

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mirsiane Pascoal Costa

**Nanopartículas de PLGA-quitosana contendo dexametasona:**  
desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

Juiz de Fora

2022

Mirsiane Pascoal Costa

**Nanopartículas de PLGA-quitosana contendo dexametasona:**  
desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Maria Pinto Vilela

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Mirsiane Pascoal.

Nanopartículas de PLGA-quitosana contendo dexametasona: : desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro / Mirsiane Pascoal Costa. -- 2022.

91 p. : il.

Orientador: Guilherme Diniz Tavares

Coorientadores: Fernanda Maria Pinto Vilela, Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. COVID-19. 2. Síndrome Respiratória Aguda Grave. 3. PLGA. 4. Quitosana. 5. Dexametasona. I. Tavares, Guilherme Diniz , orient. II. Vilela, Fernanda Maria Pinto, coorient. III. Rocha, Helvécio Vinícius Antunes, coorient. IV. Título.

**Mirsiane Pascoal Costa**

**Nanopartículas de PLGA-quitosana contendo dexametasona: desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro***

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Ciências  
Farmacêuticas  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Ciências  
Farmacêuticas. Área  
de concentração:  
Produtos Naturais e  
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 16 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela** - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha** - Coorientador

FIOCRUZ

**Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva**

**Profa. Dra. Thaís Nogueira Barradas**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 09/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares, Professor(a)**, em 16/12/2022, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 16/12/2022, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helvécio Vinícius Antunes Rocha, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 07:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais Nogueira Barradas, Professor(a)**, em 19/12/2022, às 20:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1034129** e o código CRC **CD346D03**.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, que são minha base e conforto, meu porto seguro para todas as decisões e etapas da minha vida. Amo vocês!!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Guilherme Diniz, por confiar em mim para realizar este projeto de tanta relevância, por acreditar na minha capacidade, por me apoiar e sempre estar presente. Sem ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meus coorientadores Fernanda Vilela e Helvécio Rocha e a colaboradora Michelle Sarcinelli que aceitaram embarcar neste projeto e foram essenciais ao longo do caminho, por toda a atenção e disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço ao professor Gilson Macedo e a doutoranda Maria Clara Machado do IMUNOCET por me auxiliarem nos ensaios celulares.

Agradeço à toda equipe do LDNano. Cada um foi importante e fez a diferença em algum momento deste trabalho sendo entregue.

Agradeço à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo suporte, estrutura e acolhimento.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro para que a realização deste projeto se concretizasse.

Agradeço aos meus amigos e familiares pelo incentivo, pelo constante incentivo e apoio, por entenderem minhas ausências quando necessário e mesmo assim se fazerem presentes por mim. Cada um de vocês é indispensável em minha vida. Obrigada por seguirem comigo em minha trajetória.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas (NP) constituídas por PLGA e revestidas por quitosana (QT) para a encapsulação da dexametasona (DEX), visando ao aumento da eficácia desse fármaco no contexto do tratamento da síndrome respiratória aguda grave (SRAG) relacionada à COVID-19. Para tanto, foram utilizados acetato de DEX (DEXAc) ou fosfato dissódico de DEX para o desenvolvimento das NP. A utilização do DEXAc propiciou maior eficiência de encapsulação (EE) do fármaco nas NP e, dessa forma, essa formulação foi escolhida para os ensaios posteriores. As NP-DEXAc foram revestidas com QT (NP-DEXAc-QT) e caracterizadas em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta (PZ), morfologia, eficiência de encapsulação (EE) e *drug loading* (DL). Além disso, análises de difração de raios-X (DRX) e de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram conduzidas. A citotoxicidade em linhagem J774.A1 (macrófagos murinos) e a atividade anti-inflamatória *in vitro* após estímulo dessa linhagem com LPS ou LPS+IFN- $\gamma$  e posterior quantificação de óxido nítrico (NO), IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  também foram avaliadas. As formulações desenvolvidas apresentaram característica de sistemas monodispersos (Pdl < 0,3). O DHm das NP-DEXAc-QT ( $264,4 \pm 4,4$  nm) foi maior que o obtido para as NP-DEXAc ( $207,3 \pm 6,7$  nm). Além disso, após o revestimento, houve inversão do PZ das NP-DEXAc ( $-11,83 \pm 1,4$  mV) para valores positivos ( $+30,0 \pm 1,6$  mV). Ademais, as análises de microscopia evidenciaram que o revestimento tornou a superfície das NP mais lisa. Analisados em conjunto, esses dados podem indicar que as NP foram revestidas de maneira eficiente pela QT. A EE foi elevada para ambas as formulações, com resultados iguais a  $83,7 \pm 1,04\%$  (DL =  $6,96 \pm 0,09\%$ ) para as NP-DEXAc e  $78,5 \pm 0,26\%$  (DL =  $6,53 \pm 0,02\%$ ) para as NP-DEXAc-QT. As análises de DRX e FTIR confirmaram a encapsulação da DEXAc no interior da matriz polimérica, bem como a ocorrência do revestimento das NP pela QT. Não houve indício de citotoxicidade até as concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  e 400  $\mu\text{g/mL}$  para as NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT, respectivamente. Esse resultado pode indicar que a QT aumenta a tolerabilidade das células às nanopartículas. Em relação à atividade anti-inflamatória, as NP-DEXAc-QT propiciaram redução significativa nos níveis de NO e das citocinas comparativamente ao grupo controle (células estimuladas e não tratadas), além de

apresentarem efeito comparável ao fármaco livre. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que as nanopartículas revestidas por QT apresentam características promissoras para a entrega da DEXAc visando aplicação no tratamento da SRAG associada a COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19; SRAG; dexametasona; PLGA; quitosana

## ABSTRACT

The objective of this work was to develop and characterize nanoparticles (NP) consisting of PLGA and coated with chitosan (QT) for the encapsulation of dexamethasone (DEX), aiming to increase the efficacy of this drug in the context of the treatment of severe acute respiratory syndrome (SARS) related to COVID-19. For this purpose, DEX acetate (DEXAc) or DEX disodium phosphate were used for the development of PN. The use of DEXAc provided greater encapsulation efficiency (EE) of the drug in the PN and, therefore, this formulation was chosen for subsequent trials. NP-DEXAc were coated with QT (NP-DEXAc-QT) and characterized in relation to mean hydrodynamic diameter (DHm), polydispersity index (Pdl), zeta potential (PZ), morphology, encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL). In addition, X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyzes were conducted. Cytotoxicity in J774.A1 strain (murine macrophages) and in vitro anti-inflammatory activity after stimulation of these strain with LPS or LPS+IFN- $\gamma$  and subsequent quantification of nitric oxide (NO), IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$  were also evaluated. The developed formulations showed characteristics of monodisperse systems (Pdl < 0.3). The DHm of NP-DEXAc-QT ( $264.4 \pm 4.4$  nm) was higher than that obtained for NP-DEXAc ( $207.3 \pm 6.7$  nm). Furthermore, after coating, there was an inversion of the PZ of the NP-DEXAc ( $-11.83 \pm 1.4$  mV) to positive values ( $+30.0 \pm 1.6$  mV). Furthermore, the microscopy analyzes showed that the coating made the surface of the PN smoother. Analyzed together, these data may indicate that the NP were efficiently coated by QT. The EE was high for both formulations, with results equal to  $83.7 \pm 1.04\%$  (LD =  $6.96 \pm 0.09\%$ ) for NP-DEXAc and  $78.5 \pm 0.26\%$  (DL =  $6.53 \pm 0.02\%$ ) for QT-DEXAc-NP. DRX and FTIR analyzes confirmed the encapsulation of DEXAc within the polymeric matrix, as well as the occurrence of NP coating by QT. There was no evidence of cytotoxicity up to concentrations of 200  $\mu\text{g/mL}$  and 400  $\mu\text{g/mL}$  for DEXAc-NP and QT-DEXAc-NP, respectively. This result may indicate that CT increases the cells' tolerance to nanoparticles. Regarding the anti-inflammatory activity, the NP-DEXAc-QT provided a significant reduction in the levels of NO and cytokines compared to the control group (stimulated and untreated cells), in addition to presenting a comparable effect to the free drug. Thus, the results obtained indicate that QT-coated nanoparticles have promising characteristics for the

delivery of DEXAC aimed at application in the treatment of SARS associated with COVID-19.

