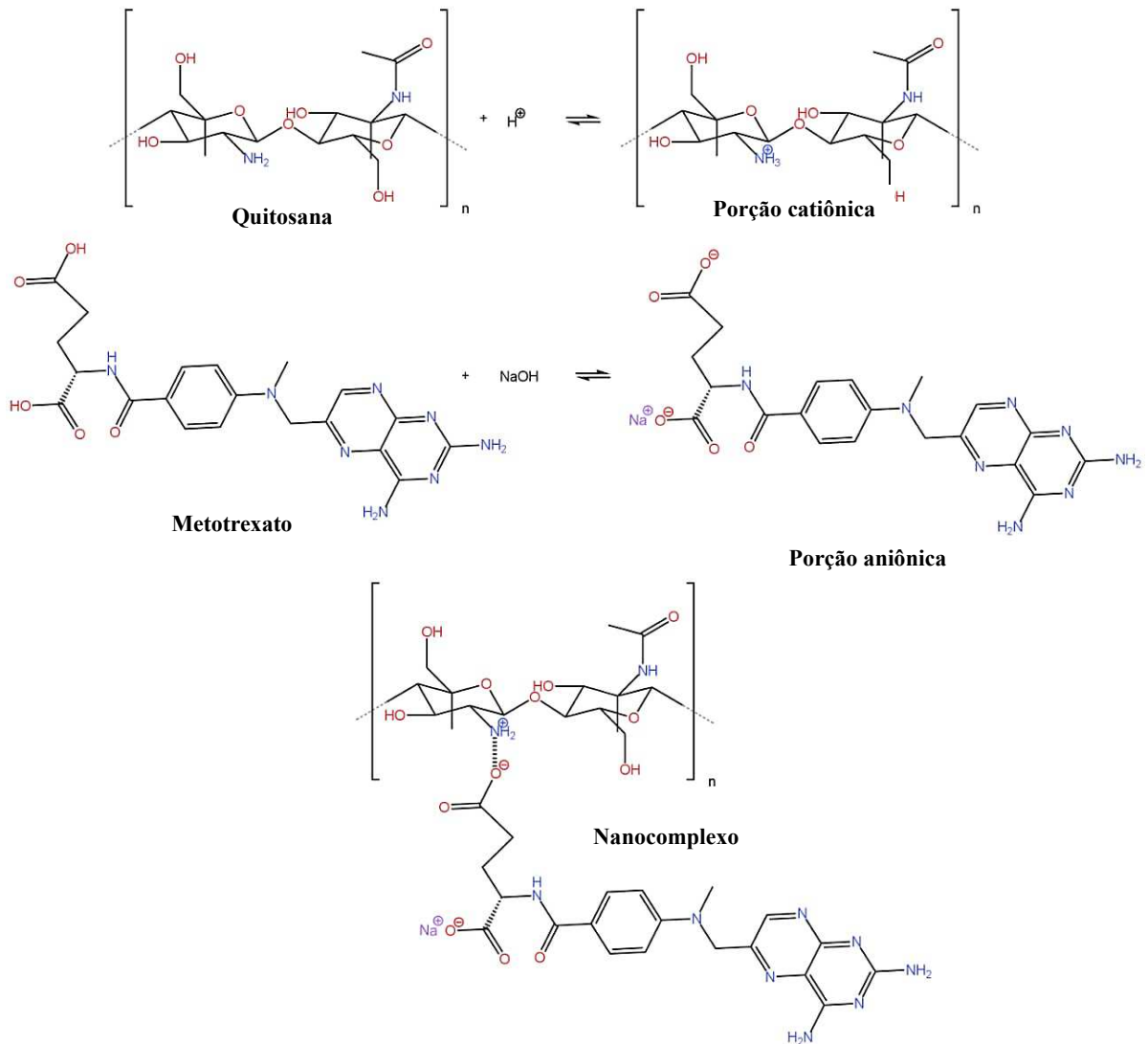


Fonte: Elaborado pelo autor.

As bandas com a razão molar QTS/MTX 1 e 0,75 são mais estreitas, comparadas as demais, evidenciando uma maior uniformidade de tamanhos de partículas, além de apresentar distribuição unimodal que indica maior estabilidade.

A proposta esquemática da reação de síntese dos NCEs polímero-fármaco está representada na Figura 6.

Figura 6 – Formação do nanocomplexo polímero-fármaco: desenvolvimento de interações eletrostáticas entre quitosana (QTS) catiônica e metotrexato (MTX) aniônico.



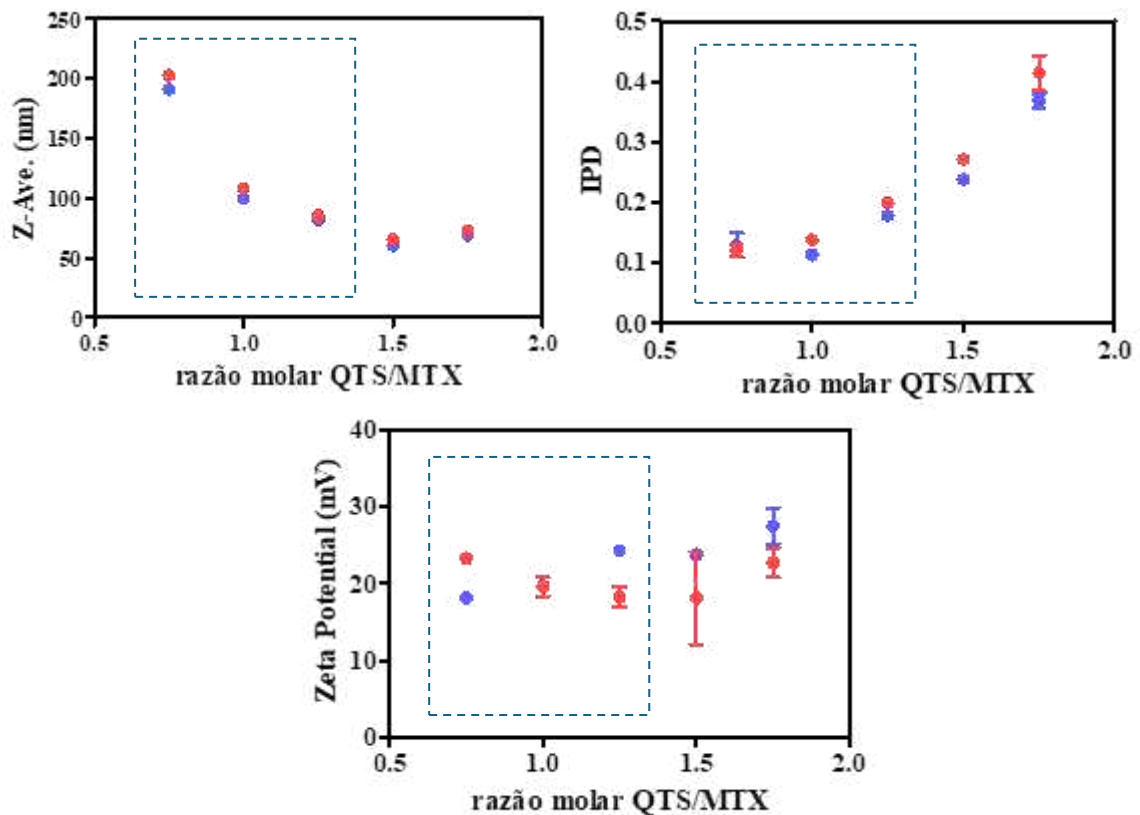
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Caracterizações físico-químicas dos materiais precursores e dos NCEs

4.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Os resultados das principais características dos NCEs em solução podem ser observados na Figura 7. As análises foram realizadas 24 h após a formação dos NCEs e pós-dialise, no intuito de verificar alguma mudança substancial nas propriedades dos materiais. Observou-se que após a diálise o diâmetro dos NCEs, IPDs e potencial zeta não sofreram alterações significativas, mantendo as características pós-síntese. O pH final após formação e pós-dialise são semelhantes ($5,0 \pm 0,5$).

Figura 7 – Relação entre a razão molar e a variação de tamanhos de partículas, IPDs e potenciais zeta: (●) 24 h após síntese e (●) após diálise.



Fonte: Dados da pesquisa.

Como relatado na literatura, o índice de polidispersão IPD determina a homogeneidade de tamanho das nanopartículas. Valores superiores a 0,3 indicam baixa uniformidade, sendo uma indicação de agregação (Pauluk *et al.*, 2019). De acordo com os resultados obtidos, as razões molares que apresentaram índices inferiores a 0,3 de IPD foram os NCEs 1,25; 1; 0,75 o que mostra que esses sistemas, dentre os analisados, são os que apresentam melhor uniformidade em solução. O potencial zeta é um parâmetro que especifica a carga superficial das nanopartículas, e essa carga é influenciada pela composição e pH do meio em que as nanopartículas estão dispersas. Os NCEs apresentam potencial zeta de aproximadamente + 20 mV. Esse valor está dentro do padrão recomendado para uma boa estabilidade que varia entre ± 15 a ± 30 mV (Shafiq *et al.*, 2022). Com relação ao potencial zeta, todas as nanopartículas obtidas apresentaram um potencial positivo, evidenciando a predominância da quitosana na superfície do NCEs. Isso pode levar a benefícios farmacocinéticos, uma vez que as nanopartículas carregadas positivamente tendem a interagir de forma mais eficaz com a carga negativa predominante nas membranas celulares,

evidenciando a propriedade mucoadesiva da quitosana (Kamel *et al.*, 2017; Bilginaylar *et al.*, 2022).

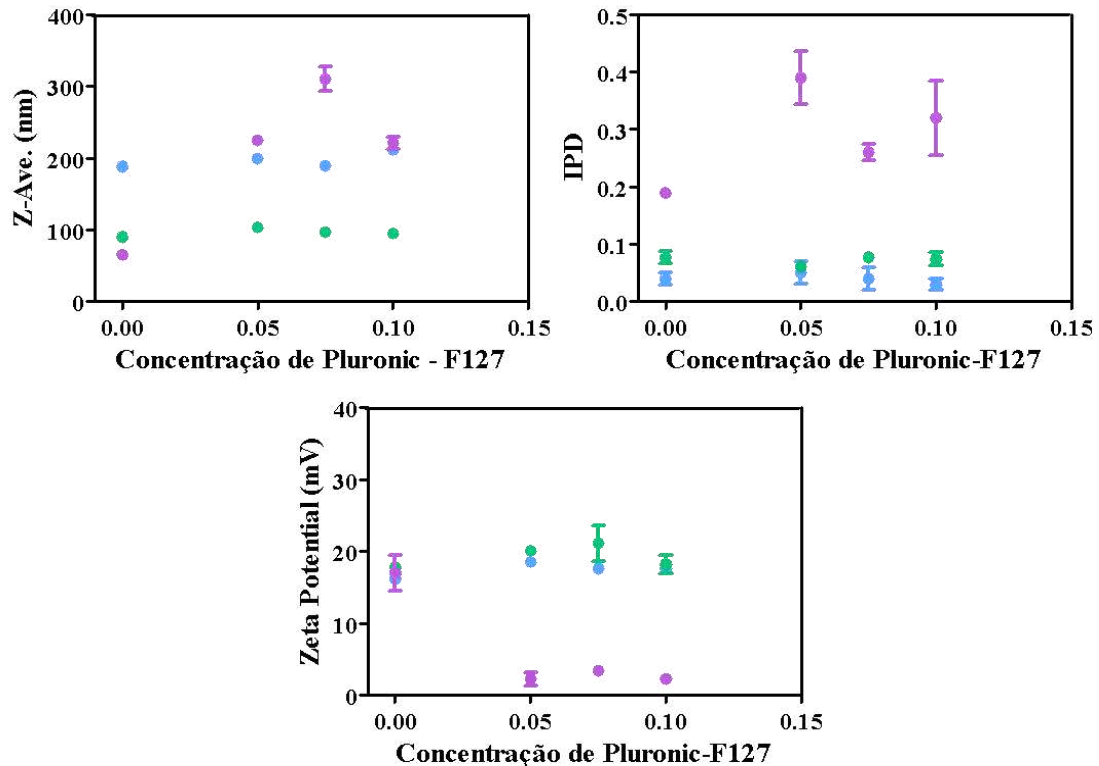
Todas as formulações apresentaram diâmetros médios adequados para aplicação biológica, valores inferiores a 300 nm. É possível observar que à medida que a proporção aniônica (MTX) aumenta, o diâmetro dos NCEs apresenta um significativo aumento, o que é mais proeminente quando comparamos os sistemas 0,75 e 1, onde essa variação chega a aproximadamente 100 nm. Isso pode ser justificado devido a maior proporção de cargas negativas, chegando próximo ao ponto isoelétrico e levando uma possível agregação indesejada. Por isso, a razão 0,75 é a limite para a estabilidade coloidal, como mencionada anteriormente.

Através dos resultados preliminares, as razões molares QTS/MTX 0,75; 1; 1,25 foram selecionadas para as características físico-químicas em solução sugerem melhores resultados biológicos.

É relatado na literatura que a uma elevada quantidade de cargas na superfície da nanopartícula pode levar à aglomeração ou agregação do fármaco na ausência de um estabilizador apropriado. As principais funções de um estabilizador incluem a formulação com barreiras estéricas ou iônicas (Abou El Ela *et al.*, 2021). O tipo e a quantidade do estabilizador têm uma influência substancial na estabilidade física e desempenho *in vivo* da nanopartícula. Dessa forma, buscou-se introduzir ao sistema um agente estabilizador que apresentasse alta biocompatibilidade. O estabilizante selecionado foi o F-127, que é vastamente utilizado na indústria farmacêutica. Esse surfactante não interfere na formação do nanocomplexo QTS/MTX, uma vez que ele é adicionado após a formação da nanopartícula. Por não apresentar cargas em sua estrutura, não fornece uma competição iônica que interfira na formação do sistema.

Assim, o F-127 foi acrescentado após a síntese dos NCE nas concentrações de 0,05; 0,075; 0,1 %m/v observando o volume final dos sistemas. Essas concentrações adicionadas de F-127 são inferiores à sua concentração micelar crítica (CMC), que é 0,79 mmol L⁻¹ ou 1% m/v (medido a 24,5 °C) (Aich *et al.*, 2013), evitando a competição entre a formação de micelas e adsorção aos NCE. Os resultados observados estão dispostos na Figura 8.

Figura 8 – Relação entre a concentração de F-127 nas razões molares de QTS/MTX de 0,75 (●), 1 (●) e 1,25 (●) e a variação de tamanhos de partículas, IPDs e potencial zeta (pós-diálise).



Fonte: Dados da pesquisa.

A presença de F-127 na razão molar QTS/MTX 1,25 ocasionou uma desestabilização dos NCEs; com aumento do diâmetro, do IPD e uma redução acentuada do potencial zeta. Esses fatores em conjunto tornam o sistema 1,25 com F-127 inviável para aplicação biológica. Os nanocomplexos QTS/MTX 1,0 e 0,75 mantiveram os parâmetros semelhantes aos sistemas na ausência de F-127.

4.2.2 Capacidade de incorporação do MTX aos NCEs

A Tabela 8 mostra a carga de fármaco e a eficiência de encapsulamento dos NCE 1,0 e 0,75. Ocorreu a diminuição dos teores de fármaco com o aumento da concentração de F-127 adicionado, sendo mais evidenciado na razão 0,75. Essa redução pode ser explicada pela possível interação do MTX com o F-127, comportamento semelhante já foi relatado por Pawar *et al.* (2018) com ácido fólico e o flavonoide natural fisetina, ambos com características hidrofóbicas. Durante o processo de diálise, o fármaco que se encontra aderido na extremidade

da nanopartícula pode protonar o grupo carboxilato devido à presença de íon H^+ do meio aquoso, fazendo com que retorne a sua forma ácida. Esse processo aumenta a hidrofobicidade do MTX, melhorando a sua interação com a parte hidrofóbica do surfactante, o que facilita a saída do fármaco da nanopartícula durante o processo de diálise.

Tabela 8 – Eficiência do encapsulamento e carga de fármaco.

Razão Molar	%PF-127	%CF	%EE
1	-	55,6 ± 3,2	76,1 ± 4,4
	0,05	27,0 ± 1,0	59,5 ± 2,2
	0,075	21,8 ± 1,5	57,4 ± 4,0
	0,1	17,5 ± 3,2	53,4 ± 6,2
0,75	-	62,1 ± 3,5	79,2 ± 4,5
	0,05	35,3 ± 0,5	67,0 ± 0,9
	0,075	28,4 ± 1,1	62,9 ± 2,5
	0,1	29,4 ± 0,4	74,3 ± 1,0

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de %EE dos NCEs são superiores aos valores obtidos por nanopartículas de quitosana e metotrexato sintetizadas *via* gelificação ionotrópica (%EE = 32,3 ± 1,2 a 50,3 ± 2,4) (Ekinci; Koksall-Karayildirim; Ilem-Ozdemir, 2023), copolímeros de quitosana com ácido itacônico e haleto de alquila amônio quaternário de metacrilato de dimetilaminoetil (%EE = 68) (Mahmoodzadeh; Jannat; Ghorbani, 2019) e nanocápsulas de quitosana modificadas por ácido 57amosís e ácido oleico (%EE = 62,25 – 53,61) (Nazari *et al.*, 2023).

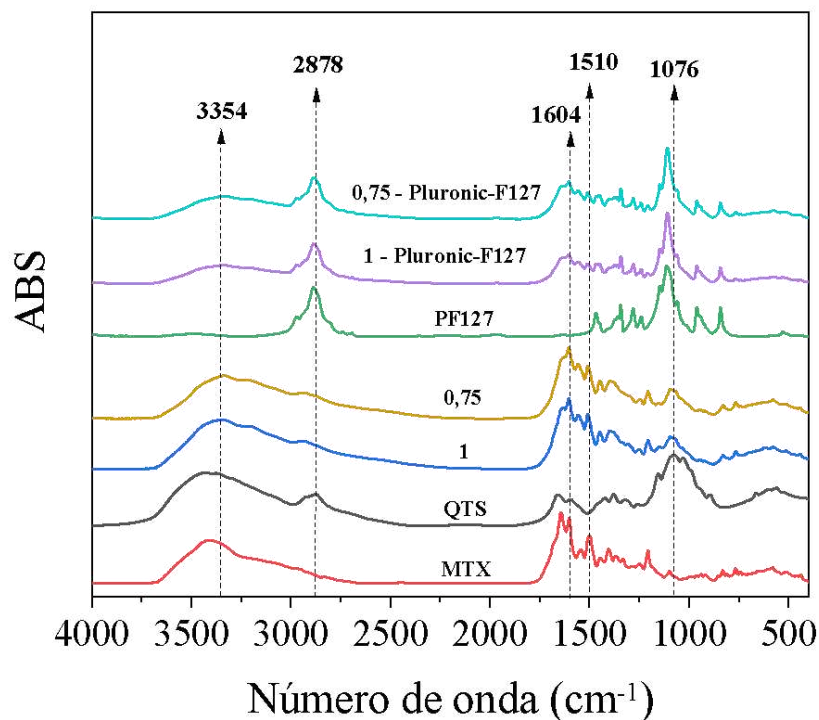
Com base nos resultados obtidos, foram selecionadas quatro formulações para continuidade das caracterizações. Os NCEs nas razões molares QTS/MTX 1 e 0,75 foram preparadas na ausência e na presença de F-127 na concentração intermediária de 0,075 %m/v, pois apresenta menor IPD entre as concentrações analisadas.

4.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram caracterizadas por FTIR para verificar a presença dos grupos químicos dos materiais precursores nos NCEs produzidos, mostrados na Figura 9. As bandas características para o MTX são em 3354 cm^{-1} que corresponde ao estiramento O-H ligados a

carbonila de ácidos estendendo-se a grupos sobrepostos com estiramento O-H da água proveniente de umidade da amostra, em $1642 - 1604 \text{ cm}^{-1}$ encontra-se a banda atribuída ao estiramento C=O (-C=O ácido carboxílico e a C=O de amida. A banda C=O é dividida em um dubleto nessa região. As bandas correspondentes ao estiramento N-H da amida aparecem na região de $1542 - 1503 \text{ cm}^{-1}$, parcialmente sobreposta com o alongamento aromático -C=C (Bajas *et al.*, 2021). Algumas bandas características para a QTS são sobrepostas às do MTX devido à presença dos grupos amina e amida em ambas as estruturas. Entretanto, a banda na região de 1076 cm^{-1} indica um estiramento C-O-C referindo-se as ligações β -glicosídicas (1 \rightarrow 4) do polissacarídeo (Medeiros; Ferreira; Cavalheiro, 2023). A presença do F-127 pode ser observada pela banda bem evidenciada na região 2878 cm^{-1} referente ao estiramento C-H do grupo CH_3 (Shafiq *et al.*, 2022), confirmando a presença de QTS, MTX e F-127 nos NCEs.

Figura 9 – FTIR dos NCEs e materiais precursores .



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

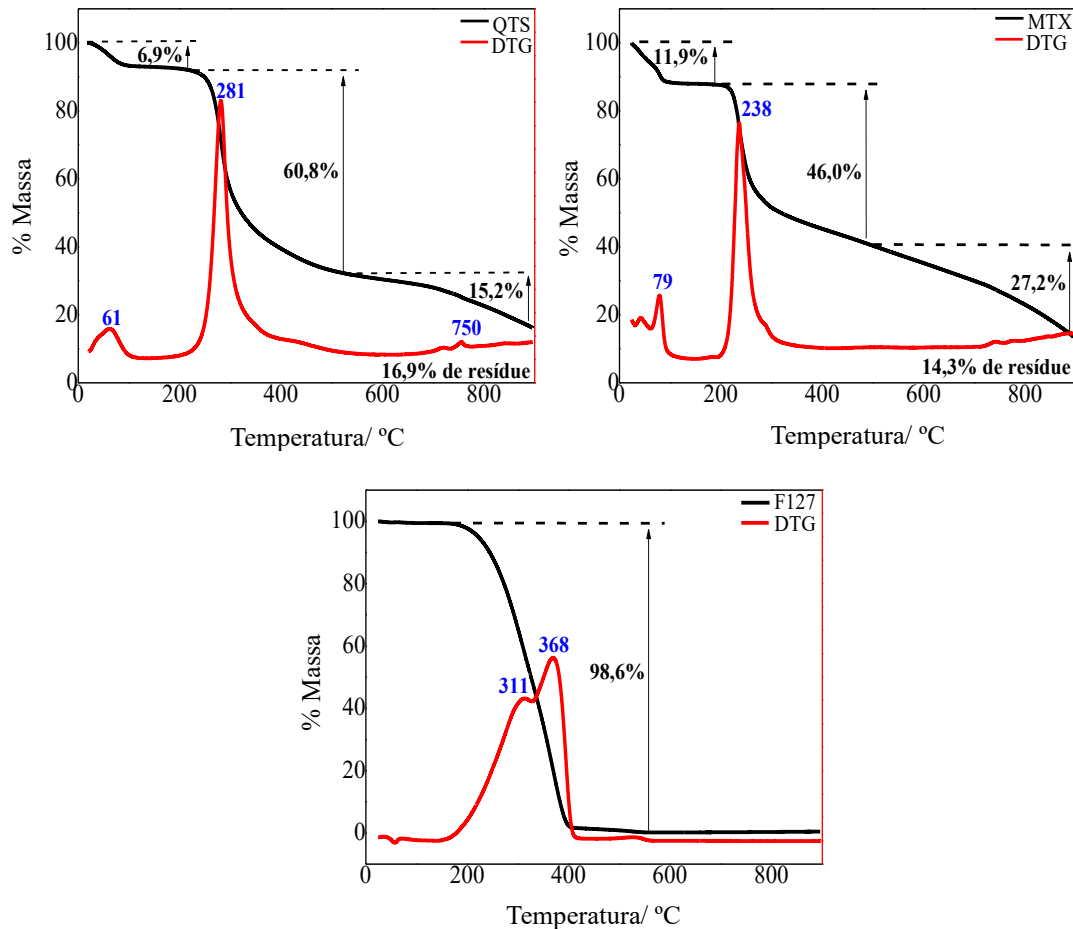
A análise de TGA foi realizada para as amostras de QTS, MTX, F-127 e NCEs (Figuras 10 e 11). Para o termograma da QTS é possível observar três eventos de perda de massa. O primeiro evento com redução de 6,9 % m/m ocorre a $61 \text{ }^\circ\text{C}$ decorrente da evaporação de moléculas de água. Como esse evento ocorre em uma temperatura abaixo de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ pode-

se inferir que as moléculas de água estão adsorvidas a estrutura química da QTS. O segundo evento com perda de 60,5 % m/m ocorre a temperatura de 281 °C e corresponde a decomposição da cadeia polimérica. Ocorre um pequeno evento de perda de 15,1 % m/m próximo a 750 °C proveniente da pirólise do material carbonizado. Uma massa residual de 16,9 % m/m foi observada, evidenciando que a degradação da QTS não foi completa até a temperatura de 900 °C. Esses eventos também foram relatados por Pereira *et al.* (2013).

O termograma do MTX apresenta evento de perda massa de 11,9 % m/m em 79 °C decorrente da evaporação da água, outro de 46,0 %m/m em 238 °C referente a fusão seguida de perda cumulativa de massa (27,2 %m/m) devido a decomposição do fármaco carbonizado (De Oliveira *et al.*, 2013). Não foi possível verificar a degradação completa do MTX no intervalo de temperatura analisado, obtendo uma massa residual de 14,3 %m/m.

O F-127 apresenta um evento de decomposição com acentuada perda de massa que se iniciou na temperatura de 200 °C e foi concluído em 400 °C devido a reação de pirólise (Shafiq *et al.*, 2022). Não foi observada a presença de resíduo, resultado de uma decomposição completa e da natureza não iônica do surfactante.

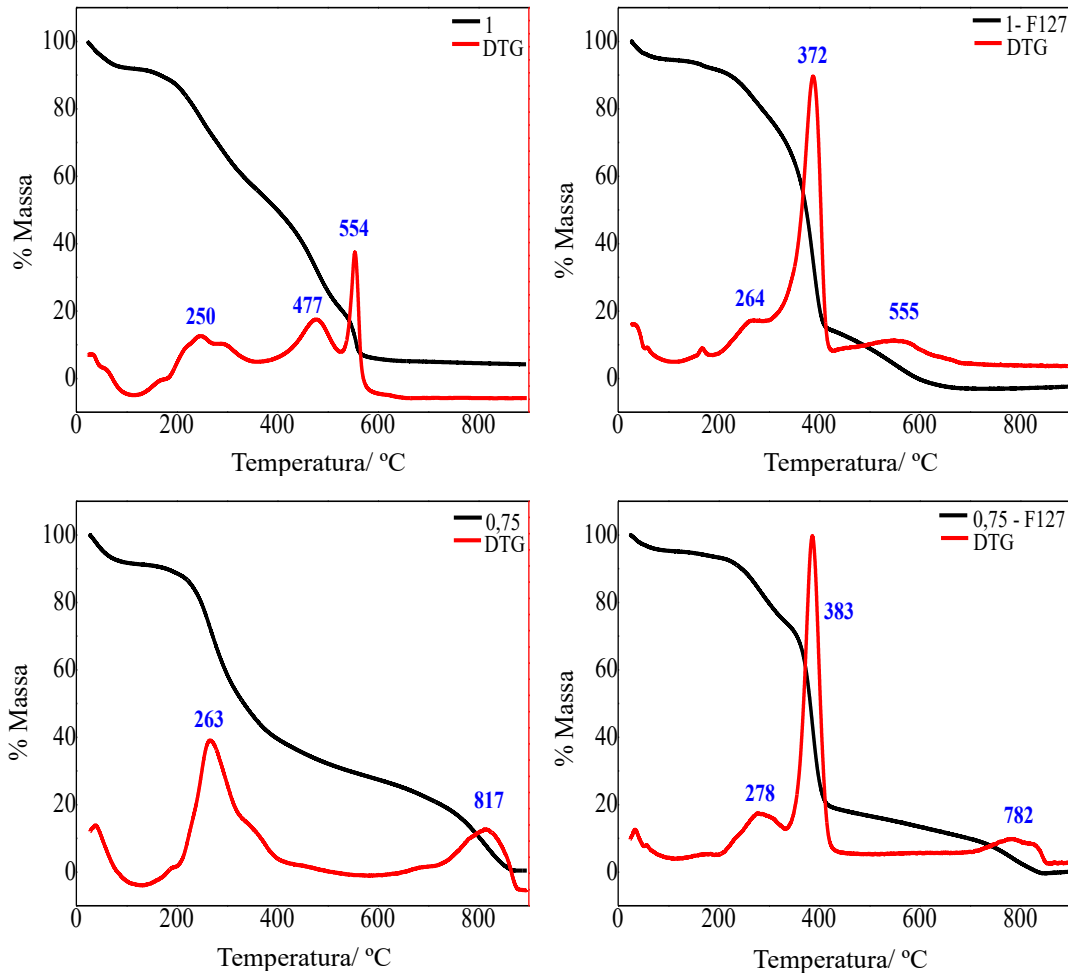
Figura 10 – Termograma dos materiais precursoros .



Fonte: Dados da pesquisa.

Os NCEs sintetizados na ausência de F-127 fornecem resultados que não representam a sobreposição dos eventos de decomposição observados nos termogramas dos materiais precursoros. Dessa forma, foi possível inferir que os eventos expressam as modificações estruturas promovidas pelas novas interações iônicas formadas, devido entrelaçamento e conformação das cadeias de QTS na presença de MTX. Os termogramas dos NCEs produzidos na presença de F-127 fornecem resultados que evidenciam a contribuição dele no evento de maior perda massa das amostras, pois ocorre na região característica da sua decomposição como mencionado anteriormente. Outra observação é que a presença de F-127 ocasiona um aumento da estabilidade térmica para os NCEs, ou seja, a sua interação favorece o melhoramento das propriedades térmicas dos materiais.

Figura 11 – Termogramas dos NCEs na presença e ausência de F-127.



Fonte: Dados da pesquisa.

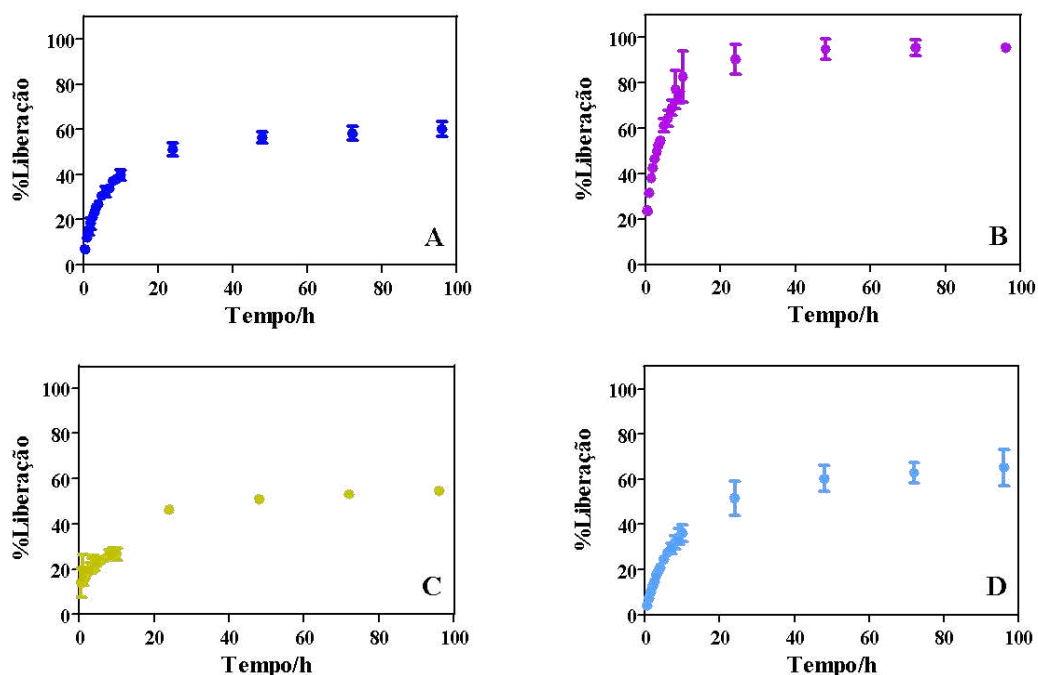
4.2.5 Ensaios de liberação *in vitro*

Com o intuito de avaliar os NCEs como veículo para a liberação do MTX, foram realizados ensaios de liberação *in vitro* em meio aquoso com tampão fosfato pH 5,0 (Figura 12). É possível observar uma rápida liberação inicial em todos os sistemas, seguida de uma liberação controlada. Essa rápida liberação pode ser explicada pela presença de fármaco adsorvido na superfície do NCE, ficando mais disponível para solvatação em meio aquoso. A liberação controlada deve-se ao relaxamento gradual das interações eletrostáticas promovidas pela diminuição da concentração de MTX na matriz polimérica, ocasionado pelo processo de difusão. A presença de F-127 proporciona um maior percentual de liberação do fármaco como mencionado no tópico 4.2.2.

A razão molar 1 apresenta maior percentual de liberação, isso pode ser explicado

pela diminuição da atração eletrostática promovida pela menor concentração de fármaco no sistema. As cadeias ficariam mais livres o que propicia uma maior facilidade para a liberação do fármaco no NCE. Diferentemente do que ocorre na razão 0,75, com maior teor de MTX, observa-se um perfil de liberação mais lento, enfatizando que a presença de MTX reflete em uma maior atração entre as cadeias, favorecendo a redução da velocidade de liberação do fármaco do NCE.

Figura 12 – Perfil de liberação *in vitro* do MTX, onde QTS/MTX 1 (A); QTS/MTX 1 – 0,075% F-127(B); QTS/MTX 0,75 (C) e QTS/MTX 0,75 – 0,075% F-127(D).



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.6 Cinética de liberação do MTX

O mecanismo de liberação do MTX dos NCEs foi determinado ajustando os dados de liberação para seis modelos cinéticos. A Tabela 9 mostra os valores dos coeficientes de correlação (R^2). Foi observado que todas as razões molares apresentaram o modelo de Zeng como o mais adequado para o perfil de liberação, pois exibiu o maior valor de coeficiente de correlação. Esse modelo considera dois perfis de comportamento para o fármaco: (1) o fármaco molecularmente disperso no sistema e (2) moléculas do fármaco que participam da formação de agregados, cristais, complexos com excipiente e/ou absorvidos. Este último é coletivamente referido como fármaco associado, enquanto o primeiro é referido como moléculas do fármaco dissociadas prontas para liberação. Valores de taxa de difusão do fármaco (k_s), taxa de

associação do fármaco (k_{on}) e taxa de dissociação do fármaco (k_{off}) oferecem informações sobre o comportamento das matrizes dos NCE. Em todos os sistemas, os valores de k_s foram muito maiores que os de k_{on} e k_{off} que, segundo a literatura, determina que o fármaco sofre uma liberação rápida via difusão devido a moléculas livres dispersas no sistema, seguida de uma liberação lenta de moléculas de fármaco inicialmente ligadas que são rompidas através do processo de dissociação (Zeng; Na; Wu, 2011).

Tabela 9 – Modelos cinéticos para o perfil da liberação de MTX nas NCEs.

Razão Molar	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer – Peppas	Zeng
	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²
1	0,6271	0,2502	0,8489	0,5198	0,9132	0,9605
1 – 0,075% PF127	0,4513	0,1403	0,7262	0,4431	0,8433	0,9912
0,75	0,7194	0,2760	0,9140	0,6609	0,8747	0,9486
0,75 – 0,075% PF127	0,7323	0,3441	0,9095	0,5777	0,9175	0,9927

Fonte: Dados da pesquisa.

Outro parâmetro que pode ser obtido é a diferença de energia livre entre o livre e o ligado, através da Equação 5.

$$\Delta G = -k_B T \ln \left(\frac{k_{on}}{k_{off}} \right) \quad (5)$$

onde ΔG é a variação de energia livre entre os estados livre e ligado do fármaco, k_B é o valor da constante de Boltzmann ($1,380649 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (assumida como 310 K). A Tabela 10 mostra os valores de k_s , k_{on} , k_{off} e ΔG .

Tabela 10 – Valores de k_s , k_{on} , k_{off} e ΔG .

Razão Molar	k_s (h^{-1})	k_{on} (h^{-1})	k_{off} (h^{-1})	ΔG (J)
1	0,16070	0,00200	0,00198	$-4,32 \times 10^{-23}$
1 – 0,075% PF127	2,28883	0,33443	0,12207	$-4,31 \times 10^{-21}$
0,75	0,15910	0,00321	0,00248	$-1,10 \times 10^{-21}$
0,75 – 0,075% PF127	0,25033	0,02252	0,00947	$-3,71 \times 10^{-21}$

Fonte: Dados da pesquisa.

Foi possível observar que o F-127 promove um aumento do valor de ΔG que resulta em uma liberação rápida, devido uma maior presença de fármaco disperso no sistema. O menor valor de ΔG observado nos NCE na ausência de F-127 demonstra uma maior associação fármaco-carreador, reduzindo a liberação rápida, devido a menor presença de fármaco livre, o que melhora no controle da liberação do fármaco.