Keywords: COVID-19; SARS; dexamethasone; PLGA; chitosan

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tempestade de citocinas característica da SRAG .....	21
Figura 2 - Estrutura química da dexametasona.....	23
Figura 3 - Estrutura química do fosfato dissódico de dexametasona .....	24
Figura 4 - Estrutura química do acetato de dexametasona.....	25
Figura 5 - Estrutura química do PLGA, em que os índices n e m indicam a quantidade de repetições das unidades monoméricas de ácido láctico e ácido glicólico, respectivamente .....	27
Figura 6 - Estrutura química da quitosana .....	29
Figura 7 - Fluxograma da estratégia experimental do estudo .....	32
Figura 8 - Síntese das NP contendo FDEX pelo método da dupla emulsificação- evaporação de solvente .....	34
Figura 9 - Síntese das NP pelo método de emulsificação- evaporação de solvente..	35
Figura 10 - Distribuição de tamanho das NP por intensidade (n=3) (a) NP-Bd; (b) NP-FDEX; (c) NP-Bs; (d) NP-DEXAc .....	43
Figura 11- Distribuição de PZ das NP (n=3) (a) NP-Bd; (b) NP-FDEX; (c) NP-Bs; (d) NP-DEXAc.....	44
Figura 12 - Curvas analíticas para (a) FDEX e (b) DEXAc nas concentrações de 50 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL.....	45
Figura 13 - Cromatogramas referentes ao padrão de FDEX (a) e DEXAc à 62,5 µg/mL (ponto central das curvas analíticas) (b); ao sobrenadante das NP-FDEX (c) e ao sobrenadante das NP-DEXAc (d). Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm.....	47
Figura 14 - Cromatogramas referentes ao sobrenadante das NP-Bd (a) e NP-Bs (b). Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm. ....	48
Figura 15 - Aspecto das formulações finais de (a) NP-Bs; (b) NP-Bs-QT; (c) NP-DEXAc; (d) NP-DEXAc-QT.....	50
Figura 16 - Distribuição de tamanho das NP por intensidade (n=3) .....	51
Figura 17 - Distribuição de PZ das NP (n=3) para (a) NP-Bs-QT e (b) NP-DEXAc-QT .....	52
Figura 18 - Cromatograma referente ao sobrenadante das NP-DEXAc-QT. Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm. ....	53
Figura 19 - Cromatograma referente ao sobrenadante das NP-Bs-QT. Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35),	

isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm. ....	53
Figura 20 - Micrografias por MEV para as nanopartículas brancas com seus respectivos histogramas de distribuição de tamanho por número (a) NP-Bs e (b) NP-Bs-QT .....	55
Figura 21 - Difratoformas das matérias primas puras (a) DEXAc; (b) PLGA; (c) PVA; (d) quitosana .....	57
Figura 22- Difratoformas das formulações nanoestruturadas (a) NP-Bs; (b) NP-Bs-QT; (c) NP-DEXAc; (d) NP-DEXAc-QT .....	58
Figura 23 - Espectros de infravermelho de (a) PLGA; (b) PVA e (c) QT .....	59
Figura 24 - Espectros de infravermelho de (a) NP-Bs e (b) NP-Bs-QT .....	61
Figura 25 - Espectros de infravermelho de (a) DEXAc; (b) NP-DEXAc; (c) NP-DEXAc-QT e (d) mistura física dos componentes .....	62
Figura 26 - Curva analítica para DEXAc nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95 µg/mL. ....	63
Figura 27 - Perfis de liberação de DEXAc encapsulado em NP-DEXAc e NP-DEXAc em meio de dissolução PBS pH 7,4 (n=3. Barras representam o desvio padrão).....	64
Figura 28 - Influência das NP-Bs e NP-Bs-QT (a) e DEXAc; NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT (b) na viabilidade de células J774A.1. [n= 4. Barras representam o desvio padrão. Diferenças significativas (p>0,05) em relação ao controle são marcadas por*].....	66
Figura 29 - Dosagem de NO em linhagem J774A.1 estimulada com LPS e INF-γ e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT (n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas (p>0,05) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por * .....	69
Figura 30 - Dosagem de IL-6 em linhagem J744A.1 estimulada com LPS e tratada com DEXAc , NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT [n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas (p>0,05) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por *] .....	72
Figura 31 - Dosagem de IL-12 em linhagem J744A.1 estimulada com LPS e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT [n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas (p>0,05) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por *] .....	74
Figura 32 - Dosagem de TNF-α em linhagem J744A.1 estimulada com LPS e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT [n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas (p>0,05) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por *] .....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores* de DHm, Pdl e PZ para as diferentes formulações de nanopartículas contendo ou não FDEX e DEXAc** .....	42
Tabela 2 - Valores* de EE e DL para as nanopartículas desenvolvidas (n=3) .....	48
Tabela 3 - Valores* de DHm, Pdl e PZ para as NP revestidas com QT .....	50
Tabela 4 -Valores* de EE e DL para as nanopartículas desenvolvidas (n=3) .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE-2	Enzima conversora da angiotensina 2
DEXAc	Acetato de dexametasona
DL	<i>Drug loading</i>
EE	Eficiência de encapsulação
FDEX	Fosfato dissódico de dexametasona
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
INF- $\gamma$	Interferon gama
IP10	Proteína induzida por interferon gama
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos
NK	<i>Natural killer</i>
NP	Nanopartículas
NP-Bd	Nanopartículas brancas feitas por dupla emulsificação- <i>evaporação</i> de solvente
NP-Bs	Nanopartículas brancas feitas por emulsificação- <i>evaporação</i> de solvente
NP-Bs-QT	Nanopartículas brancas revestidas com quitosana feitas por emulsificação- <i>evaporação</i> de solvente
NP-DEXAc	Nanopartículas contendo acetato de dexametasona
NP-DEXAc-QT	Nanopartículas contendo acetato de dexametasona revestidas com quitosana
NP-FDEX	Nanopartículas contendo fosfato dissódico de dexametasona
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Poli (álcool vinílico)
QT	Quitosana
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1	COVID-19: PANORAMA MUNDIAL E SEUS EFEITOS	19
2.2	SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SRAG)	20
2.3	DEXAMETASONA	22
2.4	NANOPARTÍCULAS DE PLGA	26
2.5	QUITOSANA	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1	DESENHO DO ESTUDO	32
4.2	MATERIAIS	32
4.3	MÉTODOS	33
<b>4.3.1</b>	<b>Desenvolvimento das nanopartículas de PLGA contendo FDEX e DEXAc</b>	<b>33</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Caracterização das NP-FDEX e NP-DEXAc</b>	<b>35</b>
4.3.2.1	<i>Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)</i>	35
4.3.2.2	<i>Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)</i>	35
<b>4.3.3</b>	<b>Revestimento das nanopartículas de PLGA com QT</b>	<b>36</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Caracterização das nanopartículas revestidas</b>	<b>37</b>
4.3.4.1	<i>Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)</i>	37
4.3.4.2	<i>Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)</i>	37
4.3.4.3	<i>Morfologia</i>	37
4.3.4.4	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	38
4.3.4.5	<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR/ATR)</i>	38
4.3.4.6	<i>Avaliação do perfil de liberação</i>	38
4.3.4.7	<i>Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas</i>	39
4.3.4.8	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro</i>	39
4.3.4.9	<i>Dosagem de Óxido Nítrico</i>	40
4.3.4.10	<i>Dosagem de Citocinas</i>	40
<b>4.3.5</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>40</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO FDEX E DEXAC 42	
5.1.1	Diâmetro hidrodinâmico médio (D <sub>hm</sub> ), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)	42
5.1.2	Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS	49
5.2.1	Diâmetro hidrodinâmico médio (D <sub>hm</sub> ), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)	50
5.2.2	Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)	52
5.2.3	Morfologia	55
5.2.4	Difração de raios X (DRX)	56
5.2.5	Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR/ATR)	59
5.2.6	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i>	63
5.2.7	Avaliação da citotoxicidade	65
5.2.8	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	68
5.2.8.1	Dosagem de Óxido Nítrico	68
5.2.8.2	Dosagem de citocinas	70
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é a doença causada por um novo coronavírus (SARS-CoV-2), a qual acomete preferencialmente as vias respiratórias. Sua transmissão se dá principalmente através de gotículas de saliva que se espalham quando uma pessoa infectada espirra ou tosse, gotículas suspensas no ar e pelo contato com secreção nasal (WHO, 2021; WU et al, 2020). Essa patologia pode ser caracterizada por um espectro clínico variando de infecções assintomáticas a quadros severos. Dessa forma, a população em geral é capaz de contrair o SARS-CoV-2 e apresentar sintomas leves a moderados em resposta ao vírus, não necessitando de cuidados especiais (WHO, 2021; JIN et al, 2020). No entanto, idosos e pessoas que apresentam doenças pré-existentes estão mais suscetíveis a apresentarem sintomas graves da doença, que incluem dificuldade de respirar ou falta de ar, perda de fala ou movimento e dor ou pressão no peito (WHO, 2021).

As mortes por COVID-19 estão atreladas a complicações decorrentes da doença em sua forma mais severa, conhecida como Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Nessa situação, o sistema imune inato libera citocinas pró-inflamatórias em resposta à entrada do vírus no organismo, fazendo com que haja a chamada “tempestade de citocinas”, o que causa graves lesões ao tecido pulmonar (KESHTA et al., 2021; ABDIN et al., 2020).

A dexametasona (DEX), devido às ações anti-inflamatória e imunossupressora, vem sendo amplamente empregada para o tratamento da SRAG, sendo seu benefício clínico reportado no estudo randomizado RECOVERY (Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy), da Universidade de Oxford. Apesar de seu uso continuamente crescente para esta finalidade, este fármaco tem como contraponto o aparecimento de efeitos adversos a depender de seu tempo de uso. A curto prazo, seu uso pode causar resistência a bloqueadores neuromusculares, eventos autoimunes e cardiovasculares. Já em uso prolongado - de um a três meses contínuos - os efeitos mais conhecidos são hiperglicemia, glaucoma, catarata, retenção de líquidos, hipertensão, efeitos psicológicos como oscilações de humor, mudanças de comportamento e confusão, crescimento anormal de cabelo, osteoporose e distúrbios no ciclo menstrual (ALESSI et al., 2020; MATTOS-SILVA et al., 2020; NOREEN; MAQBOOL; MADNI, 2020).

Nesse sentido, o uso de nanopartículas para aplicação na entrega de fármacos constitui estratégia promissora para, além de melhorar as propriedades físico-químicas do ativo encapsulado, prevenir sua degradação química e promover o controle de sua liberação, incrementar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos tóxicos (AL-HALLACK et al., 2011; COUVREUR, 2013; SILVA et al., 2020). Sob essa perspectiva, as nanopartículas poliméricas se destacam em virtude da elevada estabilidade durante o armazenamento, bem como no ambiente fisiológico (SILVA et al., 2020). O poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um copolímero sintético amplamente utilizado para o preparo dessas nanopartículas, uma vez que apresenta características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (BHATT et al., 2020; GU et al., 2020). Dessa forma, seu uso em humanos foi autorizado pela *Food and Drug Administration* (FDA), incluindo a administração pela via endovenosa (MIR et al., 2017). Diante disso, estudos utilizando nanopartículas de PLGA para aplicação no tratamento da COVID-19 têm sido conduzidos (POURHAJIBAGHER et al., 2021; UCAR et al., 2021).

Por meio da modificação de superfície das nanopartículas é possível modular suas características de estabilidade e seu tempo de meia-vida na circulação sanguínea, proporcionar uma maior interação biológica e, além disso, otimizar a atividade farmacológica pretendida. A esse respeito, existem relatos do desenvolvimento de nanopartículas de PLGA revestidas com quitosana (QT) as quais apresentaram desempenho superior em relação à sua eficácia, estabilidade e entrega modificada de fármacos quando comparadas àquelas sem o revestimento (DANDAMUDI et al., 2021; ARAFA et al., 2020; CHATZITAKI et al., 2020). A QT, copolímero catiônico derivado da quitina, apresenta interessantes propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e alergenicidade. Ademais, possui atividades anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana, antioxidante e mucoadesiva, fazendo com que seja de grande interesse para utilização nas áreas médica, farmacêutica, odontológica, agrícola e cosmética (GARG et al., 2019). Assim, a QT poderia potencializar a atividade anti-inflamatória da DEX, permitindo a diminuição da dose administrada, com consequente redução de efeitos tóxicos desse fármaco.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma formulação de nanopartículas constituídas por PLGA e revestidas com quitosana para a

encapsulação da dexametasona visando ao tratamento de SRAG associada à COVID-19.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 COVID-19: PANORAMA MUNDIAL E SEUS EFEITOS

A pandemia da COVID-19, doença que deixou o mundo em situação de extrema alerta, é causada por um novo coronavírus denominado SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), vírus que acomete as vias respiratórias, ou seja, nariz, boca, garganta, traqueia e pulmões (WHO, 2022). Os primeiros casos reportados dessa nova doença tiveram origem em Wuhan, na província de Hubei (China) em dezembro de 2019 e foram identificados como uma pneumonia de etiologia desconhecida (WU *et al.*, 2020). Desde então, os casos de infecção pelo vírus têm se espalhado rapidamente pelo mundo. Em 11 de março de 2020, o diretor-geral da Organização Mundial da Saúde (OMS), Tedros Adhanom Ghebreyesus, declarou pandemia de COVID-19. Até a data da declaração, haviam sido registrados 118 mil casos em 114 países, totalizando 4.292 mortes (WHO, 2021).

Estudos revelam que a forma de transmissão principal se dá através de gotículas de saliva quando uma pessoa infectada espirra ou tosse, além de gotículas suspensas no ar e através de contato com secreção nasal (SALIAN *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2020). O período de latência é geralmente de 3 a 7 dias, podendo chegar a 14 dias (JIN *et al.*, 2020).

A população em geral é capaz de contrair o SARS-Cov-2 e apresentar sintomas leves a moderados em resposta ao vírus, que comumente não requerem cuidado especial (WHO, 2022; OCHANI *et al.*, 2021). Os sintomas mais comuns incluem febre, cansaço e tosse seca. No entanto, outros sintomas têm sido reportados, tais como dor de garganta, diarreia, desconforto e dores, cefaleia, perda de paladar ou olfato (podem vir juntos ou individualmente), erupção cutânea na pele e descoloração dos dedos das mãos ou dos pés (WHO, 2022). No entanto, idosos e pessoas que apresentam doenças pré-existentes, também chamadas comorbidades, como diabetes, hipertensão, doenças autoimunes, doenças respiratórias crônicas, câncer, dentre outras, estão mais suscetíveis a apresentarem sintomas graves da doença, que incluem dificuldade de respirar ou falta de ar, perda de fala ou movimento e dor ou pressão no peito (WHO, 2022). Há ainda pacientes assintomáticos, mas que são capazes de espalhar a doença para outros indivíduos.

De acordo com Liu e colaboradores (2020) estas pessoas representam cerca de 30 a 60% dos infectados.

Até a novembro de 2022, quase três anos após a declaração de crise sanitária e emergência por coronavírus, foram registrados quase 650 milhões de casos, totalizando mais de 6 milhões de mortes no mundo todo. As mortes por COVID-19 se dão principalmente como resultados de complicações decorrentes da doença em sua forma mais severa, denominada de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (YE; WANG; MAO, 2020). É importante destacar que a aprovação de vacinas por diferentes agências regulatórias foi capaz de frear a escalada de óbitos (FIOLET et al., 2022). No entanto, a influência de novas variantes do vírus na eficácia vacinal ainda é um fator preocupante (MALIK et al., 2022). Além disso, o fato de existirem pessoas não vacinadas ou com esquema vacinal incompleto pode representar maior risco de desenvolvimento de sintomas graves nesses indivíduos. Nesse sentido, um aumento no número de casos de SRAG associados à COVID-19 tem sido observado no Brasil (INFOGRIPE, 2022).

## 2.2 SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SRAG)

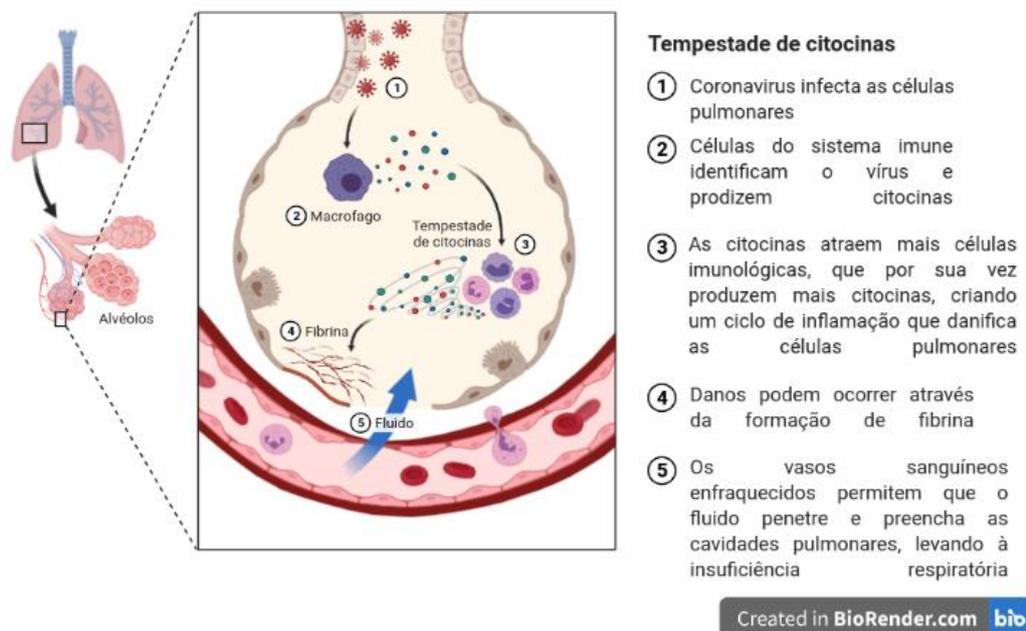
A SRAG foi primeiramente reconhecida em 2003, no final do mês de fevereiro, durante um surto originário da China e que se propagou para outros quatro países (WHO, 2022). Tratava-se de uma doença respiratória viral causada pelo coronavírus SARS-CoV-1. Anos depois, em 2019, um novo surto de SRAG surgiu no mundo, agora associado ao novo coronavírus (SARS-CoV-2) e dotado de maior capacidade de se espalhar rapidamente (LIU et al., 2020).