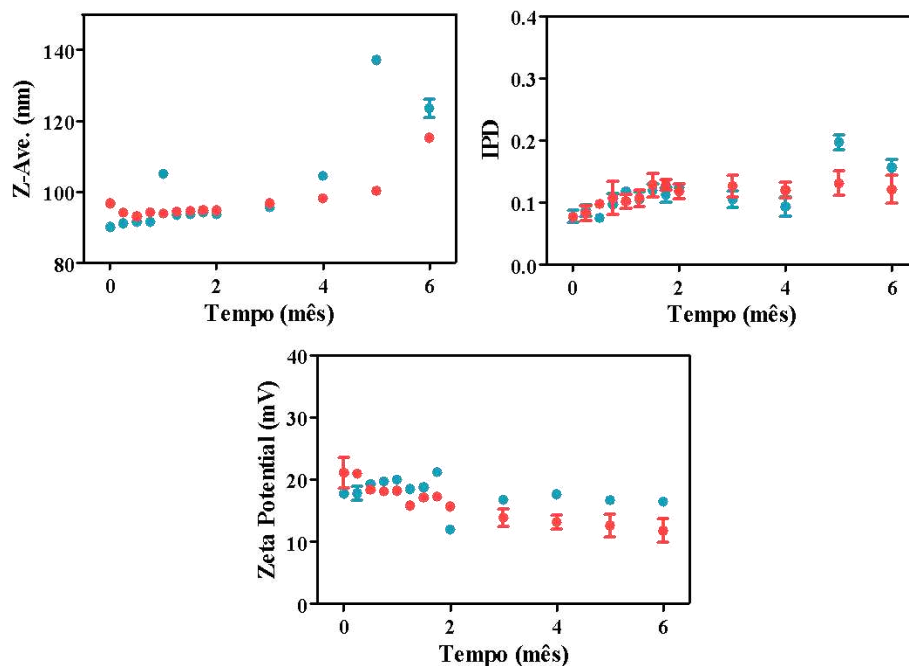
4.2.7 Estudos de estabilidade

A força de hidratação é a força universal que atua entre superfícies bem solvatadas na água e equilibra outras atrações de superfície (por exemplo, interações de van der Waals) na faixa nanométrica (Israelachvili; Wennerstrom, 1996). Desta forma, torna-se necessário verificar o comportamento dos NCEs em solução. Para essa finalidade, foi realizado um estudo por 6 meses da solução estoque de nanocarreadores a temperatura de 4°C (temperatura de armazenamento adequada do MTX, segundo as recomendações do fabricante). A razão molar QTS/MTX 0,75 apresentou pouca estabilidade em solução (cerca de 3 semanas) podendo ser observada de maneira macroscópica a precipitação. Uma explicação plausível seria a presença de maior concentração aniônica promovida pelo aumento percentual do MTX na nanoestrutura. É reportado na literatura que a alta concentração de sais altera a estabilidade coloidal de suspensões, o que ocasiona macroscopicamente a precipitação (Chen *et al.*, 2016). A partir desse resultado foi verificado que a razão molar 0,75 não estaria dentro dos parâmetros ideais para realização de estudos *in vivo*.

Os NCEs de razão molar 1 presença e ausência de F-127(0,075%*m/v*) foram 64amosíssi e os resultados estão apresentados na Figura 13. Ambos os sistemas mostraram raios hidrodinâmicos consistentes ao longo do tempo, apresentando uma pequena variação no 5º e 6º mês, uma confirmação adicional de sua estabilidade em solução aquosa. Esses resultados são

melhores comparados aos valores observados por Coutinho *et al.* (2020) com nanopartículas de fucoidana/quitosana carregadas com metotrexato, que após o 5º mês apresentou uma variação expressiva de tamanho (300 nm – 1º mês; 1100 nm – 6º mês). Os IPDs de ambas as amostras mantiveram valores inferiores a 0,3 durante todo o período do estudo, evidenciando a boa homogeneidade dos dois sistemas. O potencial zeta apresentou um decréscimo de valor em módulo sugerindo uma pequena modificação na superfície do material, devido a uma possível reorganização dos componentes na nanoestrutura, ficando um pouco mais aparente na amostra sintetizada na presença de F-127. Essa redução da carga superficial também foi relatada por Choi *et al.* (2010), sugerindo uma blindagem eficaz dos NCEs.

Figura 13 – Estabilidade da solução estoque dos nanocomplexos QTS/MTX 1 (●) e QTS/MTX 1 – F-127(0,075%)(●).



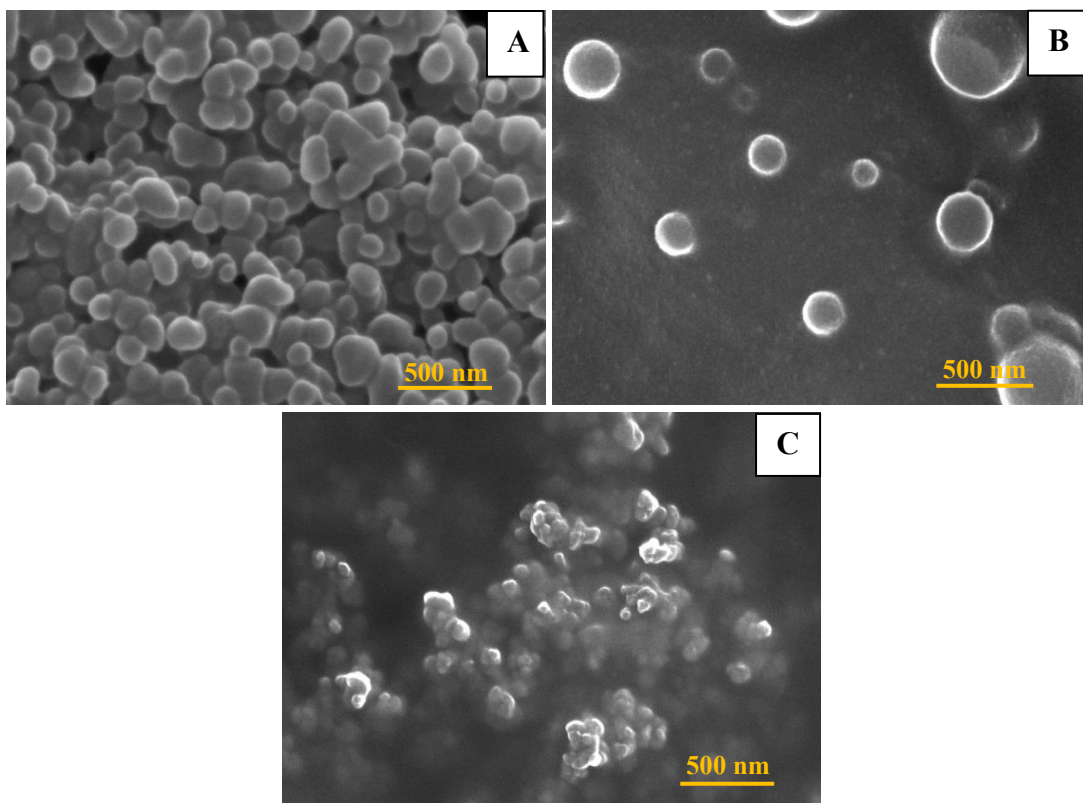
Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A característica morfológica dos NCEs foi analisada por MEV (Figura 14). As imagens mostram que os NCEs têm uma forma esférica e seus tamanhos médios relativos são, respectivamente: $105,3 \pm 16,8$ nm para QTS/MTX 1 (Figura 14^a) e $184,8 \pm 25,7$ nm QTS/MTX 1 – F-127(0,075%) (Figura 13B). Para os nanocarreadores sintetizados na ausência de F-127 os valores de tamanho foram semelhantes aos observados por DLS. Os NCEs contendo F-127

apresentaram significativo aumento do diâmetro, porém é notável que ele apresenta partículas com boa dispersão sem agregação, uma confirmação da blindagem promovida pela adsorção do F-127 como relatado na literatura (Abou El Ela *et al.*, 2021). Esse fato não pode ser observado para os NCEs sem F-127, pois não existe um componente que promova essa barreira. A imagem da razão QTS/MTX 0,75 (Figura 14C), ilustra a agregação do material, devido ao alto teor de fármaco, o que explica os dados de estabilidade em solução estoque.

Figura 14 – Análise morfológica das NCEs: em (A) $105,3 \pm 16,8$ nm para QTS/MTX 1, (B) $184,8 \pm 25,7$ nm QTS/MTX 1 – PF-127 e (C) aglomerados QTS/MTX 0,75.



Fonte: Dados da pesquisa.

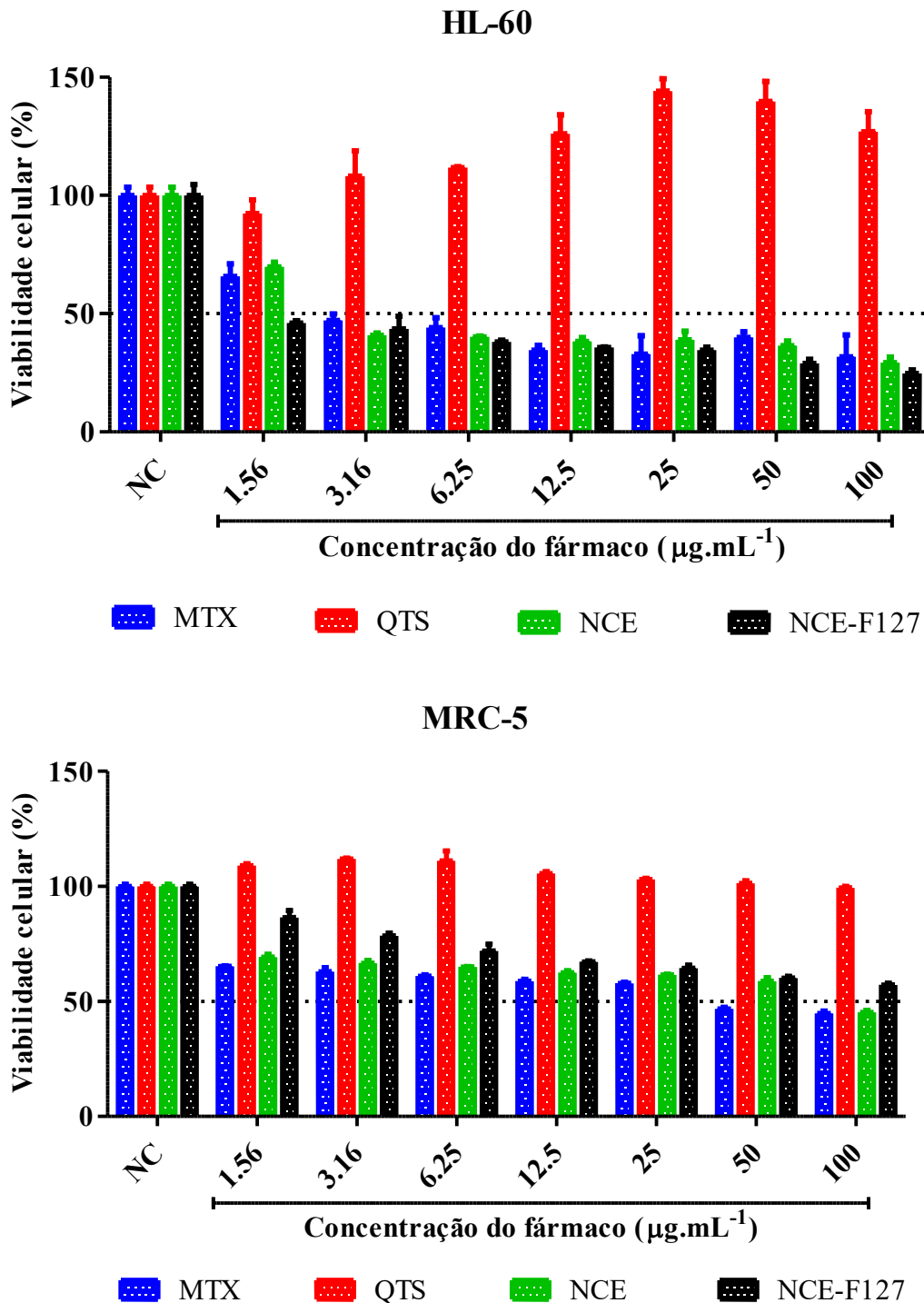
4.3 Citotoxicidade

Os neutrófilos têm atraído atenção significativa como alvos terapêuticos devido ao seu envolvimento dinâmico em uma série de patologias, incluindo doenças inflamatórias e câncer. As células de leucemia promielocítica aguda (HL-60), frequentemente são empregadas como modelo para estudos *in vitro* da função dos neutrófilos, servem como um modelo de estudo de neutrófilos humanos amplamente utilizado em bioensaios e ferramentas de triagem. Essas células têm sido amplamente utilizadas em diversos estudos para elucidar o

comportamento e a função dos neutrófilos (Li *et al.*, 2025).

Foi avaliado o efeito citotóxico dos compostos metotrexato (MTX), quitosana (QTS), NCE e NCE-F127 contra a linha de células leucêmicas HL-60 e a linha de células não tumorais MRC-5 (Figura 15) após 72 horas de tratamento. Os resultados evidenciaram que o MTX, o NCE e o NCE-F127 tiveram um elevado efeito citotóxico na HL-60, com um IC_{50} de 1,94, 1,8 e 1,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 11). Além disso, os dados mostraram que os mesmos compostos apresentaram toxicidade seletiva, uma vez que os compostos apresentaram um IC_{50} mais elevado na linha celular não tumoral MRC-5 do que na linha celular cancerígena HL-60. Além disso, o composto NCE-F127 não levou à redução em 50% da viabilidade celular contra a linhagem celular MRC-5 mesmo na maior concentração avaliada (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), indicando padrões altamente seletivos. O composto QTS não apresentou efeito antileucêmico ou tóxico nas linhagens celulares avaliadas, com IC_{50} maior que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em ambas as linhagens celulares.

Figura 15 – Viabilidade celular das linhas celulares leucêmicas HL-60 e não tumorais MRC-5 após 72 horas. A) As linhas de células HL-60 e B) MRC-5 foram tratadas numa curva de concentração-resposta ($100 - 1,56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos compostos e a viabilidade foi estimada definindo o grupo de controlo negativo (NC) como 100%. As barras representam o desvio padrão da média de 3 experiências independentes.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 11 – Concentração inibitória mediana (IC₅₀).

Células	MTX	QTS	NCE	NCE-F127
HL-60	1.94 (1.3 – 2.89)	< 100	1.8 (1.32 – 2.46)	1.43 (1.23 – 1.71)
MRC-5	26.13 (15.1 – 38.56)	< 100	81.85 (49.91 – 134.2)	< 100

Fonte: Dados da pesquisa.

4.4 Avaliação do efeito anti-inflamatório e antinociceptivo das amostras em zebrafish (*Danio rério*) adulto.

4.4.1 Toxicidade aguda 96 h

As doses 40 µg kg⁻¹; 200 µg kg⁻¹ e 400 mg kg⁻¹ de NCE não foram tóxicas para zebrafish adulto até 96 h de análise (DL₅₀ > 400 µg kg⁻¹) (Tabela 12), pois não houve um quantitativo de morte significativo e nenhuma alteração anatômica aparente nos animais durante este período (p > 0,05).

Tabela 12 – Resultados dos testes de toxicidade aguda do composto NCE.

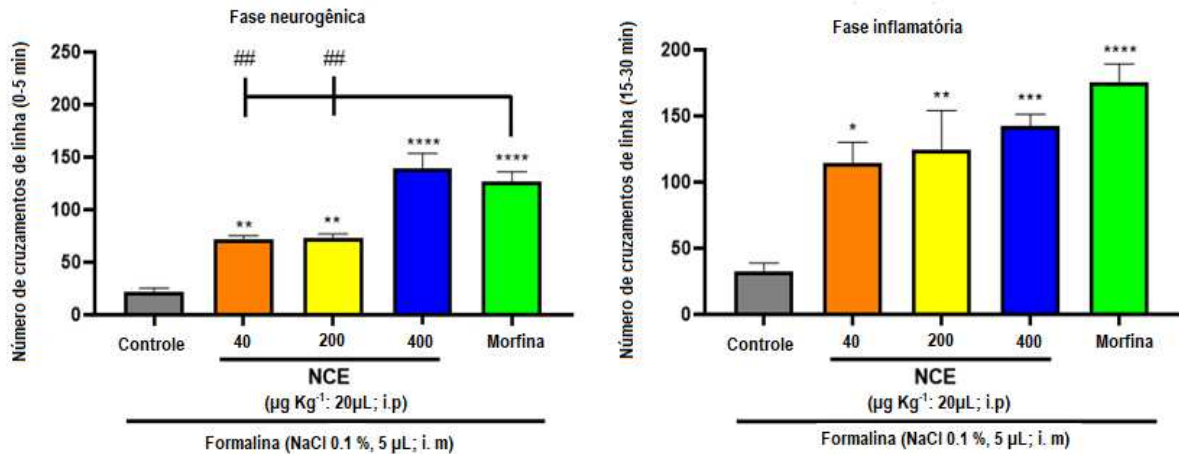
Amostra	Mortalidade				96h
	CN	D1	D2	D3	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹) / IC
NCE	0	0	0	0	> 400

Legenda: CN- Grupo controle negativo; DMSO 3%. D1 – Dose 1 (40 µg kg⁻¹). D2 – Dose 2 (200 µg kg⁻¹). D3 – Dose 3 (400 µg kg⁻¹). DL₅₀-dose letal para matar 50% dos zebrafish adulto; IC – intervalo de confiança.

4.4.2 Comportamento nociceptivo induzido por formalina

O efeito da amostra NCE na nocicepção induzida por formalina foi investigado. Foi observado que a amostra inibiu significativamente a nocicepção em pelo menos uma dose nas duas fases do processo nociceptivo induzido pela formalina, restaurando a locomoção dos animais no teste de campo aberto. Essa reversão ocorreu na dose de 400 µg kg⁻¹ da amostra NCE (fase neurogênica) e nas três doses testadas na fase inflamatória (40; 200 e 400 µg kg⁻¹), visto que, essas doses não apresentaram diferença estatística relacionada a morfina, ou seja, demonstraram resultado similar ao fármaco de referência. Já a morfina, como esperado, inibiu significativamente a nocicepção neurogênica e inflamatória da formalina (****p < 0,0001 vs. Controle) (Figura 16).

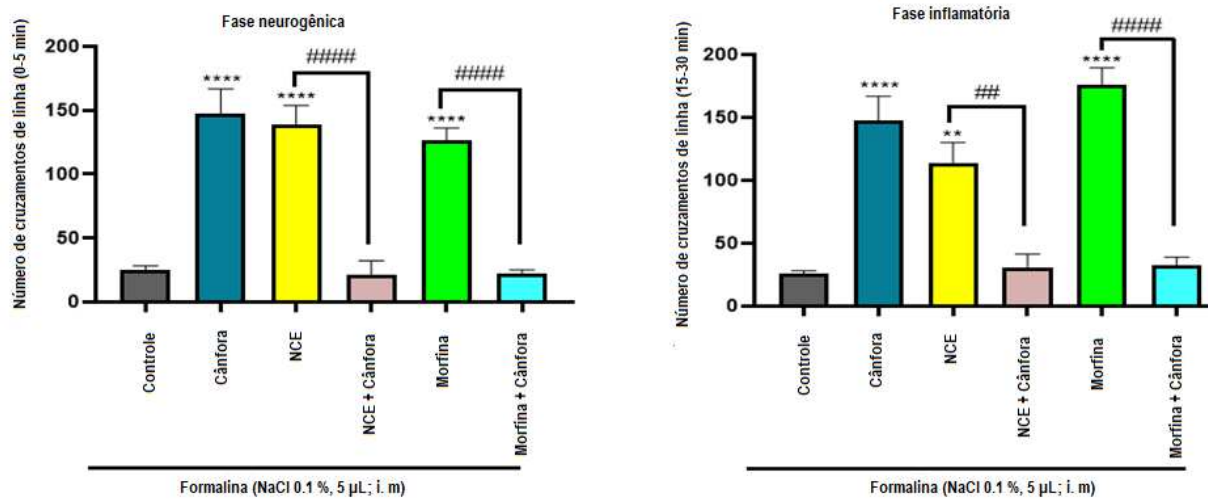
Figura 16 – Efeito da amostra NCE na nocicepção induzida por formalina (0,1%) em zebrafish adulto na fase neurogênica (0 – 5 min) e fase inflamatória (15 – 30 min). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (n = 6/grupo). Controle (Veículo: DMSO a 3%; 20 μ L; v.o.; Morfina: 8 mg kg⁻¹; 20 μ L; v.o.), NCE (40, 200 ou 400 μ g kg⁻¹; 20 μ L; v.o.). *One-way ANOVA* seguido do teste de Tukey. (**p < 0,01; ****p < 0,0001 vs. Controle; ##p < 0,01 vs. Morfina) fase neurogênica. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 vs. Controle) fase inflamatória.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para investigação do mecanismo de ação da amostra NCE via receptor TRPA1, foi realizado o teste de nocicepção aguda com a cânfora (antagonista do canal TRPA1). Como resultado, foi confirmado efeito antinociceptivo para a amostra NCE na dose 400 μ g kg⁻¹ (fase neurogênica) e na dose 40 μ g kg⁻¹ (fase inflamatória) bloqueado pela cânfora na nocicepção induzida por formalina (##p < 0,01; #####p < 0,0001 NCE vs NCE + Cânfora), indicando que o efeito antinociceptivo da amostra NCE ocorreu através do receptor TRPA1 (Figura 17). Nesse ensaio, espera-se que o antagonista bloqueie o canal TRPA1 no qual a amostra está atuando, assim o efeito antinociceptivo previamente observado é interrompido e o peixe retorna a ter sua locomoção reduzida, que reflete a hipernocicepção .