Cerca de 20% das pessoas acometidas pela COVID-19 desenvolvem SRAG, com uma taxa de letalidade aproximada de 2,3% (MENDES et al., 2020; SHI et al., 2020). O período de incubação da doença varia de 2 a 14 dias, com uma média de 5,1 dias (MENDES et al., 2020). Febre, tosse seca, fadiga e dificuldade para respirar foram relatados como sintomas comuns deste quadro (PARK, 2020).

Os pulmões são os mais afetados pela SRAG associada à COVID-19. Isto porque estes órgãos possuem células alveolares tipo II ricas em receptores ACE-2, uma enzima ligada à membrana e componente do sistema renina-angiotensina (SHI et al., 2020). Essa enzima possui papel importante e fundamental na proteção dos pulmões contra lesões respiratórias agudas, mediando proliferação, fibrose e inflamação do tecido pulmonar (ABDIN et al., 2020).

Em resposta à entrada do vírus SARS-CoV-2 no tecido pulmonar, o sistema imune inato ativa uma cascata inflamatória para combatê-lo. Para isso, libera citocinas pró-inflamatórias em elevadas concentrações, causando também severos danos pulmonares (KESHTA et al., 2021; ABDIN et al., 2020). Estudos mostram que IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, INF $\gamma$ , IP 10, MCP 1 e TNF- $\alpha$  são as citocinas encontradas em maiores níveis séricos em quadros de SRAG, desempenhando um papel importante na progressão dessa síndrome associada à COVID-19 (KESHTA et al., 2021; MENDES et al., 2020). Elas são liberadas rapidamente e recrutam monócitos e células dendríticas para os pulmões, causando lesões graves no tecido. Este fenômeno é conhecido como “tempestade de citocinas” (ABDIN et al., 2020), e seu mecanismo pode ser demonstrado na Figura 1.

Figura 1- Tempestade de citocinas característica da SRAG



Fonte: Adaptado de Iwasaki (2021)

A citocina IL-6 desempenha papel fundamental nas respostas inflamatórias agudas e na tempestade de citocinas. Além disso, seus níveis são elevados em pacientes com COVID-19, mostrando uma correlação entre a gravidade da doença e sua concentração sérica. Pesquisas revelam que seus níveis são significativamente

mais elevados em indivíduos acometidos com a forma severa da doença do que naqueles em sua forma moderada e branda (ABDIN et al., 2020).

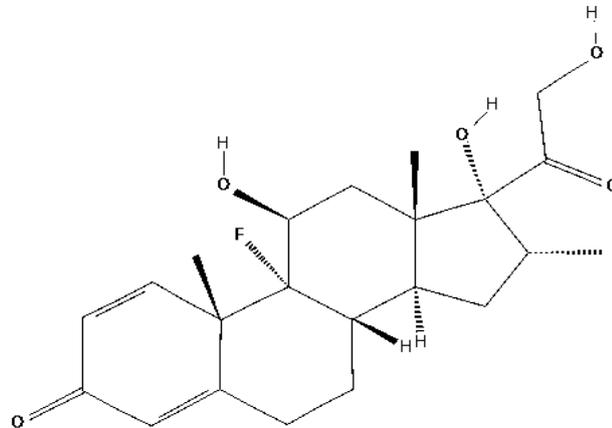
A tempestade de citocinas também pode levar à falência de órgãos de forma rápida. Complicações renais e cardiovasculares também foram relatadas em pacientes com SRAG, seja devido à expressão de ACE-2 nos rins e coração ou como consequência dos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (KESHTA et al., 2021).

Diante do exposto, torna-se imprescindível a procura de um tratamento que possa ser eficaz e seguro para o tratamento da SRAG, visando reduzir o número de óbitos por suas complicações. Levando em consideração a tempestade de citocinas característica da SRAG associada à COVID-19, tratamentos com fármacos corticosteroides têm sido propostos a fim de combater essa resposta exagerada do sistema imune. Nesse sentido, a dexametasona tem apresentado resultados positivos na redução da mortalidade de pacientes com COVID-19 que necessitam de suporte respiratório (KESHTA et al., 2021).

### 2.3 DEXAMETASONA

A dexametasona (DEX) (9-fluoro-11 $\beta$ ,17,21-triidroxi-16 $\alpha$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) (Figura 2) é um potente fármaco da classe dos anti-inflamatórios esteroidais, também denominados corticosteroides, amplamente utilizado para o tratamento de inflamações sistêmicas (ANVISA, 2022). Pertencente à classe dos glicocorticoides, apresenta ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, com potência de 25 a 30 vezes maior que seu análogo natural, o cortisol. Ademais, possui maior atividade anti-inflamatória e tempo de meia-vida quando comparada a outros corticoides, além de baixa atividade mineralocorticoide (ANVISA, 2022).

Figura 2 - Estrutura química da dexametasona



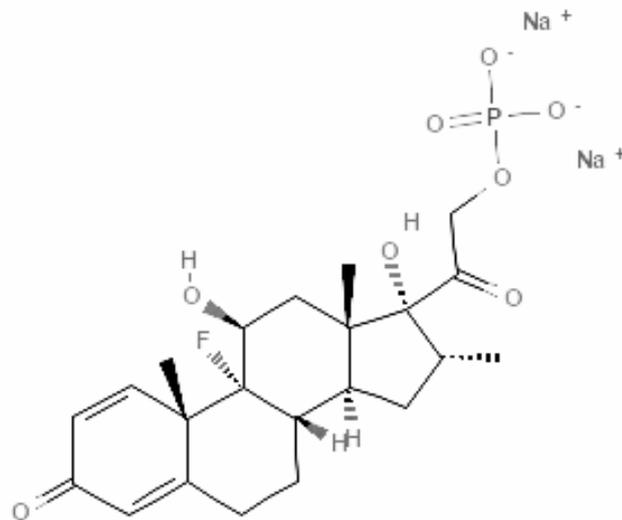
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

O mecanismo de ação da DEX é comum aos glicocorticoides. Logo, age inibindo a fosfolipase A2, levando à inibição de toda a cascata do ácido araquidônico e barrando a formação de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Conjuntamente, agem também reduzindo a migração e adesão leucocitária, que reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias no local, culminando em ação imunossupressora (RANG et al., 2016).

Seu uso é indicado em condições em que seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores são desejados, principalmente para tratamento intensivo por curto período. Os usos clínicos mais comuns incluem condições como reumatismo, dermatoses, alergias, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e edema cerebral (RANG et al., 2016).

No Brasil, a DEX é comercializada em formulações farmacêuticas nas formas de acetato ou fosfato de sódio. O fosfato dissódico de dexametasona (11 $\beta$ ,16 $\alpha$ )-9-fluor-11,17-di-hidroxi-16-metil-21-(fosfono-oxi)-pregna-1,4-dieno-3,20-diona) (FDEX) (Figura 3), de massa molar 516,41 g/mol, apresenta-se como um pó branco, com característica muito higroscópica e que possui polimorfismo. É um composto facilmente solúvel em água e muito pouco solúvel em etanol. É comercializado sob as formas de solução injetável e solução oftálmica (em associação com outros fármacos).