Figura 17 – Efeito da cânfora na atividade antinociceptiva em zebrafish adulto na fase neurogênica (0 – 5 min) e inflamatória (15 – 30 min). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média ($n = 6/\text{grupo}$). Controle: veículo (DMSO a 3 %; 20 μL ; i.p.), NCE (40, 200 ou 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$; 20 μL ; v.o.), Cânfora (30,4 mg kg^{-1} ; 10 μL ; i.p.). *Two-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle; # $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$ NCE vs. NCE + Cânfora).



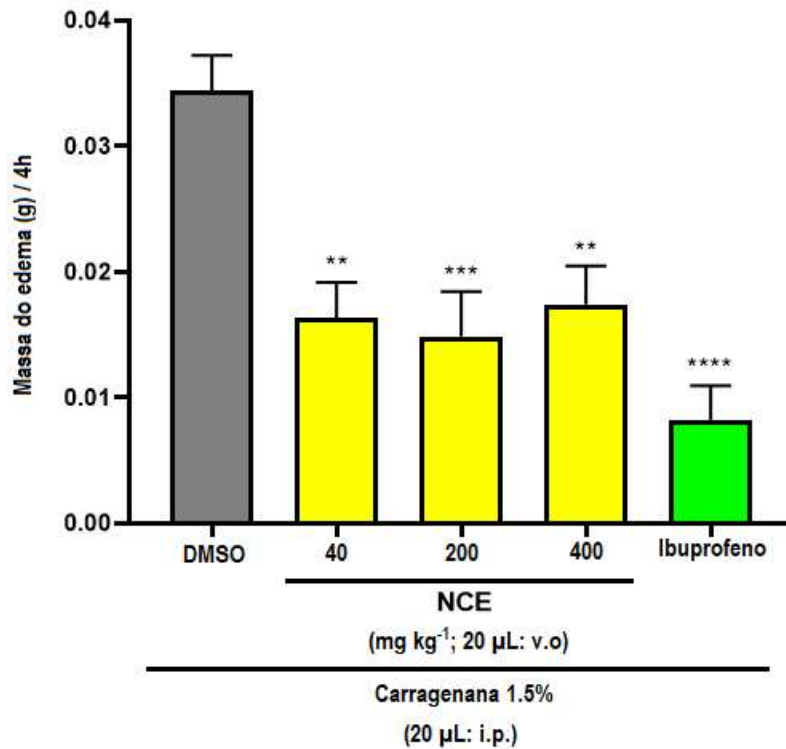
Fonte: Dados da pesquisa.

4.4.3 Edema abdominal induzido por carragenana

O teste de edema abdominal induzido por carragenana foi realizado para averiguar o efeito anti-inflamatório do NCE. Foi possível observar que para a amostra analisada houve redução significativa do edema induzido pela κ -carragenana marcado estatisticamente.

Nas três doses da amostra NCE (Figura 18) é possível observar diferença estatística com o grupo de animais exposto a solução de DMSO 3% que corresponde a solução veículo de preparação das amostras, ou seja, controle negativo do teste. Todavia, foi observado semelhança estatística desejável com o fármaco padrão correspondente ao controle positivo do ensaio (Ibuprofeno) para investigação do efeito anti-inflamatório (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. Control).

Figura 18 – Efeito da amostra NCE no edema abdominal induzido por κ -carragenana 1,5% em zebrafish adulto, analisado durante o período da quarta hora de teste. Cada coluna representa uma média \pm erros padrão da média (n= 6/peixe). Controle (Veículo: DMSO a 3%; 20 μ L; v.o; Ibuprofeno: 20 μ L; v.o.), NCE (40, 200 ou 400 μ g kg^{-1} ; 20 μ L; v.o.). One-way ANOVA, seguida do teste tukey: (**p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. DMSO 3%).



Fonte: Dados da pesquisa.

Essa análise possibilitou a verificação do efeito da amostra NCE frente ao comportamento nociceptivo induzido por formalina e efeito anti-inflamatório induzido por κ -carragenana 1,5%. Identificou-se para a amostra testada o efeito antinociceptivo em pelo menos uma das doses testadas nas duas fases do processo nociceptivo. Com relação ao mecanismo de ação, o NCE na dose de fármaco de 400 μ g kg^{-1} (fase neurogênica) e na dose de 40 μ g kg^{-1} (fase inflamatória) apresentou seu efeito prevenido quando comparada com o antagonista do canal TRPA1.

Vários modelos pré-clínicos de avaliação do comportamento neurológico e neuropsiquiátrico para testar a farmacodinâmica (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e a farmacocinética de novos medicamentos foram criados para zebrafish que imitam aqueles estabelecidos para roedores para avaliar, por exemplo, comportamento semelhante à ansiedade (Zon; Peterson, 2005; Mathur; Guo, 2011), assim como, os mecanismos de ação

envolvidos no comportamento nociceptivo (Taylor *et al.* 2017; Stevens *et al.* 2018). Os sistemas nociceptivos centrais e periféricos do zebrafish são semelhantes aos de muitos vertebrados, como camundongos e humanos (Marron *et al.* 2009; González-Núñez *et al.* 2013; Taylor *et al.* 2017). O aumento da atividade locomotora do zebrafish é observado pela ativação térmica e química dos canais TRPA1 envolvidos na modulação da nocicepção (Curtright *et al.* 2015; Stevens *et al.* 2018). Nessa hipótese, portanto, a hiperlocomoção induzida pela ativação do canal TRPA1 no zebrafish pode servir como uma triagem fenotípica para a descoberta de novos fármacos antinociceptivos, visto que, a supressão da natação é uma resposta a estímulos nociceptivos que pode ser revertida com a administração de um analgésico comum a morfina (Taylor *et al.* 2017).

Além da triagem do efeito antinociceptivo, o teste de edema abdominal em zebrafish adulto foi realizado para avaliar o efeito anti-inflamatório do composto NCE. Com os resultados obtidos, observou-se que a amostra reduziu o edema nas três dosagens testadas, indicando haver possível efeito anti-inflamatório durante as quatro horas de análise. De acordo com Chen *et al.* (2017), a inflamação é uma reação do sistema imunológico que pode ser provocada por diversos fatores, como agentes patogênicos, dano aos tecidos e toxinas. É caracterizada por rubor, edema, calor, dor e perda da função do tecido, sinais que resultam em eventos vasculares e ações coordenadas das células do sistema imunológico (Chen *et al.*, 2017; Takeuchi; Akira, 2010). A carragenana aplicada intraperitoneal em zebrafish adulto causa como resposta inflamatória o edema na região abdominal, resultado da regulação positiva de proteínas pró-inflamatórias e do acúmulo de leucócitos edemaciado no local (Charlie-Silva *et al.*, 2022). A modelagem de doenças inflamatórias em larvas ou zebrafish adultos é uma ferramenta promissora para a triagem de novos compostos anti-inflamatórios. Isso ajuda a entender os mecanismos que atuam em condições inflamatórias crônicas, uma vez que o zebrafish possui um conjunto de células inflamatórias, mediadores e receptores semelhantes ao que se encontra em mamíferos, incluindo humanos (Zanandrea *et al.*, 2020).

4.5 Efeito anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo do NCE na artrite induzida por Zymosan em ratos

A inflamação aguda é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, levando ao edema e à infiltração de leucócitos no local inflamatório (Medzithov, 2008). Alguns modelos de artrite animal foram propostos, como a artrite induzida por Zymosan, que é um polissacarídeo da parede celular de leveduras que, por via intra-articular induz sinovite,

infiltrado leucocitário, hipernocicepção e edema (Gegout *et al.*, 1994; Bringel *et al.*, 2020).

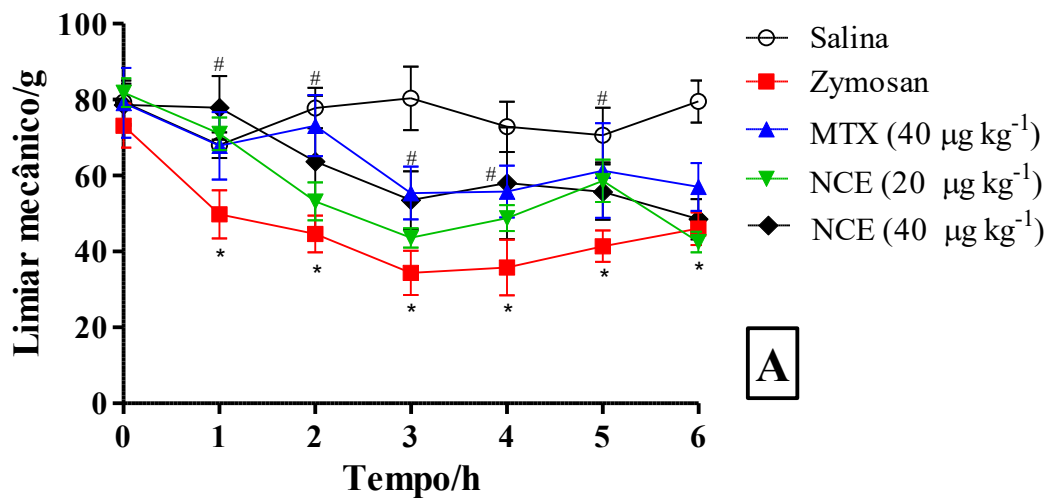
Neste modelo, algumas citocinas pró-inflamatórias são produzidas, como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1, cujos efeitos culminam na sensibilização dos nociceptores periféricos (Verry *et al.*, 2006).

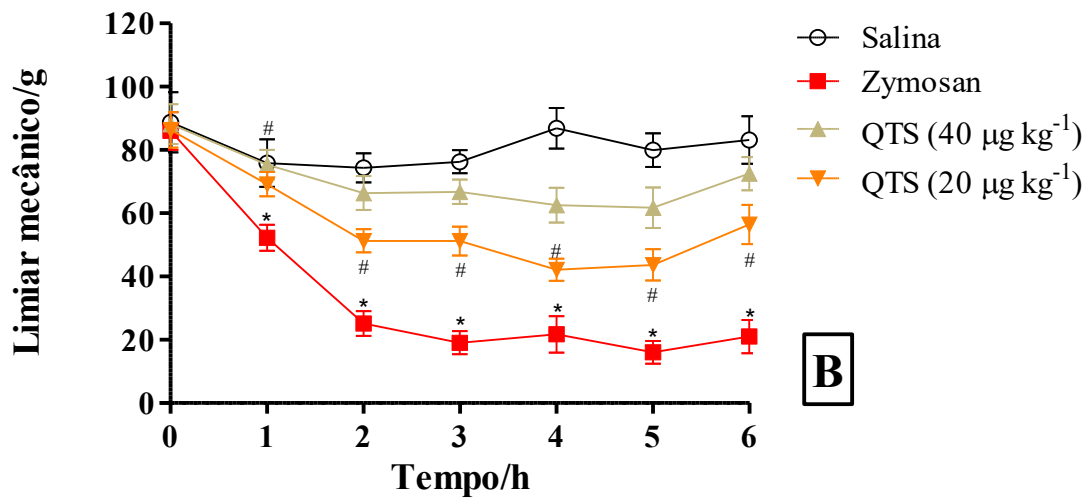
4.5.1 Edema e hipernocicepção articular

O modelo de artrite induzida por zymosan foi realizado para avaliar a hipernocicepção e a resposta inflamatória na fase aguda deste distúrbio. Este modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar vias de sinalização pró-inflamatórias e potencial farmacológico de compostos, particularmente aqueles extraídos de produtos naturais (Guazelli *et al.*, 2018; De Oliveira *et al.*, 2020).

Os dados obtidos demonstram uma redução da hipernocicepção para as amostras de MTX livre e o NCE ambos na concentração 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, apresentando uma redução (%) para amostra de NCE de 36%, 30%, 36%, 38% e 25%, respectivamente, da 1^a à 5^a hora (APÊNDICE C) (Figura 19^a). Para os NCE (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ocorreu a redução da hipernocicepção apenas na 1^a hora.

Figura 19 – NCE e a hipernocicepção articular induzida por zymosan. NCE (40 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.), ou MTX (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por zymosan (500 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$; i.art). O grupo controle recebeu solução salina (0,9% NaCl; 25 μL ; i.art). Média \pm E.P.M., análise de variância de dois fatores, teste de Bonferroni. $P < 0,05$. *vs. Solução salina; # vs. Zymosan.



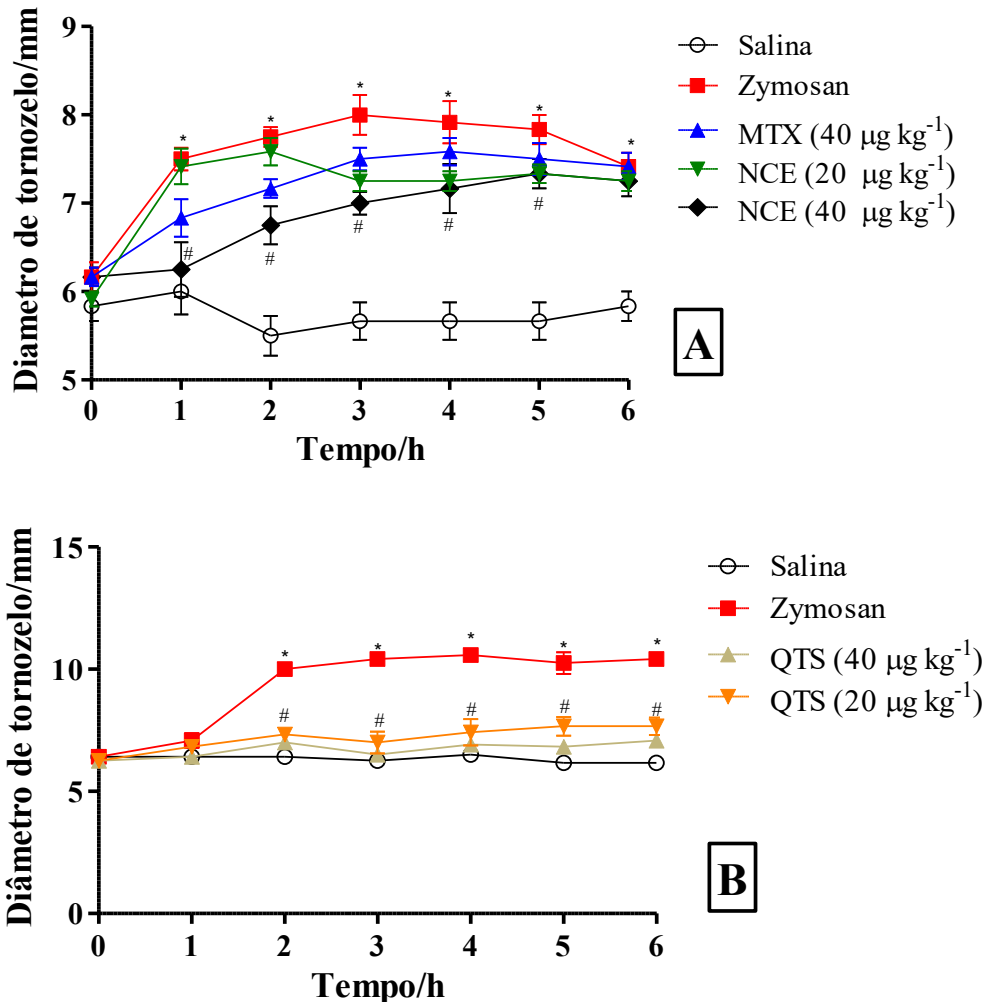


Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados sugerem que os NCEs previnem a sensibilização do nociceptor durante o curso da artrite aguda induzida por Zymosan. Para a quitosana purificada foram obtidos resultados expressos no (APÊNDICE D) (Figura 19B). A quitosana purificada reduziu a hipernocicepção da 1ª à 6 hora de experimento, o resultado sugere que o efeito observado nos NCE pode estar relacionado a presença desse polissacarídeo na matriz do nanocomplexo. Resultados semelhantes foram observados para polissacarídeos extraídos da alga marinha *Gracilaria caudata* (De Oliveira *et al.*, 2020) e da *Agardhiella ramosissima* (Rodrigues *et al.*, 2023).

O edema articular induzido por Zymosan atingiu seu máximo na terceira hora ($8,00 \pm 0,22$ vs. Solução salina: $5,67 \pm 0,21$ mm). O MTX e NCE ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) reduziram o curso temporal do edema da 1ª à 5ª. No entanto, é possível observar que mesmo estando na mesma concentração de fármaco o NCE apresenta uma maior redução do edema, evidenciando o efeito da participação da QTS na estrutura no nanocomplexo. O efeito máximo do MTX e NCE ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) foi alcançado na 1ª hora para o MTX ($6,83 \pm 0,21$ vs. Zymosan: $7,50 \pm 0,13$ mm) e NCE ($6,25 \pm 0,31$ vs. Zymosan: $7,50 \pm 0,13$ mm). O NCE ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) também reduziu o edema na 3ª hora ($7,25 \pm 0,11$ vs. Zymosan: $8,00 \pm 0,22$ mm) e na 4ª ($7,24 \pm 0,11$ vs. Zymosan: $8,00 \pm 0,22$ mm) resultado semelhante ao MTX livre e NCE, porém com metade da concentração de fármaco, apresentando o efeito de máxima redução na 3ª hora (APÊNDICE E) (Figura 20ª).

Figura 20 – NCE e o edema articular induzida por zymosan. NCE (40 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.), ou MTX (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por Zymosan (500 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$; i.art). O grupo controle recebeu solução salina (0,9% NaCl; 25 μL ; i.art). Média \pm E.P.M., análise de variância de dois fatores, teste de Bonferroni. $P < 0,05$. *vs. Solução salina; # vs. Zymosan.



Fonte: Dados da pesquisa.

A formação de edema é um fator importante para o desenvolvimento de dor e a redução da capacidade motora em pacientes artríticos. O aumento da permeabilidade vascular é a principal razão para o inchaço característico do edema, facilitando o recrutamento de leucócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Rodrigues *et al.*, 2023; Sasaki *et al.*, 2021; Cloutier *et al.*, 2012).