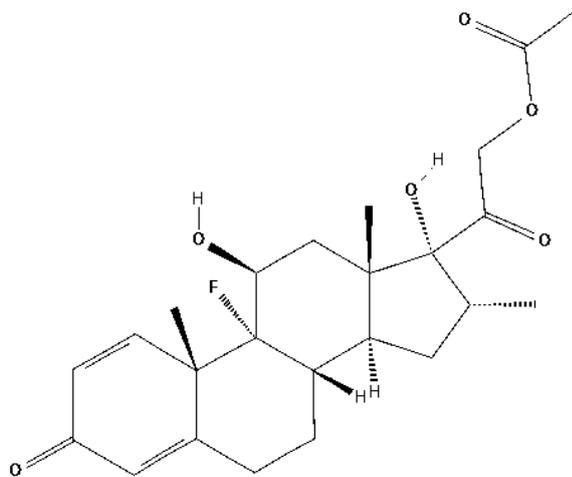
Figura 3 - Estrutura química do fosfato dissódico de dexametasona



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Já o acetato de dexametasona (11 $\beta$ , 16 $\alpha$ )-9-fluor-11,17-diidroxi-16-metil-3,20-dioxopregna-1,4-dieno-21-il acetato) (DEXAc) (Figura 4) se apresenta como um pó cristalino, branco ou quase branco, de massa molar 434,50 g/mol, praticamente insolúvel em água e facilmente solúvel em álcool etílico. Sua comercialização se dá sob as formas de comprimido simples, creme dermatológico, solução injetável (em associação com outros fármacos) (ANVISA, 2019).

Figura 4 - Estrutura química do acetato de dexametasona



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Com o surgimento do SARS-CoV-2, pesquisadores e especialistas ao redor do mundo têm procurado opções de tratamento para a COVID-19 e suas complicações, sobretudo nos casos de SRAG. Nesse sentido, a DEX tem se destacado como forma de combater a já mencionada tempestade de citocinas característica desse quadro (Figura 1) (NOREEN et al., 2021; HUANG et al., 2020). Além disso, esse fármaco promove também a inibição da ativação de macrófagos, células importantes para a efetivação do evento inflamatório (NOREEN et al., 2021; YOUSEF et al., 2016). É importante ressaltar que, devido a seu efeito supressor imunológico, a DEX teria efeito prejudicial se usada no início do tratamento da COVID-19 por beneficiar a proliferação dos vírus. Assim, sua utilização é indicada somente nos casos graves da doença (ISIDORI et al., 2020).

O RECOVERY (Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy), estudo de maior destaque acerca do uso da DEX para o tratamento de COVID-19, é um ensaio feito com pacientes hospitalizados acometidos com a doença. Envolveu milhares de médicos, enfermeiros, farmacêuticos e administradores em pesquisa em cerca de 175 hospitais por todo o Reino Unido. Mais de 115 mil pacientes foram selecionados aleatoriamente para fazer parte de diferentes grupos de tratamento ou para nenhum tratamento adicional. Os grupos de tratamento foram: lopinavir-ritonavir, dexametasona em baixa dose, hidroxicloroquina (que foi interrompido

devido à falta de eficácia), azitromicina, tocilizumab e plasma convalescente (colhido de doadores que se recuperaram da COVID-19 e que contém anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2).

Neste estudo, um total de 2104 pacientes foram escolhidos aleatoriamente para receber tratamento com DEX (6 mg/dia), por via oral ou injetável, durante 10 dias. Esse grupo foi comparado ao grupo em que 4321 pacientes receberam apenas o tratamento usual. Os resultados mostraram que a DEX reduziu em  $\frac{1}{3}$  o número de mortes entre os pacientes que receberam ventilação mecânica e em  $\frac{1}{5}$  entre os pacientes que receberam apenas oxigênio. Esses números indicam que a DEX reduz o risco de mortalidade em pacientes com complicações respiratórias graves. No entanto, não foram encontrados benefícios no caso de pacientes que não necessitavam de auxílio respiratório. Além disso, a eficácia da DEX em pacientes com comorbidades não foi reportada (RECOVERY, 2020).

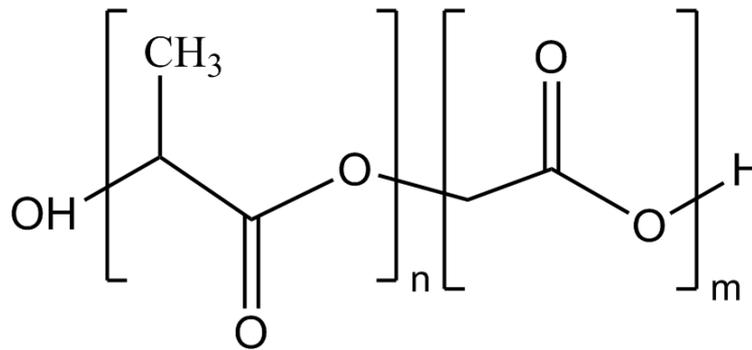
No entanto, assim como os demais fármacos da classe dos corticoides, a DEX apresenta efeitos adversos indesejáveis quando usada a curto prazo (tempo inferior a um mês) como resistência a bloqueadores neuromusculares, eventos autoimunes e cardiovasculares e superinfecções bacterianas. Tais efeitos são mais severos quando esse fármaco é utilizado a longo prazo (de um a três meses), provocando quadros de hiperglicemia, glaucoma, catarata, retenção de líquidos, hipertensão, efeitos psicológicos como oscilações de humor, mudanças de comportamento e confusão, crescimento anormal de cabelo e alterações no ciclo menstrual (ALESSI et al., 2020; MATTOS-SILVA et al., 2020; NOREEN; MAQBOOL; MADNI, 2020). Por isso, visando contornar esse inconveniente, diferentes abordagens vêm sendo estudadas, tais como a encapsulação da DEX em sistemas nanoestruturados. Dentre esses sistemas, destaca-se o uso de nanopartículas poliméricas devido à sua alta estabilidade durante o armazenamento e em ambiente fisiológico, além de atrair o interesse da indústria farmacêutica pela maioria de seus processos produtivos possuírem um potencial em relação ao aumento de escala. (BEGINES et al., 2020; SILVA, et al., 2020).

## 2.4 NANOPARTÍCULAS DE PLGA

O PLGA é um copolímero dos ácidos lático e glicólico, ligados entre si por uma ligação éster (Figura 5), e apresenta vantagens como baixa toxicidade,

biocompatibilidade, resistência mecânica e cinética previsível de degradação (BHATT et al, 2020). Além disso, possui comportamento termoplástico, o que possibilita que este polímero se molde facilmente quando é exposto ao aquecimento (BHATT, 2013; MERKLI et al., 1998).

Figura 5 - Estrutura química do PLGA, em que os índices n e m indicam a quantidade de repetições das unidades monoméricas de ácido lático e ácido glicólico, respectivamente



Fonte: Adaptado de DANHIER *et al.* (2012)

O PLGA é um dos polímeros biodegradáveis mais utilizados para o preparo de nanopartículas poliméricas porque, além das vantagens já mencionadas, sua hidrólise resulta na liberação dos ácidos lático e glicólico. Como essas substâncias são facilmente metabolizadas pelo organismo através do ciclo de Krebs, uma toxicidade sistêmica muito baixa está associada ao uso de PLGA para entrega de fármacos (DANHIER et al., 2012). Dessa forma, esse polímero foi aprovado para uso humano pela FDA e pela EMA (agências de regulação sanitárias americanas e europeias, respectivamente) e, nesse sentido, existem relatos de sua utilização para a encapsulação de uma vasta gama de substâncias ativas, tais como antibióticos, proteínas, peptídeos e anti-inflamatórios (ISLAM, PATHAK, 2021; GARAKANI et al., 2020; RYU et al., 2019).

Este polímero está comercialmente disponível com diferentes massas molares e composições. As formas de PLGA são geralmente identificadas pela proporção de monômeros utilizada. Por exemplo, PLGA 75:25 identifica um copolímero cuja composição é de 75% de ácido lático e 25% de ácido glicólico (GARAKANI et al., 2020), ao passo que a proporção 50:50 designa quantidades

iguais desses monômeros. Essa proporção está relacionada com a hidrofiliicidade e taxa de hidratação do polímero, sendo que maiores concentrações de ácido glicólico (mais hidrofílico) acarretam maior captação de água e maior erosão/degradação da cadeia polimérica (LAKKIREDDY; BAZILE, 2016). Assim, dependendo da massa molar e da proporção entre os ácidos lático e glicólico, o tempo de degradação pode variar de vários meses a vários anos (OPERTI et al., 2021; DANHIER et al., 2012). Nesse sentido, a proporção 50:50 tem propiciado adequado perfil de liberação de diferentes fármacos encapsulados nas nanopartículas de PLGA (MAKADIA; SIEGEL, 2011), incluindo a dexametasona (KIM et al., 2021; KIM, MARTIN, 2006; LI et al, 2019).

O preparo de nanopartículas de PLGA para encapsulação de fármacos é realizado, mais comumente, pelo método da emulsificação-*evaporação de solvente*, usado para moléculas hidrofóbicas e pela técnica de *dupla emulsificação-*evaporação de solvente**, para o caso da encapsulação de moléculas hidrofílicas (DANHIER et al, 2012). Na emulsificação-*evaporação de solvente*, o fármaco hidrofóbico é dissolvido em uma fase orgânica (FO) juntamente com o polímero, e posteriormente uma fase aquosa contendo tensoativo é adicionada sobre a FO sob alta agitação, formando assim uma emulsão O/A. Finalmente, o solvente orgânico é evaporado e o polímero então se precipita para a formação das nanoesferas (RAO; GECKELER, 2011).

O poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero de álcool vinílico muito usado na fase aquosa para formação da emulsão O/A. Possui solubilidade em água e em alguns solventes orgânicos, além de ser usado em diferentes indústrias por suas propriedades, como agente surfactante, capacidade de formar filmes flexíveis e elásticos, uso em resinas têxteis, adesivos, e largamente na indústria cosmética (HAWLEY, 2007).

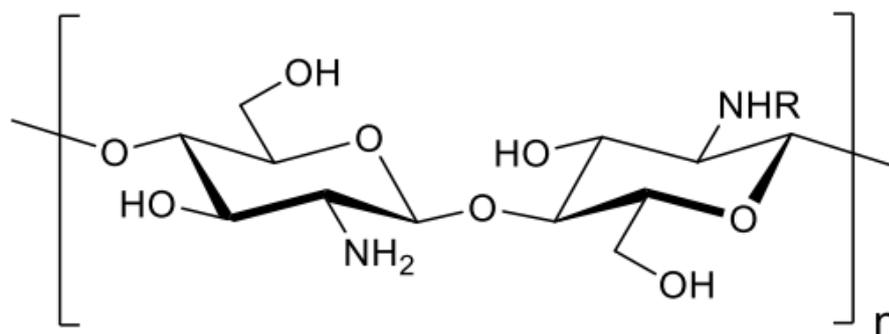
Por meio da modificação de superfície das nanopartículas de PLGA, é possível a modulação de sua estabilidade, perfil de liberação do fármaco, tempo de circulação sanguínea e reconhecimento biológico, com conseqüente incremento da eficácia do agente encapsulado (SAH et al., 2013). A esse respeito, existem relatos de que o revestimento dessas nanoestruturas com a quitosana é capaz de propiciar os benefícios descritos (ARAFI et al., 2020; CHATZITAKI et al., 2020; DANDAMUDI et al., 2021). Especificamente para o propósito desse trabalho,

a quitosana, por possuir atividade anti-inflamatória (RAJITHA et al., 2016) pode ser capaz de incrementar a eficácia e permitir a redução da dose da DEX, com consequente redução de seus efeitos colaterais característicos.

## 2.5 QUITOSANA

A quitosana (QT) (Figura 6) é obtida a partir da desacetilação da quitina, um polímero encontrado em carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de alguns fungos (GARG *et al.*, 2019). Em relação à estrutura química, é formada por unidades de  $\beta$ -(1,4) 2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1,4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino primário e secundário e hidroxilas. Esse polímero é solúvel em meios aquosos ligeiramente ácidos (pH<6,5) em decorrência da protonação dos seus grupos aminos, o que torna as moléculas de QT carregadas positivamente. Essa natureza catiônica fornece a propriedade de mucoadesividade à QT, devido à forte interação eletrostática com componentes do muco carregados negativamente, como a mucina (TAVARES et al., 2020; WAYS; LAU; KHUTORYANSKIY, 2018).

Figura 6 - Estrutura química da quitosana



Fonte: ISLAN; FERRO (2016)

A QT apresenta as características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e alergenicidade. Além disso, possui atividades anti-inflamatória, cicatrizante, antibacteriana e antioxidante, o que faz com que seja de grande interesse para utilização nas áreas médica, farmacêutica, odontológica e cosmética (RAWAL et al., 2017).

A respeito da atividade anti-inflamatória, Chang e colaboradores (2019) observaram inibição significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e de óxido nítrico quando da exposição de macrófagos estimulados por LPS à QT de baixa massa molar. Nessa perspectiva, a literatura aponta que o potencial anti-inflamatório desse polímero está ligado à sua capacidade de influenciar a polarização dos macrófagos de seu estado M1 (pró-inflamatório) para M2 (anti-inflamatório) e de induzir uma resposta de IFN tipo I, o que leva à liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-1Ra e IL-10. Além disso, a inibição dos níveis de TNF- $\alpha$  também pode estar relacionada a uma alteração de M1 para M2 (JHUNDOO et al., 2020).

Pelo exposto, é possível que a inclusão da QT na formulação possa incrementar a atividade da DEX, possibilitando a redução de sua dose e dos efeitos colaterais. Ademais, como já descrito, a modificação da superfície das nanopartículas de PLGA com QT poderá permitir incrementar a estabilidade e o tempo de circulação sistêmica, além de propiciar maior controle na liberação da DEX encapsulada. A esse respeito, estudos da literatura têm mostrado os benefícios do revestimento de NP de PLGA com QT no que diz respeito ao incremento da eficácia, aumento da estabilidade e modulação da liberação de diferentes fármacos (AL-NEMRAWI et al., 2018; LU et al., 2019; AHMAD et al., 2020; AZZAZY et al., 2021; DANDAMUDI et al., 2021), incluindo a dexametasona (CHRONOPOULOU et al., 2013). Nesse caso, utilizando a DEX como fármaco modelo, os autores desenvolveram nanopartículas de PLGA-QT objetivando o incremento da internalização celular da formulação em linhagens de hepatócitos (C3A) e fibroblastos (3T6). Como resultado, o grupo constatou que as nanopartículas propiciaram a liberação sustentada da DEX e permitiram o aumento da retenção desse fármaco no interior das células. Além disso, os pesquisadores evidenciaram que o revestimento com a QT foi capaz de contribuir para uma maior estabilidade das nanopartículas. Diante dos benefícios apresentados, os autores concluíram que a formulação desenvolvida pode ser considerada uma ferramenta promissora para a liberação de fármacos visando o tratamento de diversas terapias.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é desenvolver nanopartículas de PLGA revestidas com quitosana para administração intravenosa da dexametasona visando ao tratamento da SRAG relacionada à COVID-19