Neste modelo, os dados mostram que os NCEs (20, 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) reduziram o edema, a hipernocicepção nas primeiras 5 horas. Para a quitosana purificada (20, 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foi observado a redução do curso temporal do edema da 1ª à 6ª, apresentando maior efeito de redução na concentração de 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na 1ª hora (6,42 \pm 0,08 vs. Zymosan: 7,08 \pm 0,30 mm),

na 2ª hora ($7,00 \pm 0,13$ vs. Zymosan: $10,00 \pm 0,22$ mm), na 3ª hora ($6,50 \pm 0,18$ vs. Zymosan: $10,42 \pm 0,27$ mm), na 4ª hora ($6,92 \pm 0,08$ vs. Zymosan: $10,58 \pm 0,27$ mm), na 5ª hora ($6,83 \pm 0,10$ vs. Zymosan: $10,25 \pm 0,44$ mm) e na 6ª hora ($7,08 \pm 0,08$ vs. Zymosan: $10,42 \pm 0,20$ mm) (APÊNDICE F) (Figura 20B), corroborando com os resultados de hipernocicepção. Com base na literatura, pode-se especular que o NCE exerce atividade antiedematogênica por meio da modulação da desgranulação dos mastócitos, prevenindo a liberação de histamina e serotonina, inibição do infiltrado de células polimorfonucleares (De Oliveira, 2015).

No entanto, distúrbios com influxo intenso de células (por exemplo, AR) apresentam um ciclo vicioso mediado por uma síntese massiva de citocinas pró-inflamatórias, particularmente TNF- α e IL-1 β , que aumentam os eventos patológicos e representam uma causa potencial de dano tecidual. Os resultados mostraram que os níveis aumentados de IL-1 β no fluido sinovial promovidos pela administração de Zymosan foram revertidos pelo tratamento NCE.

4.5.2 Efeito do NCE na migração leucocitária e atividade da mieloperoxidase

O MTX livre ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$), o NCE ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e o NCE ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) reduziram o número total de leucócitos com relação ao Zymosan em 71%, 84% e 88%, respectivamente; e o número de neutrófilos em 59%, 78% e 83%, respectivamente (APÊNDICE G) (Figura 21ª).

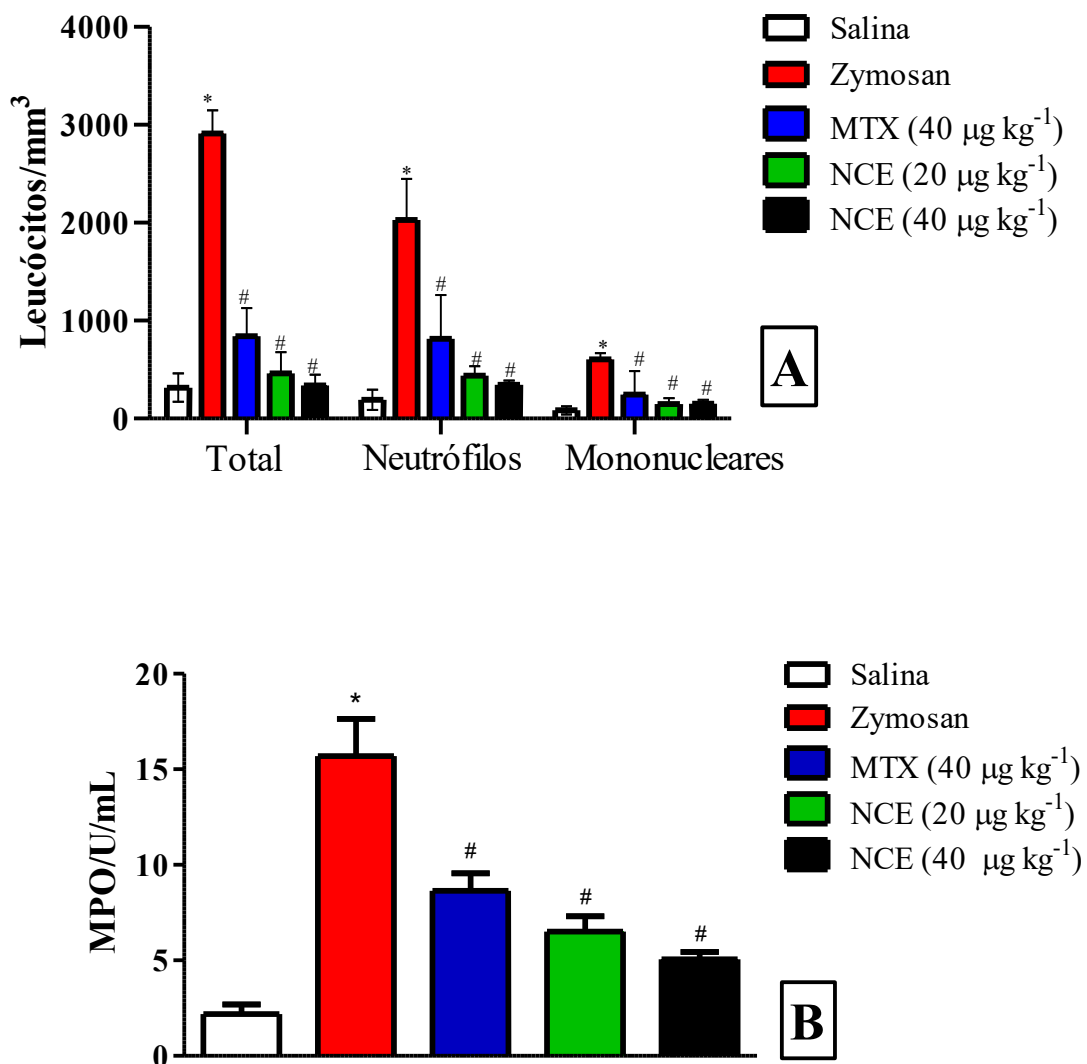
Os NCE atenuaram, em maior proporção, o infiltrado neutrofilico no fluido sinovial com relação ao MTX livre. De acordo com a literatura, a infiltração de neutrófilos está diretamente correlacionada com a intensidade da inflamação sinovial na artrite, bem como com a piora do quadro clínico dos pacientes (Felix *et al.*, 2020). Além disso, foi observada redução de 59%, 75% e 74% de células mononucleares para as amostras de MTX livre ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$), NCE ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e o NCE ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente.

Corroborando esses resultados, os NCE também reduziram a atividade da MPO no fluido sinovial após a administração de zymosan. O NCE $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o NCE $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ também reduziram a atividade da mieloperoxidase (MPO) em 68% ($5,06 \pm 0,38$ vs. Zymosan: $15,70 \pm 1,95$ U/mL) e em 58% ($6,51 \pm 0,38$ vs. Zymosan: $15,70 \pm 1,95$ U/mL), respectivamente. Além disso, o MTX livre reduziu a atividade da MPO em 37% ($9,85 \pm 1,24$ vs. Zymosan: $15,70 \pm 1,95$ U/mL) (Figura 21B).

A MPO é uma enzima catiônica encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos, que participa da formação de ROS a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Aratani, 2018). Essas moléculas podem prejudicar o tecido articular por meio da peroxidação lipídica ou danos aos componentes da matriz extracelular, promovendo consequentemente intensa inflamação e reabsorção óssea (Phull *et al.*, 2018). O desenvolvimento da artrite é diretamente influenciado

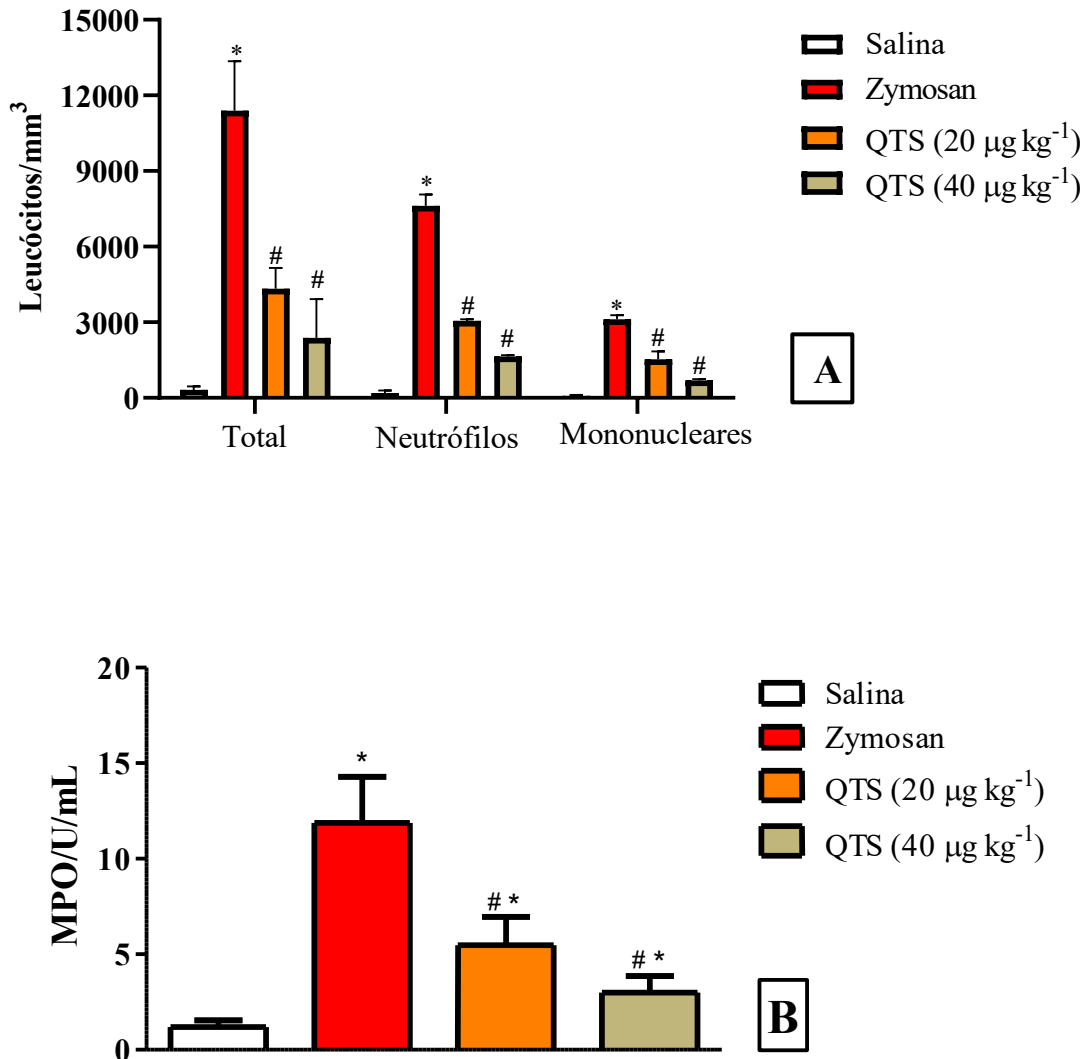
pela ação dos neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório, no qual o aumento da atividade da MPO contribui para a progressão da AR, enquanto sua deficiência em atenua a gravidade da doença (Odobasic *et al.*, 2014; Stamp *et al.*, 2012).

Figura 21 – NCE e a migração de leucócitos induzida por Zymosan. NCE (40 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.) ou MTX livre (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por Zymosan (500 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$; i.art.). Após 6 horas, o líquido articular foi coletado para análise total e diferencial de leucócitos (A) e atividade da mieloperoxidase (B). O grupo de controle recebeu solução salina (0,9%; 25 μL ; i.art.). Média \pm E.P.M., análise de variância de dois fatores, teste de Bonferroni. $P < 0,05$. *vs. Solução salina; #vs. Zymosan.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 22 – Efeito da quitosana na migração de leucócitos induzida por Zymosan. Quitosana (40 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; p.o.) foram administrados 30 minutos antes da indução da artrite por Zymosan (500 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$; i.art.). Após 6 horas, o líquido articular foi coletado para análise total e diferenciais totais de leucócitos (A) e atividade da mieloperoxidase (B). O grupo de controle recebeu solução salina (0,9%; 25 μL ; i.art.). Média \pm E.P.M., ANOVA e teste de Bonferroni. $P < 0,05$. *vs. Salina; # vs. Zymosan.



Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 22^a mostra que a quitosana (20 – 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) reduziu o influxo leucocitário em 79% (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 61 % (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A análise diferencial revelou que os neutrófilos foram reduzidos em 60% (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 85% (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$). As células mononucleares foram reduzidas por quitosana em 50 % (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 77% (40 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Um evento significativo de redução da MPO para a QTS pode ser verificado na Figura 22B, com esse resultado pode-se inferir que a redução observada para os NCEs se deve a contribuição da presença desse polissacarídeo na

estrutura, provável efeito sinérgico. Os dados de migração leucocitária para a QTS estão disponíveis no APÊNDICE H.

4.6 Toxicidade aguda em ratos

4.6.1 *Peso corporal e massa relativa dos órgãos*

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que o peso dos órgãos não sofreu uma variação significativa, apesar de haver alterações bioquímicas, ela não foi suficiente para causar retenção de líquidos ou uma alteração mais intensa nos órgãos ao ponto de aumentar as suas massas. Os valores estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 – Massa relativa dos órgãos.

Órgão	QTS	MTX	NCE
Fígado ^a	4,67 ± 0,34	4,08 ± 0,46	4,35 ± 1,45
Rim	0,68 ± 0,15	0,72 ± 0,12	0,79 ± 1,77
Baço	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,05

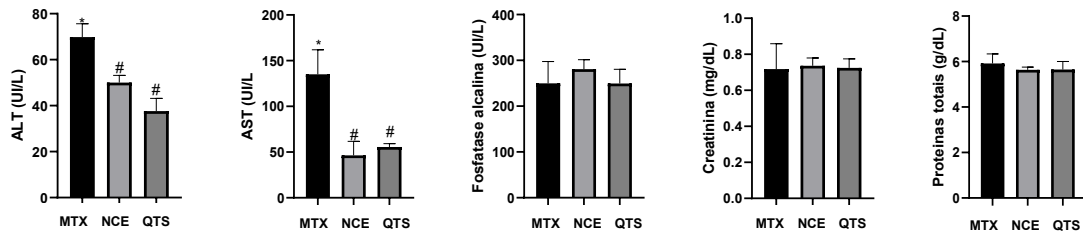
^aMédia ± EPM (n=6); MTX: metotrexato, NCE: metotrexato com nanopartículas de quitosana: QTS: quitosana.

4.6.2 *Avaliação bioquímica*

O metotrexato (2 mg kg⁻¹) induziu aumento na concentração plasmática das enzimas ALT (MTX: 69.80 ± 2.59 vs. QTS: 37.60 ± 2.5 UI/L) e AST (MTX: 135 ± 12 vs. QTS: 55.6 ± 1.6 UI/L). O nanocomplexos eletrolítico (NCE) (2 mg kg⁻¹) induziu menos atividade de ALT (NCE: 50 ± 1.4 vs. MTX: 69,80± 2.59 UI/L) e AST (NCE: 46.4 ± 6.8 vs. MTX: 135 ± 12 UI/L).

O metotrexato livre não induziu alteração significativa nos teores plasmáticos de proteínas totais (MTX: 5,92 ± 0.2 vs. QTS: 5,6 ± 0,2 g/dL), de fosfatase alcalina (MTX: 249,7 ± 21 vs. QTS: 249 ± 21,36) e na concentração de creatinina (MTX: 0,71 ± 0,06 vs. QTS: 0,72 ± 0,03 mg/dL) (Figura 23).

Figura 23 – Efeito do metotrexato livre a nanocomplexado com nanopartículas de quitosana em marcadores hepáticos e renais. Média \pm EPM (n=6). ANOVA e Bonferroni * $p < 0.05$ vs. QTS; # $p < 0.05$ vs. MTX: metotrexato. NCE: Nanocomplexos eletrolíticos. QTS: quitosana.



Fonte: Dados da pesquisa.

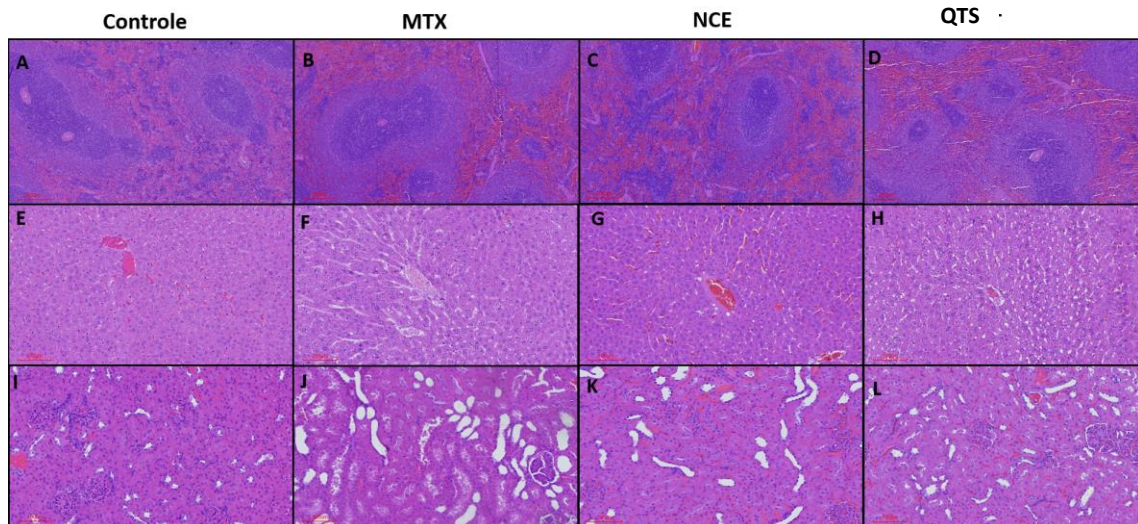
Aspartato aminotransferase (AST/TGO), Alanina aminotransferase (ALT/TGP) são enzimas liberadas das células hepáticas para a corrente sanguínea, refletindo dano hepatocelular (Hu *et al.*, 2020). Os resultados mostram que apesar dos pesos dos órgãos não apresentarem variações significativas, as análises bioquímicas demonstram que o MTX causa maior dano ao tecido hepático com MTX ligado no NCE. Esse resultado é bastante promissor, pois a utilização do fármaco livre no tratamento periódico da AR ou câncer sobrecarregam o fígado e rins. O intuito de utilizar um nanocarreador é reduzir os efeitos colaterais dos fármacos, mantendo ou melhorando a eficácia do tratamento. Neste sentido, o NCE demonstra seu potencial para esse uso.

4.6.3 Avaliação histopatológica dos órgãos

A análise histopatológica dos animais controle revelou estrutura renal preservada, com ausência de hemorragia/necrose, infiltrado inflamatório, cilindros hialinos e vascularização normal. Os animais do grupo controle exibiram baço de aspecto compatível com normalidade para polpa branca e polpa vermelha. Exibiram preservação da arquitetura lobular hepática, espaços sinusoidais, veias, ausência de infiltrado inflamatório, necrose, fibrose ou marcante degeneração gordurosa sem qualquer sinal de toxicidade (Figura 24 A, E, I).

O grupo tratado com o MTX apresentou múltiplos focos de dilatação tubular com presença de cilindros hialinos, acúmulo eosinofílico amorfo intratubular e ectasia vascular e sinusoidal. O MTX apresentou tumefação celular e vacuolização, focos de congestão sinusoidal, porém sem sinais de toxicidade hepática (Figura 24 B, F, J). Para o grupo QTS não apresentou alterações significativas na morfologia do baço, na vasculatura e túbulos renais, ou na morfologia de lóbulos e hepatócitos (Figura 24 D, H, L).

Figura 24 – Perfil histológico de órgãos vitais de animais tratados com metotrexato livre e nanocomplexado com nanopartículas de quitosana. Baço (A-D), Fígado (E-H), Rins (I-L). Coluna 1 (controle); coluna 2 (MTX); coluna 3 (NCE), coluna 4 (QTS). MTX: metotrexato. NCE: nanocomplexos eletrolíticos. QTS: quitosana.



Fonte: Dados da pesquisa.

O grupo tratado com MTX ligado NCE apresentou preservação da morfologia renal, ausência de necrose e infiltrado inflamatório, ausência de ectasia ou acúmulo eosinofílico. Além disso, o NCE não induziu alterações esplênicas ou na arquitetura e vasculatura lobular hepática, nos espaços sinusoidais, na morfologia dos hepáticos, infiltrado inflamatório, necrose, fibrose ou marcante degeneração gordurosa. Observou-se apenas discreta tumefação celular e vacuolização, porém sem sinais de toxicidade hepática (Figura 24 C, G, K).

5 CONCLUSÕES

A síntese dos nanocomplexos eletrolíticos foi bem-sucedida através da complexação de fármacos ionizáveis e polieletrólitos de cargas opostas, promovida pela desprotonação dos ácidos carboxílicos do fármaco metotrexato e protonação da quitosana.

Os nanocomplexos apresentaram boa estabilidade em solução, formando nanopartículas com diâmetros médios (90 – 250 nm), adequado para administração de fármacos para tratamento de câncer e artrite por meio de segmentação passiva via efeito de permeabilidade e retenção aprimorada. Os nanocomplexos apresentam inicialmente uma liberação rápida do fármaco, seguida de uma liberação prolongada. A interação entre o Pluronic® e a matrizes do nanocomplexos influenciou no perfil de liberação.

Os nanocomplexos apresentam efeito antileucêmico, além de toxicidade seletiva na presença de Pluronic®. O estudo mostrou que os nanocomplexos não são tóxicos, exibindo efeito anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo. Também ocasionaram uma redução da migração de leucócitos, o que corrobora com a redução do processo inflamatório.

Foi verificado que os nanocomplexos apresenta menor dano hepático comparado ao MTX livre e a histopatologia dos órgãos evidenciou que a utilização deles ocasionou a preservação morfologia renal e hepática, evidenciando uma possível aplicação como carreador de fármaco devido a redução do efeito colateral mais frequentemente relatado por pacientes que utilizam o MTX no tratamento da artrite reumatoide e câncer.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; GAD, H. A.; EL SAYED, N. S.; RASHED, L. A.; KHATTAB, M. A.; NOOR, A. O.; ZEWAİL, M. Development and Evaluation of Novel Leflunomide SPION Bioemulsomes for the Intra-Articular Treatment of Arthritis. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14(10), p. 2005, 2022.
- ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemother Pharmacol**, [s. l.], v. 71, p. 1115–1130, 2013.
- ABOU EL ELA, A. E. F.; IBRAHIM, M. A.; ALQAHTANI, Y.; ALMOMEN, A.; ALEANIZY, F. S. Fluconazole nanoparticles prepared by antisolvent precipitation technique: Physicochemical, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* ocular evaluation. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 29, p. 576–585, 2021.
- AFRIFA, M. A. O.; AWUAH, S. G. Preclinical, clinical, and commercialization of chitosan in the biomedical space. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 371, p. 124456, 2026.
- AGAFONOV, M.; VOLKOVA, T.; KUMEEV, R.; CHIBUNOVA, E.; TEREKHOVA, I. Impact of pluronic F127 on aqueous solubility and membrane permeability of antirheumatic compounds of different structure and polarity. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 274, p. 770–777, 2019.
- AICH, N.; BOATENG, L. K.; FLORA, J. R. V.; SALEH, N. B. Preparation of non-aggregating aqueous fullerenes in highly saline solutions with a biocompatible non-ionic polymer. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 24, p. 395602, 2013.
- ALMUTAIRI, K.; NOSSENT, J.; PREEN, D.; KEEN, H.; INDERJEETH, C. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. **Rheumatology International**, [s. l.], v. 41, p. 863-877, 2021.
- ALVES, A. W. D. S.; SOUSA, B. L.; MOURA, L. F. W. G.; REBOUÇAS, E. L.; COUTINHO, M. R.; SILVA, A. W.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; BEZERRA, E. H. S.; GUEDES, M. I. F.; FLOREAN, E. O. P. T.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; ROCHA, B. A. M. Codium isthmocladum lectin 1 (CiL-1): Interaction with N-glycans explains antinociceptive and anti-inflammatory activities in adult zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 208, p. 1082-1089, 2022.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. **Arthritis Rheumatology**, [s. l.], v. 46(2), p. 328-346, 2002.
- ANDREANI, T.; CHENG, R.; KHALIL, E.; FERRO, C.; MENEZES, T.; DOS SANTOS, M. R.; PEREIRA, C. M.; SANTOS, H. A. Natural compounds-based nanomedicines for cancer treatment: Future directions and challenges. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], v. 14, p. 2845–2916, 2024.
- ARAFI, E. G.; MAHMOUD, R.; GADELHAK, Y.; GAWAD, O. F. A. Design, preparation, and performance of different adsorbents based on carboxymethyl chitosan/sodium alginate hydrogel beads for selective adsorption of Cadmium (II) and Chromium (III) metal ions.

International Journal of Biological Macromolecules, [s. l.], v. 273(1), p. 132809, 2024.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 640(15), p. 47-52, 2018.

ARELLANO-AGUILAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCÍA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fish Science**, [s. l.], v. 9(4), p. 52–62, 2015.

ARRUEBO, M.; VILABOA, N.; SAEZ-GUTIERREZ, B.; LAMBEA, J.; TRES, A.; VALLADARES, M.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. **Cancers (Basel)**, [s. l.] p. 3(3), p. 3279–3330, 2011.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 5276130, 2016.

AZEEZ, S.; ANUSHA, N.; SATHIYASEELAN, A.; NAGARAJAN, S. Chitosan: a multifaceted biomaterial – exploring physicochemical insights and diverse drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 111, p. 107140, 2025.

BAJAS, D.; VLASE, G.; MATEESCU, M.; GRAD, O. A.; BUNOIU, M.; VLASE, T.; AVRAM, C. Formulation and Characterization of Alginate-Based Membranes for the Potential Transdermal Delivery of Methotrexate. **Polymers**, [s. l.], v. 13, p. 161, 2021.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, [s. l.], v. 357, p. 539-545, 2001.

BERNHEIM, F.; BERNHEIM ML, WILBUR KM. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipides. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v.174(1), p. 257-264, 1948.

BEZERRA, A. J. N.; SILVA, F. C. O.; DA SILVA, A. W.; FERREIRA, M. K. A.; MARINHO, E. M.; MARINHO, M. M.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; RODRIGUES TEIXEIRA, A. M.; MARINHO, E. S.; DE MENEZES, J. E. S. A.; DOS SANTOS, H. S. Antinociceptive effect of triterpene acetyl aleuritolic acid isolated from *Croton zehntneri* in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 534, p. 478-484, 2021.

BILGINAYLAR, K.; AYKAC, A.; SAYINER, S.; ÖZKAYALAR, H.; ŞEHIRLI, A. O. Evaluation of the antiapoptotic and anti-inflammatory properties of chitosan in methotrexate-induced oral mucositis in rats. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 49, 3237–3245, 2022.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, [s. l.], v. 60, p. 618-622, 1982.

BRESINSKY, M.; GOEPFERICH, A. Control of biomedical nanoparticle distribution and drug release *in vivo* by complex particle design strategies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 208, p. 114634, 2025.

BRINGEL, P. H. S. F.; MARQUES, G. F. O.; MARTINS, M. G. Q.; DA SILVA, M. T. L.; NOBRE, C. A. S.; DO NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; CASTRO, R. R., ASSREUY, A. M. S. The Lectin Isolated from the Alga *Hypnea cervicornis* Promotes Antinociception in Rats Subjected to Zymosan-Induced Arthritis: Involvement of cGMP Signalization and Cytokine Expression. **Inflammation**, [s. l.], v. 43(4), p. 1446-1454, 2020.

CAPLAN, A.; FETT, N.; ROSENBACH, M.; WERTH, V. P.; MICHELETTI, R. G. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v.76(2), p. 201-207, 2017.

CARRILLO-CASTILLO, T. D.; CASTRO-CARMONA, J. S.; LUNA-VELASCO, A.; ZARAGOZA-CONTRERAS, E. A. pH-responsive polymer micelles for methotrexate delivery at tumor microenvironments. **E-Polymers**, [s. l.], v. 20, p. 624–635, 2020.

CARVALHO, S. M.; MANSUR, A. A. P.; CAPANEMA, N. S.V.; CARVALHO, I. C.; CHAGAS, P.; DE OLIVEIRA, L. C. A.; MANSUR, H. S. Synthesis and *in vitro* assessment of anticancer hydrogels composed by carboxymethylcellulose-doxorubicin as potential transdermal delivery systems for treatment of skin cancer. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 266, p. 425–440, 2018.

CHARLIE-SILVA, I.; FEITOSA, N. M.; PONTES, L. G.; FERNANDES, B. H.; NÓBREGA, R. H.; GOMES, J. M. M.; PRATA, M. N. L.; FERRARIS, F. K.; MELO, D. C.; CONDE, G.; RODRIGUES, L. F.; ARACATI, M. F.; CORRÊA-JUNIOR, J. D.; MANRIQUE, W. G.; SUPERIO, J.; GARCEZ, A. S.; CONCEIÇÃO, K.; YOSHIMURA, T. M.; NÚÑEZ, S. C.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; FREITAS, A. Z.; RIBEIRO, M. S.; NEDOLUZHKO, A.; LOPES-FERREIRA, M.; BORRA, R. C.; BARCELLOS, L. J. G.; PEREZ, A. C.; MALAFAIA, G.; CUNHA, T. M.; BELO, M. A. A.; GALINDO-VILLEGAS, J. Plasma proteome responses in zebrafish following λ -carrageenan-Induced inflammation are mediated by PMN leukocytes and correlate highly with their human counterparts. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 1019201, 2022.

CHEN, H.; COX, J. R.; OW, H.; SHI, R.; PANAGIOTOPOULOS, A. Z. Hydration Repulsion between Carbohydrate Surfaces Mediated by Temperature and Specific Ions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, p. 28553, 2016.

CHEN, H.; SUN, Y.; XU, X.; YE, Q. Targeted delivery of methotrexate by modified yeast β -glucan nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 284, p. 119183, 2022.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9(6), p. 7204-7218, 2017.

CHEOW, W. S.; HADINOTO, K. Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 367, p. 518–526, 2012.

CHOI, H. K.; SEEGER, J. D.; KUNTZ, K. M. A cost-effectiveness analysis of treatment options for patients with methotrexate-resistant rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, [s. l.], v. 43(10), p. 2316–2327, 2000.

CHOI, W. I.; YOON, K. C.; IM, S.K.; KIM, Y. H.; YUK, S. H.; TAE, G. Remarkably enhanced stability and function of core/shell nanoparticles composed of a lecithin core and a pluronic shell layer by photo-crosslinking the shell layer: *In vitro* and *in vivo* study. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 6, p. 2666–2673, 2010.

CLERKIN, S.; SINGH, K.; WINNING, D.; KRUPA, I.; CREAN, J.; BROUGHAM, D. F.; WYCHOWANIEC, J. K. Thermoresponsive polymers for cell support: poloxamers as a case study of promise and challenge. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 13, p. 9351–9376, 2025.

CLOUTIER, N.; PARÉ, A.; FARNDALE, R. W.; SCHUMACHER, H. R.; NIGROVIC, P. A., LACROIX, S.; BOILARD, E. Platelets can enhance vascular permeability. **Vascular Biology**, [s. l.], v. 120(6), 1334–1343, 2012.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, [s. l.], v. 420, p. 860 – 867, 2002.

COUTINHO, A. J.; LIMA, S. A. C.; AFONSO, C. M. M.; REIS, S. Mucoadhesive and pH responsive fucoidan-chitosan nanoparticles for the oral delivery of methotrexate. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 158, p. 180–188, 2020.

CROFT, A. P.; CAMPOS, J.; JANSEN, K.; TURNER, J. D.; MARSHALL, J.; ATTAR, M.; SAVARY, L.; WEHMEYER, C.; NAYLOR, A. J.; KEMBLE, S.; BEGUM, J.; DÜRHOZ, K.; PERLMAN, H.; BARONE, F.; MCGETTRICK, H. M.; FEARON, D. T.; WEI, K.; RAYCHAUDHURI, S.; KORSUNSKY, I.; BRENNER, M. B.; COLES, M.; SANSOM, S. N.; FILER, A.; BUCKLEY, C. D. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. **Nature**, [s. l.], v. 570, p. 246 – 251, 2019.

CRONSTEIN, B. N.; AUNE, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 16, p. 145-154, 2020.

CURTRIGHT, A.; ROSSER, M.; GOH, S.; KEOWN, B.; WAGNER, E.; SHARIFI, J.; RAIBLE, D. W.; DHAKA, A. Modeling nociception in zebrafish: a way forward for unbiased analgesic discovery. **PloS One**, [s. l.], v.10(1), pe0116766, 2015.

DE OLIVEIRA, F. F. B.; BINGANA, R. D.; MORAIS, P. A. F.; OLIVEIRA, S. R. B. D.; BARBOSA, A. L. R.; CHAVES, L. S.; ALENCAR, P. O. C; SOARES, P. M. G.; SOUZA, M. H. L. P; FREITAS, A. L. P; BARROS, F. C. N.; MEDEIROS, J. V. R.; DAMASCENO, R. O. S. Sulfated polysaccharide from *Gracilaria caudata* reduces hypernociception and inflammatory response during arthritis in rodents. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 161, p. 1061–1069, 2020.

DE OLIVEIRA, F. F. B.; DE ARAÚJO, J. C. B.; PEREIRA, A. F.; BRITO, G. A. C.; GONDIM, D. V.; RIBEIRO, R. A.; DE MENEZES, I. R. A.; VALE, M. L. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum* Wittm fruit pulp fixed

ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 174, p. 452-463, 2015.

DE ROBERTIS, S., BONFERONI, M. C., ELVIRI, L., SANDRI, G., CARAMELLA, C., BETTINI, R. Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 12, p. 441–453, 2015.

DEEPAK, P.; ALAYO, Q. A.; KHATIWADA, A.; LIN, B.; FENSTER, M.; DIMOPOULOS, C.; BADER, G.; WEISSHOF, R.; JACOBS, M.; GUTIERREZ, A.; CIORBA, M. A.; CHRISTOPHI, G. P.; PATEL, A.; HIRTEN, R. P.; COLOMBEL, J.; RUBIN, D. T.; HA, C.; BENIWAL-PATEL, P.; UNGARO, R. C.; SYAL, G.; PEKOW, J.; COHEN, B. L.; YARUR, A. Safety of tofacitinib in a real-world cohort of patients with ulcerative colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 19(8), p. 1592-1601, 2021.

DHANKA, M.; SHETTY, C.; SRIVASTAVA, R. Injectable methotrexate loaded polycaprolactone microspheres: physicochemical characterization, biocompatibility, and hemocompatibility evaluation. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 81, p. 542-550, 2017.

DI MARTINO, A.; OZALTIN, K.; TRUSOVA, M. E.; POSTNIKOV, P. S.; SEDLARİK, V. Multidrug delivery system based on polysaccharide nanocomplexes for controlled delivery of a combination of chemotherapeutics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 50, p. 90-98, 2019.

DONG, B.; SIN CHEOW, W.; HADINOTO, K. Recovery of amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex by salt-induced flocculation to circumvent the need for ultracentrifugation. **Advanced Powder Technology**, [s. l.], v. 31, p. 3102–3109, 2020.

DONG, B.; HADINOTO, K. Carboxymethyl cellulose is a superior polyanion to dextran sulfate in stabilizing and enhancing the solubility of amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 139, p. 500–508, 2019.

DOS SANTOS, A. M.; LISZBINSKI, R. B.; CARVALHO, S. G.; TAVARES Jr., A. G.; CHORILLI, M.; DE JESUS, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. 5-Fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles conjugated with methotrexate for targeted therapy of colorectal cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 287, p. 138342, 2025.

DOS SANTOS, A. T.; DA SILVA, E. L.; MONTENEGRO, R. C., SOUSA, J. S.; DE PAULA, R. C. M. FEITOSA, J. P. A. Stable and Thermo-Responsive Dextran Sulfate-Graft-PNIPAm Amphiphilic Nanoparticles for Potential Target Methotrexate Delivery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 34(9), p. 1262–1272, 2023.

EDDARAI, E.; EL MOUZAHIM, M.; RAGAOU, B.; EL ADDAOUI, S.; BOUSSEN, R.; WARAD, I.; BELLAOUCHOU, A.; ZARROUK, A. Chitosan/kaolinite clay biocomposite as a sustainable and environmentally eco-friendly coating material for slow release NPK fertilizers: Effect on soil nutrients and tomato growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 242(3), p. 125019, 2023.

EKINCI, M.; KOKSAL-KARAYILDIRIM, C.; ILEM-OZDEMIR, D. Radiolabeled

methotrexate loaded chitosan nanoparticles as imaging probe for breast cancer: Biodistribution in tumor-bearing mice. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 80, p. 104146, 2023.

FEITOSA, V. A.; DE ALMEIDA, V. C.; MALHEIROS, B.; DE CASTRO, R. D.; L. R. BARBOSA, S.; CERIZE, N. N. P.; RANGEL-YAGUI, C. O. Polymeric micelles of pluronic F127 reduce hemolytic potential of amphiphilic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 180, p. 177–185, 2019.

FELIX, F. B.; ARAÚJO, J. M. D.; DE SOUZA, E. V.; PINHO, V.; CAMARGO, E. A.; CORRÊA, C. B.; GRESPAN, R. Biochanin A attenuates zymosan-induced arthritis in mice similarly to 17- β estradiol: an alternative to hormone replacement therapy?. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 69, p. 1245 – 1256, 2020.

FERREIRA, S. S.; PASSOS, C. P.; MADUREIRA, P.; VILANOVA, M.; COIMBRA, M. A. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 132, p. 378 – 396, 2015.

FONSECA-GARCÍA, A.; JIMÉNEZ-REGALADO, E. J.; AGUIRRE-LOREDO, R. Y. Preparation of a novel biodegradable packaging film based on corn starch-chitosan and poloxamers. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 251, p. 117009, 2021.

GALLAGHER, R.; COLLINS, S.; TRUJILLO, J.; MCCREDIE, K.; AHEARN, M.; TSAI, S.; METZGAR, R.; AULAKH, G.; TING, R.; RUSCETTI, F.; GALLO, R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 713–733, 1979.

GANGULY, R.; KUMAR, S.; KUNWAR, A.; NATH, S.; SARMA, H. D.; TRIPATHI, A.; VERMA, G.; CHAUDHARI, D. P.; ASWAL, V.K.; MELO, J. S. Structural and therapeutic properties of curcumin solubilized Pluronic F127 micellar solutions and hydrogels. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 314, p. 113591, 2020.

GARCIA, T. R. R.; DE FARIAS, M. A.; FILHO, A. G. S.; FERREIRA, O. P.; MARTINEZ, D. S.T.; PAULA, A. J. On the formation of protein corona on colloidal nanoparticles stabilized by depletant polymers. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 105, p. 110080, 2019.

GASPAR, R.; DUNCAN, R. Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 61(13), p. 1220-1231, 2009.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Science., Oxford**, [s. l.], v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.