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

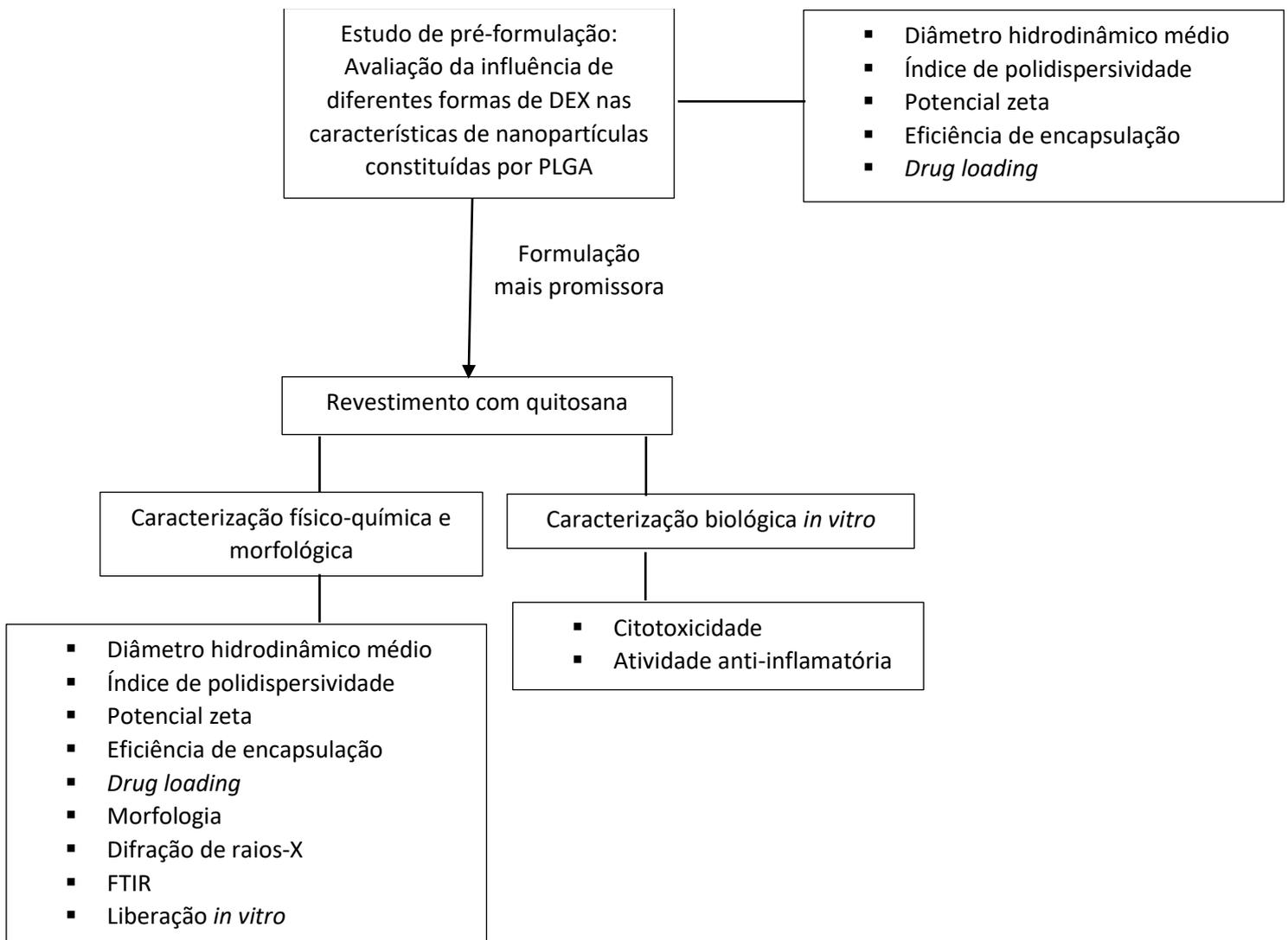
- Avaliar a influência de diferentes formas de dexametasona (fosfato dissódico ou acetato) nas características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação) de nanopartículas constituídas por PLGA;
- Realizar o revestimento das nanopartículas consideradas mais promissoras com o polímero quitosana;
- Avaliar as características físico-químicas das nanopartículas revestidas através de análises de diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, difração de raios X e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das formulações de nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade das formulações de nanopartículas frente à linhagem celular de macrófagos murinos (J774A.1);
- Investigar, *in vitro*, o efeito do fármaco nanoestruturado na inibição de mediadores inflamatórios.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

O fluxograma abaixo (Figura 7) foi organizado para melhor entendimento da estratégia experimental adotada para o atingimento dos objetivos do trabalho:

Figura 7 - Fluxograma da estratégia experimental do estudo



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 4.2 MATERIAIS

A DEXAc foi adquirida do fabricante Zhejiang Xianju Pharmaceutical Co. (China). O PLGA (50:50, massa molar: 30.000-60.000 g/mol) e a QT (baixa massa molar: 50.000-190.000 g/mol; grau de desacetilação: 75-85%) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O FDEX foi gentilmente cedido pelo Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. O poli (álcool vinílico) (PVA) foi comprado da Alianza Indústria e Comércio de Cosméticos (São Paulo, SP, Brasil). O ácido acético glacial foi obtido da All Chemistry (São Paulo, SP, Brasil), o acetato de etila P.A obtido da Anidrol (Diadema, SP, Brasil), o metanol grau HPLC da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, SP, Brasil), e o ácido fórmico 85% P.A da Labsynth (Diadema, SP, Brasil). O meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), a solução de antibiótico penicilina/estreptomicina e o soro bovino fetal foram adquiridos da Gibco (Waltham, MA, EUA). O Azul de Trypan foi adquirido da LGC Biotecnologia (Cotia, SP, Brasil) e o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi obtido da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O lipopolissacarídeo (LPS), as interleucinas 6 (IL-6) e 12 (IL-12), o interferon gama (INF- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) foram obtidos da Becton & Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA).

## 4.3 MÉTODOS

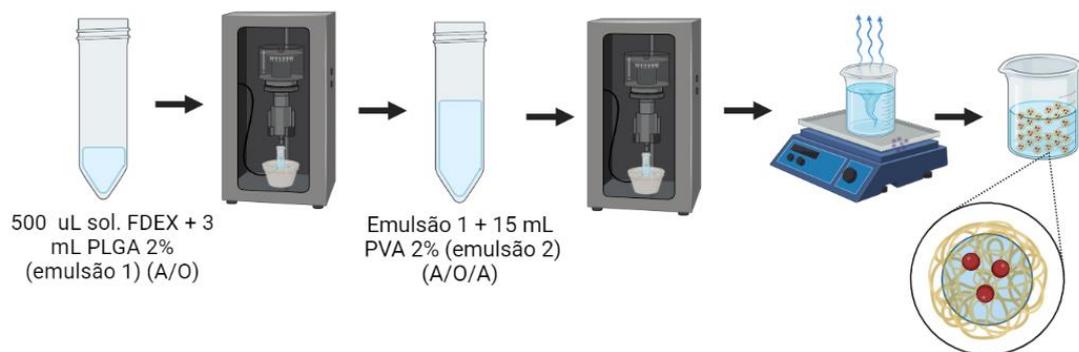
### 4.3.1 Desenvolvimento das nanopartículas de PLGA contendo FDEX e DEXAc

Para o desenvolvimento das nanopartículas, foram adotadas duas estratégias distintas com o intuito de investigarmos a influência de diferentes formas da dexametasona nas características físico-químicas das nanopartículas.

Em um primeiro momento, foi utilizado o FDEX para a síntese das NP (NP-FDEX) (n=3). Devido à sua característica hidrossolúvel, foi empregada a técnica da dupla emulsificação-evaporação de solvente para a formação das nanopartículas (ISMAIL et al., 2019). Para isso, 5 mg de FDEX foram solubilizados em 500  $\mu$ L de água purificada (fase aquosa interna). Esta solução foi então adicionada à 3 mL de solução de PLGA (2% p/v) preparada em acetato de etila (fase orgânica) e levada a processador ultrassônico por 30 segundos a 90% de amplitude em banho de gelo para a formação da primeira emulsão (A/O). Posteriormente, uma fase aquosa externa constituída de 15 mL de solução de PVA; 2% (p/v) foi vertida sobre a primeira emulsão e a mistura foi submetida a processador ultrassônico por 2 minutos

a uma amplitude de 90% em banho de gelo. Finalmente, a emulsão A/O/A formada foi agitada *overnight* sob agitação (400 rpm) para a evaporação do solvente orgânico e formação das nanopartículas (ISMAIL et al., 2019) (Figura 8). Para fins de comparação, NP sem a adição do fármaco (nanopartículas “brancas”) (NP-Bd) também foram sintetizadas (n=3).

Figura 8 - Síntese das NP contendo FDEX pelo método da dupla emulsificação-  
evaporação de solvente

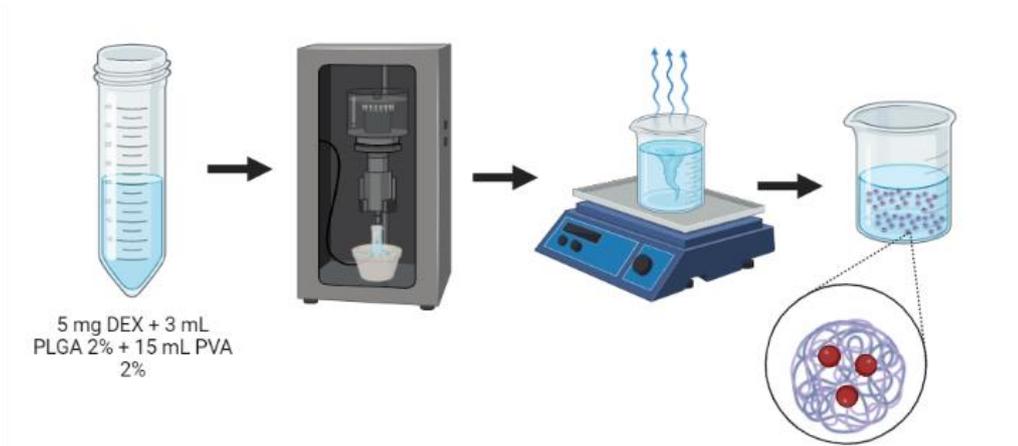


Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Paralelamente, foi utilizado o acetato de dexametasona (DEXAc), forma menos hidrossolúvel do fármaco, para o desenvolvimento das nanopartículas. As NP-DEXAc (n=3) foram desenvolvidas utilizando o método de emulsificação-  
evaporação de solvente, descrito pela primeira vez por Bodmeier e McGinity em 1986. Para isso, 5 mg de acetato de dexametasona foram solubilizados em 3 mL de solução de PLGA (2% p/v) preparada em acetato de etila (fase orgânica). Posteriormente, a fase aquosa constituída de 15 mL de solução de PVA; 2% (p/v) foi vertida sobre a fase orgânica e a mistura foi submetida a processador ultrassônico por 2 minutos a uma amplitude de 90% em banho de gelo. Finalmente, a emulsão O/A formada foi agitada *overnight* sob agitação (400 rpm) para a evaporação do solvente orgânico e formação das nanopartículas (adaptado de ISMAIL et al., 2019) (Figura 9). Para fins de comparação, nanopartículas “brancas” (sem a adição do

fármaco) (NP-Bs) foram preparadas (n=3) pela mesma técnica, com a omissão da adição da DEXAc.