GLOBAL CANCER (GLOBOCAN). Cancer today. International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acessado em: 20 de julho de 2025.

GLOBALDATA., Rheumatoid arthritis burden to increase by 10.6% over the next decade in the 8MM [Internet], GlobalData. (2020). <https://www.globaldata.com/rheumatoid-arthritis-burden-increase-10-6-next-decade-8mm/>. (Acessado em: 10 de Abril de 2023).

GONZÁLEZ-NÚÑEZ, V.; JIMENEZ GONZÁLEZ, A.; BARRETO-VALER, K.; RODRÍGUEZ, R. E. *In vivo* regulation of the μ opioid receptor: role of the endogenous opioid agents. **Molecular Medicine**, [s. l.], v. 19(1), p. 7-17, 2013.

GOTTSCHALCK, T. E.; McEWEN, G. N. JR. eds. 2004. **International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook**, 10th ed. Washington, DC: CTFa.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v.126(1), p.131-138, 1982.

GRIFOLL-ROMERO, L., PASCUAL, S., ARAGUNDE, H., BIARNÉS, X., PLANAS, A. Chitin deacetylases: Structures, specificities, and biotech applications. **Polymers**, [s. l.], v. 10(4), p.352, 2018.

GUAZELLI, C. F. S.; STAURENGO-FERRARI, L.; ZARPELON, A. C.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; RUIZ-MIYAZAWA, K. W.; VICENTINI, Fabiana T.M.C.; VIGNOLI, J. A.; CAMILIOS-NETO, D.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W. A. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 102, p. 175-184, 2018.

HAN, W.; LIU, F.; LI, Y.; LIU, G.; LI, H.; XU, Y.; SUN, S. Advances in Natural Polymer-Based Transdermal Drug Delivery Systems for Tumor Therapy. **Small**, [s. l.], v. 19(35), p. 2301670, 2023.

HARRIS ED. **Clinical features of rheumatoid arthritis**. In: Kelley's Textbook of Rheumatology, 7th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p. 1043-1078, 2005.

HERMAN, R. A.; VENG-PEDERSEN, P.; HOFFMAN, J.; KOEHNKE, R.; FURST, D. E. Pharmacokinetics of Low-Dose Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Patients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 78, p. 165-171, 1989.

HOU, H.; LIU, X.; LIU, J.; WANG, Y. Carbohydrate polymer-based nanoparticles with cell membrane camouflage for cancer therapy: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 289, p. 138620, 2025.

HOUTMAN, M., HESSELBERG, E., RÖNNBLÖM, L., KLARESKOG, L., MALMSTRÖM, V., PADYUKOV, L. Haplotype-Specific Expression Analysis of MHC Class II Genes in Healthy Individuals and Rheumatoid Arthritis Patients. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 707217, 2021.

HU, X.; YANG, W.; WANG, Y.; SHAO, Y.; XIONG, S.; LI, X. The prognostic value of De Ritis (AST/ALT) ratio in patients after surgery for urothelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 20(29), p. 1-8, 2020.

ISRAELACHVILI, J.; WENNERSTROM, H. Role of hydration and water structure in

biological and colloidal interactions. **Nature**, [s. l.], v. 379, p. 219–225, 1996.

JACOBS, J. P.; JONES, C. M.; BAILLE, J. P. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5254, p. 168–170, 1970.

JARDIM, G. A. M.; LIMA, D. J. B.; VALENCA, W. O.; LIMA, D. J. B.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; RAFIQUE, J., BRAGA, A. L.; JACOB, C.; DA SILVA JUNIOR, E. N.; DA CRUZ, E. H. G. Synthesis of selenium-quinone hybrid compounds with potential antitumor activity via Rh-catalyzed C–H bond activation and click reactions. **Molecules**, [s. l.], v. 23(1), p. 83, 2017.

JIMENEZ-KAIRUZ, A. F., ALLEMANDI, D. A., MANZO, R. H. The improvement of aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of poly electrolytes. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 269, p. 149–156, 2004.

KAMEL, K. M.; KHALIL, I. A.; RATEB, M. E.; ELGENDY, H.; ELHAWARY, S. Chitosan-Coated Cinnamon/Oregano-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Augment 5-Fluorouracil Cytotoxicity for Colorectal Cancer: Extract Standardization, Nanoparticle Optimization, and Cytotoxicity Evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 65(36), p. 7966-7981, 2017.

KHALILI, L.; DEHGHAN, G.; FEIZI, M. A. H.; SHEIBANI, N.; HAMISHEKAR, H. Development of an albumin decorated lipid-polymer hybrid nanoparticle for simultaneous delivery of methotrexate and conferone to cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 599, p. 120421, 2021.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 103, p. 598-613, 2018.

KOZMINSKI, P.; HALIK, P. K.; CHESORI, R.; GNIAZDOWSKA, E. Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n.10, p. 3483, 2020.

KUEN, C. Y.; MASARUDIN, M. J. Chitosan Nanoparticle-Based System: A New Insight into the Promising Controlled Release System for Lung Cancer Treatment. **Molecules**, v. 27, p. 473, 2022.

KUMAR, S.; GARG, N. K.; JAIN, A.; KHOPADE, A.; PANDEY, P.; SAWANT, K. K. Nanocarriers mediated delivery of methotrexate is instrumental in treating auto-immune diseases and cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 88, p. 104969, 2023.

LEVICK, J. R. Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins. **Arthritis Rheumatoids**, [s. l.], v. 24(12), p.1550-1560, 1981.

LI, C.; HAN, Y.; LUO, X.; QIAN, C.; LI, Y.; SU, H.; DU, G. Immunomodulatory nano-preparations for rheumatoid arthritis. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 30(1), p. 9-19, 2023.

LI, D.; YANG, T.; MA, S.; LYU, X.; HU, C.; YAN, J.; GUO, L.; TAN, J. Quorum sensing: An essential factor in culturing the human promyelocytic leukemia cell line HL-60 and its

neutrophil-related functions. **Methods**, [s. l.], v.241, p. 94–102, 2025.

LI, X.; WANG, H.; ZOU, X.; SU, H.; LI, C. Methotrexate-loaded folic acid of solid-phase synthesis conjugated gold nanoparticles targeted treatment for rheumatoid arthritis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 170, p. 106101, 2022.

LI, Y.; LI, X.; ZHU, L.; LIU, T.; HUANG, L. Chitosan-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 304(2), p. 140923, 2025.

LIAO, Katherine P.; ALFREDSSON, Lars; KARLSON, Elizabeth W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, [s. l.], v. 21(3), p. 279-283, 2009.

LIM, L. M.; HADINOTO, K. Stabilization of chitosan-based polyelectrolyte nanoparticle cargo delivery biomaterials by a multiple ionic cross-linking strategy. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 575, p. 119007, 2020.

LIMA, M. D. C. L.; DE ARAÚJO, J. I. F.; GONÇALVES MOTA, C.; MAGALHÃES, F. E. A.; CAMPOS, A. R.; DA SILVA, P. T.; RODRIGUES, T. H. S.; MATOS, M. G. C.; DE SOUSA, K. C.; DE SOUSA, M. B.; SAKER-SAMPAIO, S.; PEREIRA, A. L.; TEIXEIRA, E. H.; DOS SANTOS, H. S. Antinociceptive Effect of the Essential Oil of *Schinus terebinthifolius* (female) Leaves on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, [s. l.], v. 17(2), p. 112-119, 2020.

LIN, Y.; ANZAGHE, M.; SCHÜLKE, S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. **Cells**, [s. l.], v. 9, p. 880, 2020.

LING, S. F.; OGUNGBENRO, K.; DARWICH, A.S.; ARIFF, A. B. M.; NAIR, N.; BLUETT, J.; MORGAN, A.W.; ISAACS, J.D.; WILSON, A.G.; HYRICH, K.L.; BARTON, A.; PLANT, D. Population Pharmacokinetic Analysis and Simulation of Alternative Dosing Regimens for Biosimilars to Adalimumab and Etanercept in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 16, p. 702, 2024.

LIU, H.; ZHU, X.; WEI, Y.; SONG, C.; WANG, Y. Recent advances in targeted gene silencing and cancer therapy by nanoparticle-based delivery systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 157, p. 114065, 2023.

LIU, X., MA, X.; KUN, E.; GUO, X., YU, Z.; ZHANG, F. Influence of lidocaine forms (salt vs. freebase) on properties of drug-eudragit® L100-55 extrudates prepared by reactive melt extrusion. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 547(1-2), p.291-302, 2018.

LOYD, A. V. JR. Featured excipient: Poloxamer. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, [s. l.], v. 1, p. 190–191, 1997.

MADIHALLI, S.; MASTI, S. P.; EELAGER, M. P.; CHOUGALE, R. B.; ANILKUMAR, B. M.; PRIYADARSHINI, A. N. Methylcellulose/Chitosan bioactive films enriched with *Achyranthes aspera* leaves extract: An innovative approach for sustainable cosmetic face mask applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 303, p. 140611, 2025.

MAGALHÃES, F. E. A.; DE SOUSA, C. Á. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, Â. O.; DE OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. D. S.; CAMPOS, A. R. Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Na Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, [s. l.], v. 14(5), p. 422-429, 2017.

MAHMOODZADEH, F.; JANNAT, B.; GHORBANI, M. Chitosan-based nanomicelle as a novel platform for targeted delivery of methotrexate, **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 126, p. 517 – 524, 2019.

MAJITHIA, V.; GERACI, S. A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 120, p. 936-939, 2007.

MANOHAR, M.; SHETTY, A.; LOBO, C. L.; JAIN, P.; HEBBAR, S.; DHAS, N.; SUTAR, K. P.; SUKEEWANDHI, J.; PERUMALSAMY, H.; BALUSAMY, S. R.; JAMOUS, Y. F.; DUBEY, A.; EL-ZAHABY, S. Emerging trends in chitosan based colloidal drug delivery systems: A translational journey from research to practice. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 360, p. 123604, 2025.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, [s. l.], v. 454, p. 436-444, 2008.

MARRON, F. D. E. Z.; DE VELASCO, E.; LAW, P. Y.; RODRÍGUEZ, R. E. Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. **Zebrafish**, [s. l.], v. 6(3), p. 259-268, 2009.

MARSICO, F.; PAOLILLO, S.; FILARDI, P. P. NSAIDs and cardiovascular risk. **Journal of Cardiovascular Medicine**, [s. l.], v. 18 (suppl 1), p. e40–e43, 2017.

MATHUR, P.; GUO, S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. **Behavioral Brain Research**, [s. l.], v. 219(2), p. 234-239, 2011.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, [s. l.], v. 46(12), p. 6387-6392, 1986.

MEDEIROS, R. S.; FERREIRA, A. P. G.; CAVALHEIRO, E. T. G. Chitosan and naproxen salts: preparation and characterization. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 148, p. 177–190, 2023.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, [s. l.], 454(7203): 428–435, 2008.

MORTEZAEI, K.; SALEHI, E.; MIRTAVOOS-MAHYARI, H.; MOTEVASALI, E.; NAJAFI, M.; FARHOO, D. B.; ROSENGREN, R. J.; SAHEBKAR, A. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: implications for cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234(8), p. 12537–12550, 2019.

MOTIEIA, M.; SEDLAŘÍKA, V.; LUCIA, L. A.; FEIA, H.; MÜNSTER, L. Stabilization of

chitosan-based polyelectrolyte nanoparticle cargo delivery biomaterials by a multiple ionic cross-linking strategy. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 231, p. 115709, 2020.

MOUSTAFINE, R. I.; SITENKOV, A. Y.; BUKHOVETS, A. V.; NASIBULLIN, S. F.; APPELTANS, B.; KABANOVA, T.V.; KHUTORYANSKIY, V. V., VAN DEN MOOTER, G. Indomethacin containing interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit I E PO/S 100 copolymers as a novel drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 524, p. 121–133, 2017.

NASTI, A.; ZAKI, N. M.; DE LEONARDIS, P.; UNGPHAIBOON, S.; SANSONGSAK, P.; RIMOLI, M. G.; TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: Systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 1918–1930, 2009.

NAZARI, M.; SAFAEIJAVAN, R. A.; YAZDI, V.; MONIRI, E. Investigation of the adsorption and release kinetics of the anticancer drug, methotrexate, from chitosan nanocapsules modified by caffeic acid and oleic acid. **Inorganic Chemistry Communications**, [s. l.], v.153, p.110769, 2023.

NEGM, N. A.; HEFNI, H. H. H.; ABD-ELAAL, A. A. A.; BADR, E. A.; ABOU KANA, M. T. H. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 152, p. 681–702, 2020.

NGUYEN, M.H.; YU, H.; KIEW, T.Y.; HADINOTO, K. Cost-effective alternative to nano encapsulation: amorphous curcumin-chitosan nanoparticle complex exhibiting high pay load and supersaturation generation, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 96, p. 1–10, 2015.

OBEIDAT, W. M.; LAHLOUH, I. K. Chitosan Nanoparticles: Approaches to Preparation, Key Properties, Drug Delivery Systems, and Developments in Therapeutic Efficacy. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 26(5), p. 108, 2025.

ODOBASIC, D.; YANG, Y. MULJADI, R. C. M.; O'SULLIVAN, K. M.; KAO, W.; SMITH, M.; MORAND, E. F.; HOLDSWORTH, S. R. Endogenous Myeloperoxidase Is a Mediator of Joint Inflammation and Damage in Experimental Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 66, p. 907-917, 2014.

OECD (2019) Test No. 203: Fish Acute Toxicity Test pp.24.

PARISIL, S.; DITTO, M. C.; GHELLERE, F.; PANARO, S.; PICCIONE, F.; BORRELLI, R.; FUSARO, E. Update on tocilizumab in rheumatoid arthritis: a narrative review. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 16, p. 1470488, 2025.

PAUL, W. E. **Fundamental immunology**, 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business (Chapter 1), 2012.

PAULUK, D.; PADILHA, A. K.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 94, p. 411–417, 2019.

PAWAR, A.; SINGH, S.; RAJALAKSHMI, S.; SHAIKH, K.; BOTHIRAJA, C. Development of fisetin-loaded folate functionalized Pluronic micelles for breast cancer targeting. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], v. 46(1), p. 347-361, 2018.

PEREIRA, F. S.; AGOSTINI, D. L. S.; JOB, A. E.; GONZÁLEZ, E. R. P. Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 114, p. 321–327, 2013.

PEREZ-HERRERO, E.; FERNANDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 93, p. 52–79, 2015.

PETRY, R.; SABOIA, V. M.; FRANQUI, L. S.; HOLANDA, C. A.; GARCIA, T. R. R.; DE FARIAS, M. A.; DE SOUZA FILHO, A. G.; FERREIRA, O. P.; MARTINEZ, D. S. T.; PAULA, A. J. On the formation of protein corona on colloidal nanoparticles stabilized by depletant polymers. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 105, p. 110080, 2019.

PHAM, C.T. Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 3, p. 607- 619, 2011.

PHULL, A.; NASIR, B.; UL HAQ, I.; KIM, S. J. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 281, p. 121-136, 2018.

PONTES-QUERO, G. M.; BENITO-GARZÓN, L.; CANO, J. P.; AGUILAR, M. R.; VÁZQUEZ-LASA, B. Modulation of inflammatory mediators by polymeric nanoparticles loaded with anti-inflammatory drugs. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, p. 290, 2021.

POUYANFAR, N.; FARNAM, G.; AHMADI, M.; MASOUDIFAR, R.; BANAN, K.; ASADIAN, E.; SHAHHOSSEINI, S.; SHAHBAZI, M.; SHIRAZI, F. H.; GHORBANI-BIDKORPEH, F. Synthesis, modification, characterization, and in vitro evaluation of chitosan-hyaluronic acid coated MIL-100 (Fe) nanoparticles for methotrexate delivery in rheumatoid arthritis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 283, p. 137715, 2024.

QIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, G.; HAO, H.; HOU, H.; BI, J. Quaternary-ammonium chitosan, a promising packaging material in the food industry. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 323, p. 121384, 2024.

RABIEI, M.; KASHANIAN, S.; SAMAVATI, S. S.; DERAKHSHANKHAH, H.; JAMASB, S.; MCINNES, S. J. P. Nanotechnology application in drug delivery to osteoarthritis (OA), rheumatoid arthritis (RA), and osteoporosis (OSP). **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 61, p. 102011, 2021.

RAFIK, S. T.; ZEITOUN, T. M.; SHALABY, T. I.; BARAKAT, M. K., ISMAIL, C. A. Methotrexate conjugated gold nanoparticles improve rheumatoid vascular dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: gold revival. **Inflammopharmacology**, [s. l.], p. 31, p. 321-335, 2023.

RAHIMI, M.; KARIMINEZHAD, Z.; RONDON, E.; FAHMI, H.; FERNANDES, J.

C.; BENDERDOUR, M. Chitosan nanovectors for siRNA delivery: New horizons for nonviral gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 360, p. 123581, 2025.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RAUTIO, J.; MEANWELL, N. A.; DI, L.; HAGEMAN, M. J. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. **Nature reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 17(8), p. 559-587, 2018.

RAYCHAUDHURI, S.; KORSUNSKY, I.; BRENNER, M. B.; COLES, M.; SANSOM, S. N.; FILER, A.; BUCKLEY, C. D. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. **Nature**, [s. l.], v. 570, p. 246–251, 2019.

RODRIGUES, L. H. M.; DE OLIVEIRA, F. F. B.; BEZERRA, F. F.; OLIVEIRA, S. R. B. D.; BINGANA, R. D.; DO CARMO, L. D.; MELO, M. R. S.; CHAVES, L. S.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. R.; SOARES, P. M. G.; MOURAO, P. A. S.; SOUZA, M. H. L. P.; FREITAS, A. L. P.; DAMASCENO, R. O. S. Na iota-carrageenan isolated from marine alga *Agardhiella ramosissima* negatively modulates the inflammatory response in arthritis conditions. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], v. 30, p. 100386, 2023.

RUSSO, E.; VILLA, C. Poloxamer hydrogels for biomedical applications. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11(12), p. 671, 2019.

SASAKI, K.; TSUJI, T.; KIMOTO, Y.; YANAGIHARA, Y.; MASUGUCHI, K.; CHIKAMORI, A.; WATANABE, H.; MURAKAMI, T.; ORYOJI, D.; HASHIMOTO, M.; HORIUCHI, T.; EGASHIRA, N. Usefulness of daily folic acid supplementation during methotrexate treatment of Japanese patients with rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**, [s. l.], v. 31, p. 108–113, 2021.

SASAKI, R.; SAKAMOTO, J.; KONDO, Y.; OGA, S.; TAKESHITA, I.; HONDA, Y.; KATAOKA, H.; ORIGUCHI, T.; OKITA, M. Effects of cryotherapy applied at different temperatures on inflammatory pain during the acute phase of arthritis in rats. **Physical Therapy**, [s. l.], v. 101(2), p. 1–9, 2021.

SCHIFF, M. H.; SADOWSKI, P. Oral to subcutaneous methotrexate dose-conversion strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, [s. l.], v. 37(2), p. 213-218, 2017.

SCHOENMAKER, L.; WITZIGMANN, D.; KULKARNI, J. A.; VERBEKE, R.; KERSTEN, G.; JISKOOT, W.; CROMMELIN, D. J. A. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 601, p. 120586, 2021.

SHAFIQ, A., MADNI, A., KHAN, S., SULTANA, H., SUMAIRA, SHAH, H., KHAN, S., REHMAN, S., NAWAZ, M. F. Core-shell Pluronic F127/chitosan-based nanoparticles for effective delivery of methotrexate in the management of rheumatoid arthritis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 213, p. 465–477, 2022.

- SHAKERAN, Z.; KEYHANFAR, M.; VARSHOSAZ, J.; SUTHERLAND, D. S. Biodegradable nanocarriers based on chitosan-modified mesoporous silica nanoparticles for delivery of methotrexate for application in breast cancer treatment. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 118, p. 111526, 2021.
- SILVA, F. C. O.; DE MENEZES, J. E. S. A.; FERREIRA, M. K. A.; DA SILVA, A. W.; HOLANDA, C. L. A.; DOS REIS LIMA, J.; CAMPOS, A. R.; EVARISTO, F. F. V.; TEIXEIRA, E. H.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; DOS SANTOS, H. S. Antinociceptive activity of 3 β -6 β -16 β -trihydroxylup-20 (29)-ene triterpene isolated from *Combretum leprosum* leaves in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 533(3), p. 362-367, 2020.
- SILVA, L. M. R. D.; LIMA, J. D. S. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; CAMPOS, A. R.; ARAÚJO, J. I. F.; BATISTA, F. L. A.; ARAÚJO, S. M. B.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, G. C.; HOLANDA, D. K. R.; ROLIM, R. C.; FIGUEIREDO, R. W.; FIGUEIREDO, E. A. T.; DUARTE, A. S. G.; RICARDO, N. M. P. S. Graviola Fruit Bar Added Acerola By-Product Extract Protects Against Inflammation and Nociception in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 23(2), p.173-180, 2020.
- SINGH-JOY, S. D.; McLAIN, V. C. Safety Assessment of Poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, Poloxamer 105 Benzoate, and Poloxamer 182 Dibenzoate as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, [s. l.], v. 27, p. 93-128, 2008.
- SINGLA, P.; GARG, S.; BHATTI, R.; PEETERS, M.; SINGH, O.; MAHAJAN, R. K. Solubilization of hydrophobic drugs clozapine and oxcarbazepine in the lower and higher molecular weight Pluronic mixed micelles-a physicochemical, *in vitro* release and *in vitro* anti-oxidant study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317, p. 113816, 2020.
- SMITH, A. A. A.; KRYGER, M. B. L.; WOHL, B. M.; RUIZ-SANCHIS, P.; ZUWALA, K.; TOLSTRUP, M.; ZELIKIN, A. N. Macromolecular (pro)drugs in antiviral research. **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 5, p. 6407–6425, 2014.
- STAMP, L. K.; KHALILOVA, I.; TARR, J. M.; SENTHILMOHAN, R.; TURNER R.; HAIGH, R. C.; WINYARD, P. G.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, [s. l.], v. 51, p. 1796–1803, 2012.
- STEVENS, J. S.; PADILLA, S.; DEMARINI, D. M.; HUNTER, D. L.; MARTIN, W. K.; THOMPSON, L. C.; GILMOUR, M. I.; HAZARI, M. S.; FARRAJ, A. K. Zebrafish Locomotor Responses Reveal Irritant Effects of Fine Particulate Matter Extracts and a Role for TRPA1. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 161(2), p. 290-299, 2018.
- STOUT, A.; FRIEDLY, J.; STANDAERT, C. J. Systemic Absorption and Side Effects of Locally Injected Glucocorticoids. **PM&R**, [s. l.], v. 11(4), p. 409 – 419, 2019.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, [s. l.], v.140, n.6, p.805-820, 2010.
- TAYLOR, JC, DEWBERRY LS, TOTSCH SK, YESSICK LR, DEBERRY JJ, WATTS SA, SORGE RE (2017). A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**,

[*s. l.*], v. 174, p. 83-88, 2017.

TIAN, B.; HUA, S.; LIU, J. Multi-functional chitosan-based nanoparticles for drug delivery: Recent advanced insight into cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 315, p. 120972, 2023.

VERBERNE, E. A.; DE HAAN, E.; VAN TINTELEN, P.; LINDHOUT, D.; VAN HAELST, M. M. Fetal methotrexate syndrome: A systematic review of case reports. **Reproductive Toxicology**, [*s. l.*], v. 87, p. 125 – 139, 2019.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, [*s. l.*], v. 112(1), p. 116–138, 2006.

VYAWAHARE, A.y; AHMAD, A.; KANIKA; ALI, A.; SAHA, P.; GOWD, V.; KHAN, R. Autophagy targeting nanoparticles in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Materials Advances**, [*s. l.*], v. 3, 3820–3834, 2022.

WANG, H.; WILLIAMS, G. R.; WU, J.; WU, J.; NIU, S.; XIE, X.; LI, S.; ZHU, L. Pluronic F127-based micelles for tumor-targeted bufalin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [*s. l.*], v. 559, p. 289-298, 2019.

WANG, W.; ZHOU, H.; LIU, L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 158, p. 502-516, 2018.

WANG, Z.; ZHENG, Y.; LAI, Z.; HU, X.; WANG, L.; WANG, X.; LI, Z.; GAO, M.; YANG, Y.; WANG, Q.; LI, N. Effect of monosaccharide composition and proportion on the bioactivity of polysaccharides: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s. l.*], v. 254(2), p. 127955, 2024.

WANG, Z.; SUN, Q.; ZHANG, H.; WANG, J.; FU, Q.; QIAO, H.; WANG, Q. Insight into antibacterial mechanism of polysaccharides: A review. **LWT**, [*s. l.*], v. 150, p.111929, 2021.

WARD, Natalie C.; WATTS, Gerald F.; ECKEL, Robert H. Statin Toxicity Mechanistic Insights and Clinical Implications. **Circulation Research**, v. 124(2), p. 328-350, 2019.

WAYS, T. M. M.; LAU, W. M.; KHUTORYANSKIY, V. V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. **Polymers**, [*s. l.*], v. 10, p. 267, 2018.

WEN, Y; ZHANG, M; YAO, Y; GAO, Y; ZHANG, X; LIN, Y; CAI, X. Biological regulation on synovial fibroblast and the treatment of rheumatoid arthritis by nobiletin-loaded tetrahedral framework nucleic acids cargo tank. **Chinese Chemical Letters**, [*s. l.*], v. 34, p. 107549, 2023.

WINZEN, S.; SCHWABACHER, J. C.; MÜLLER, J.; LANDFESTER, K.; MOHR, K. Small surfactant concentration differences influence adsorption of human serum albumin on polystyrene nanoparticles. **Biomacromolecules**, [*s. l.*], v. 17, p. 3845–3851, 2016.

WU, Q.; YANG, Z.; NIE, Y.; SHI, Y.; FAN, D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 347(2), p. 159–166, 2014.

XIE, W.; ZHANG, Z. Jak-inhibition with baricitinib inhibits activation of nlrp1/caspase1/gdmsd pyroptosis pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 79, p. 938, 2020.

XU, J.; TAM, M.; SAMAEI, S.; LEROUGE, S.; BARRALET, J.; STEVENSON, M. M.; CERRUTI, M. Mucoadhesive chitosan hydrogels as rectal drug delivery vessels to treat ulcerative colitis, [s. l.], v. 48, p. 247-257, 2017.

XU, X.; LIU, A.; LIU, S.; MA, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, M.; ZHAO, J.; SUN, S.; SUN, X. Application of molecular dynamics simulation in self-assembled cancer nanomedicine. **Biomaterials Research**, [s. l.], v. 27, p. 39, 2023.

YANG, J.; LOU, T.; WANG, X. Fabrication of millimetre-sized amphoteric chitosan/alginate hollow vesicles for the adsorption of anionic and cationic dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 312, p. 144132, 2025.

YAO, Y.; ZHOU, Y.; LIU, L.; XU, Y.; CHEN, Q.; YALI WANG; SHIJIE WU; YONGCHUAN DENG; JIANMIN ZHANG; ANWEN SHAO. Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 7, p. 1 - 14, 2020.

YU, Y.; SHEN, M.; SONG, Q.; XIE, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 183(1), p. 91-101, 2018.

YUA, M.; YUANA, W.; LIA, D.; SCHWENDEMANA, A.; SCHWENDEMA, S. P. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 315, 23–30, 2019.

YUAN, F.; QUAN, L.; CUI, L.; GOLDRING, S. R.; WANG, D. Development of macromolecular prodrug for rheumatoid arthritis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, p. 1205–1219, 2012.

ZANANDREA, R.; BONAN, C. D.; CAMPOS, M. M. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 25(12), p. 2201-2211, 2020.

ZENG, L.; AN, L.; WU, X. Modeling Drug-Carrier Interaction in the Drug Release from Nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, [s. l.], v. 2011, p. 1-15, 2011.

ZHANG, X.; ZHANG, H. Pro-resolving and anti-inflammatory effects of resolvins and protectins in rheumatoid arthritis. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 31, p. 2995 - 3004, 2023.

ZHANG, Y.; SONG, W.; GENG, J.; CHITGUPI, U.; UNSAL, H.; FEDERIZON, J.; RZAYEV, J.; SUKUMARAN, D.K.; ALEXANDRIDIS, P.; LOVELL, J.F. Therapeutic surfactant-stripped frozen micelles. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, p. 11649, 2016.

ZHAO, F.; HU, Z.; LI, G.; LIU, M.; HUANG, Q.; AI, K.; CAI, X. Angiogenesis in rheumatoid Arthritis: Pathological characterization, pathogenic mechanisms, and nano-targeted therapeutic strategies. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 50, p. 603–639, 2025.

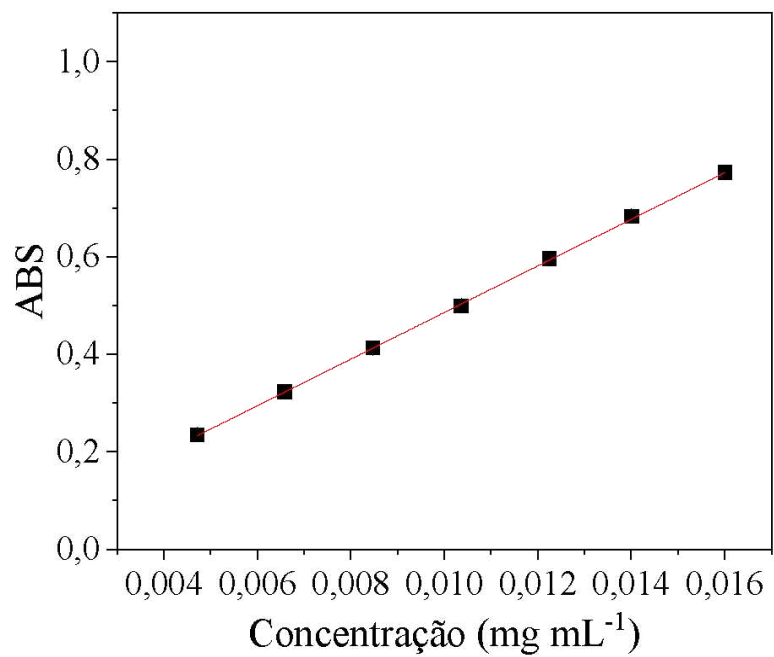
ZHAO, J.; ZHAO, M.; YU, C.; ZHANG, X.; LIU, J.; CHENG, X.; LEE, R. J.; SUN, F.; TENG, L.; LI, Y. Multifunctional folate receptor-targeting and pH- responsive nanocarriers loaded with methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 12, p. 6735–6746, 2017.

ZHENG-RONG, Lu; PETER, Qiau. Drug Delivery in Cancer Therapy, Quo Vadis? **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 15, p. 3603–3616, 2018.

ZHOU, D., LI, X.; ZHU, Y.; HU, Y.; ZHANG, S.; TONG, Z.; ZHOU, Y.; CHEN, Y. Fungal-derived chitosan-based hydrogels with antimicrobial properties for infectious wound healing. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 366, p. 123917, 2025.

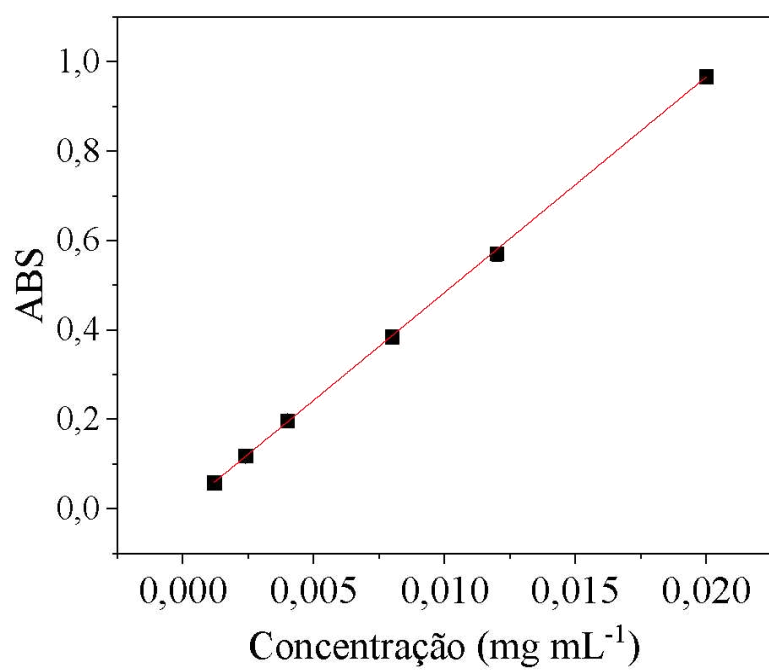
ZON, L.; PETERSON, R. Descoberta de fármacos *in vivo* no peixe-zebra. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 4, p. 35–44, 2005.

**APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MTX
EM TAMPÃO FOSFATO 7,4.**



Fonte: Dados da pesquisa.

**APÊNDICE B - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MTX EM
TAMPÃO FOSFATO 5,0**



Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE C - VALORES DE HIPER-NOCICEPÇÃO DO NCE.

Tempo (h)	Salina	Zymosan	MTX livre (40 µg kg⁻¹)	NCE (20 µg kg⁻¹)	NCE (40 µg kg⁻¹)
0	79,3 ± 5,7	73,2 ± 5,7	79,2 ± 9,2	81,8 ± 3,8	78,7 ± 5,5
1	68,0 ± 3,3	49,8 ± 6,3	67,8 ± 8,8	71,0 ± 4,3	77,8 ± 8,3
2	77,8 ± 5,3	44,6 ± 4,8	73,2 ± 8,0	53,2 ± 5,0	63,7 ± 17,3
3	80,3 ± 8,3	34,4 ± 5,8	55,4 ± 6,9	43,6 ± 2,6	53,5 ± 7,6
4	72,8 ± 6,7	35,8 ± 7,3	55,8 ± 6,8	48,8 ± 3,4	58,0 ± 14,7
5	70,7 ± 7,2	41,4 ± 4,1	61,3 ± 12,4	58,6 ± 5,6	55,7 ± 7,2
6	79,5 ± 5,5	46,0 ± 4,3	57,0 ± 6,3	42,5 ± 2,7	48,5 ± 5,3

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE D - VALORES DE HIPER-NOCICEPÇÃO DA QTS.

Tempo (h)	Salina	Zymosan	QTS (40 µg kg⁻¹)	QTS (20 µg kg⁻¹)
0	88,7 ± 9,4	86,0 ± 6,0	88,2 ± 6,3	86,4 ± 5,6
1	75,9 ± 7,5	52,2 ± 4,1	75,4 ± 4,6	69,2 ± 3,8
2	74,4 ± 4,6	25,1 ± 3,9	66,4 ± 5,3	51,3 ± 3,7
3	76,3 ± 3,7	19,1 ± 3,7	66,8 ± 3,9	51,2 ± 4,5
4	86,9 ± 6,4	21,7 ± 5,7	62,6 ± 5,5	42,2 ± 3,5
5	80,0 ± 5,3	16,0 ± 3,6	61,7 ± 6,4	43,7 ± 5,0
6	83,2 ± 7,5	21,0 ± 5,2	72,5 ± 5,2	56,4 ± 6,2

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE E - VALORES DE EDEMA DO NCE.

Tempo (h)	Salina	Zymosan	MTX livre (40 µg kg⁻¹)	NCE (20 µg kg⁻¹)	NCE (40 µg kg⁻¹)
0	5,83 ± 0,17	6,17 ± 0,17	6,17 ± 0,10	5,92 ± 0,08	6,17 ± 0,10
1	6,00 ± 0,26	7,50 ± 0,13	6,83 ± 0,21	7,47 ± 0,20	6,25 ± 0,31
2	5,50 ± 0,22	7,75 ± 0,11	7,17 ± 0,10	7,58 ± 0,15	6,75 ± 0,21
3	5,67 ± 0,21	8,00 ± 0,22	7,50 ± 0,13	7,25 ± 0,11	7,00 ± 0,13
4	5,67 ± 0,21	7,92 ± 0,24	7,58 ± 0,15	7,25 ± 0,11	7,17 ± 0,28
5	5,67 ± 0,21	7,83 ± 0,17	7,50 ± 0,18	7,33 ± 0,10	7,33 ± 0,17
6	5,83 ± 0,17	7,42 ± 0,15	7,47 ± 0,15	7,25 ± 0,11	7,25 ± 0,17

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE F - VALORES DE EDEMA DA QTS.

Tempo (h)	Salina	Zymosan	QTS (40 µg kg⁻¹)	QTS (20 µg kg⁻¹)
0	6,41 ± 0,08	6,42 ± 0,08	6,25 ± 0,11	6,25 ± 0,11
1	6,41 ± 0,08	7,08 ± 0,30	6,42 ± 0,08	6,83 ± 0,25
2	6,41 ± 0,08	10,00 ± 0,26	7,00 ± 0,13	7,33 ± 0,21
3	6,25 ± 0,28	10,42 ± 0,27	6,50 ± 0,18	7,00 ± 0,45
4	6,50 ± 0,13	10,58 ± 0,27	6,92 ± 0,08	7,42 ± 0,54
5	6,17 ± 0,25	10,25 ± 0,44	6,83 ± 0,10	7,67 ± 0,38
6	6,17 ± 0,28	10,42 ± 0,20	7,08 ± 0,08	7,67 ± 0,36

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE G - VALORES DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA PARA O NCE.

Leucócitos	Salina	Zymosan	MTX livre (40 µg kg⁻¹)	NCE (20 µg kg⁻¹)	NCE (40 µg kg⁻¹)
Totais	316,7 ± 58,7	2911,8 ± 96,1	841,7 ± 116,5	461,8 ± 99,7	338,0 ± 55,8
Neutrófilos	191,7 ± 41,7	2027,3 ± 171,2	813,6 ± 183,2	437,8 ± 40,3	344,0 ± 21,3
Mononucleares	83,3 ± 16,7	604,5 ± 26,1	244,7 ± 97,7	146,7 ± 25,2	153,0 ± 19,7

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE H - VALORES DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA PARA A QTS.

Leucócitos	Salina	Zymosan	QTS (20 µg kg⁻¹)	QTS (40 µg kg⁻¹)
Totais	316,7 ± 58,7	11391,7 ± 804,5	4333,3 ± 336,0	2375,0 ± 631,2
Neutrófilos	191,7 ± 41,7	7617,0 ± 183,9	3050,2 ± 26,5	1641,3 ± 21,8
Mononucleares	83,3 ± 16,7	3115,7 ± 68,4	1532,0 ± 125,9	698,8 ± 16,0

Fonte: Dados da pesquisa.