Figura 9 - Síntese das NP pelo método de emulsificação-evaporação de solvente



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

#### 4.3.2 Caracterização das NP-FDEX e NP-DEXAc

##### 4.3.2.1 Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

O DHm e o Pdl foram avaliados empregando-se a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) utilizando um ângulo de incidência do *laser* em relação à amostra de  $173^\circ$  e índice de refração 1,333. O PZ foi determinado por meio da avaliação da mobilidade eletroforética. Para as leituras, as amostras foram diluídas (1:400 v/v) em água ultrapura (Merck Millipore Direct-Q® 3 UV). As determinações foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). As nanopartículas (NP-FDEX e NP-DEXAc) foram analisadas em triplicata. Para fins de comparação, as nanopartículas brancas (NP-Bd e NP-Bs) foram também avaliadas.

##### 4.3.2.2 Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)

A eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas (NP-FDEX e NP-DEXAc; n=3) foi determinada indiretamente. Para tanto, as amostras foram submetidas à centrifugação (5000 rpm por 60 minutos) (ANWER et al., 2016). Os sobrenadantes foram retirados para a quantificação dos fármacos e filtrados em filtro

PVDF de 0,45 µm acoplado à seringa. Os pellets resultantes foram lavados três vezes com água ultrapura para retirada do excesso de PVA restante (ISMAIL et al., 2019). Posteriormente, foram liofilizados (Liofilizador LJJ 04 – JJ Científica) e armazenados em refrigerador Consul (2°C - 8°C) para análises futuras.

Para a construção das curvas analíticas, o FDEX foi diluído em água ultrapura (MiliQ), enquanto o DEXAc foi diluído em etanol 70° GL nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL, em triplicata. A quantificação dos fármacos foi realizada por CLAE utilizando-se aparelho modular da marca Waters e2695 ALLIANCE, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo 2998. Os dados coletados foram tratados e analisados utilizando o *software* Empower 3. Para a análise, foi empregada a técnica de cromatografia de fase reversa utilizando coluna C18 modelo XBridge (Waters) de 250 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm. A fase móvel foi constituída por uma combinação de metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel A) e água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel B) de maneira isocrática na proporção de 65:35. A vazão utilizada durante a análise foi de 1 mL/minuto e a coluna cromatográfica foi mantida em forno de aquecimento a 30 °C. Os picos foram detectados através de detector de arranjo de diodos em comprimentos de onda 244 nm (MARTÍN-SABROSO et al., 2013).

A EE foi calculada de acordo com a seguinte equação:

Equação 1 – Cálculo da EE para NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT

$$EE(\%) = \frac{\text{Massa total de fármaco adicionado} - \text{quantidade de fármaco encontrado}}{\text{Massa total de fármaco adicionado}} \times 100$$

Para o cálculo da carga de fármaco (*drug loading*) foi utilizada a seguinte equação:

Equação 2 – Cálculo de DL para NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT

$$DL(\%) = \frac{\text{Massa de fármaco encapsulada}}{\text{Massa da matriz polimérica}}$$

#### 4.3.3 Revestimento das nanopartículas de PLGA com QT

Para o revestimento das nanopartículas consideradas mais promissoras (contendo ou não o fármaco - NP-DEXAc-QT e NP-Bs-QT; n=3) procedeu-se,

primeiramente, a solubilização da QT em solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação (600 rpm) por 1 hora, de modo a obter-se solução a 2 mg/mL. Posteriormente, o revestimento foi realizado por meio de gotejamento (40 gotas/minuto) da solução de QT (2,5 mL) sobre a suspensão de nanopartículas (5,0 mL) com auxílio de seringa de 10 mL e agulha 25mm x 0,7mm. Finalmente, o sistema foi mantido sob agitação (500 rpm) por 1 hora à temperatura ambiente (SILVA et al., 2020).

#### **4.3.4 Caracterização das nanopartículas revestidas**

##### *4.3.4.1 Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)*

O DHm e o Pdl foram avaliados empregando-se a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. As nanopartículas (NP-DEXAc-QT e NP-Bs-QT) foram avaliadas em triplicata.

##### *4.3.4.2 Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)*

A eficiência de encapsulação da DEXAc nas nanopartículas revestidas por QT (n=3) foi determinada indiretamente, por meio do método de ultrafiltração-centrifugação conforme descrito no item 4.3.2.2. Nesse sentido, além da determinação da EE, o DL também foi calculado.

##### *4.3.4.3 Morfologia*

Com o intuito de avaliarmos possíveis alterações na morfologia das nanopartículas de PLGA após o revestimento com QT, as formulações NP-Bs e NP-Bs-QT foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram montadas em suportes de metal usando fita adesiva dupla face de carbono, metalizadas a vácuo com filme de ouro e lidas diretamente por microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM-6390-LV na Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC/FIOCRUZ.

#### 4.3.4.4 Difração de raios X (DRX)

Para a determinação da fase cristalina das amostras, foram analisados os padrões de difração de raios X da DEXAc livre, dos constituintes das nanopartículas isolados (PLGA, PVA e QT), das nanopartículas (NP-Bs, NP-DEXAc, NP-Bs-QT e NP-DEXAc-QT). A difratometria foi realizada utilizando-se um difratômetro de raios X modelo Bruker AXS D8 ADVANCE e os padrões de difração de raios X foram obtidos por faixa de ângulo de 5 - 60°, passo angular de 0,02° e tempo de incidência de 0,1s. Os dados foram registrados em detector a uma distância de 100 mm, usando radiação de tubo de cobalto (0.179026 nm). Os experimentos foram realizados na temperatura ambiente, no Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense (Niterói - RJ).

#### 4.3.4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR/ATR)

As NP liofilizadas (NP-Bs; NP-Bs-QT; NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT), seus componentes isolados e uma mistura física desses componentes foram analisados por FTIR/ATR para a caracterização de seus grupos funcionais e investigação da encapsulação do fármaco. Tais espectros, abrangendo a região de 4000-500 cm<sup>-1</sup>, foram obtidos no Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (Niterói-RJ), usando espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS50 FT-IR, com resolução de 4cm<sup>-1</sup> e 32 scans/minuto. A eliminação da interferência de fundo foi realizada antes de cada análise das amostras.

#### 4.3.4.6 Avaliação do perfil de liberação

O estudo da liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas foi realizado por método da difusão através de membrana de diálise (membrana de acetato de celulose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com o método proposto por Campos e colaboradores (2013), com modificações. As nanopartículas (NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT; n=3) (1,0 mL) foram introduzidas no interior das membranas de diálise Sigma Aldrich 12.000 Da e mantidas em frascos schott (50 mL) contendo 20 mL de tampão fosfato pH 7,4, garantindo-se a condição *sink*. Durante todo o experimento, a temperatura foi mantida em 37 ± 1°C, e a velocidade de agitação em 70 rpm. Alíquotas (1mL) foram retiradas nos tempos 0, 1h, 2h, 4h,

8h, 12h e 24h com reposição imediata de uma quantidade idêntica do meio fresco à 37°C. Após diluições adequadas, as amostras foram quantificadas por CLAE nas condições previamente descritas. Os resultados foram expressos em porcentagem de fármaco liberado ao longo do tempo.

#### *4.3.4.7 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas*

Potenciais efeitos citotóxicos das NP foram avaliados através do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Inicialmente, células de linhagem de macrófagos murinos J774A.1 foram cultivadas em garrafas de cultura até atingirem a confluência desejada (aproximadamente 80% de confluência), em seguida estas células foram raspadas das garrafas, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. Após 24 horas de incubação (37°C, 5%CO<sub>2</sub>), 100 uL das amostras (DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT) foram adicionadas aos poços, juntamente com 100 uL de meio RPMI obtendo as concentrações finais de 400; 200; 100; 50 e 25 ug/mL referentes ao fármaco. O controle negativo foi constituído por poços contendo somente meio de cultura, enquanto o controle do solvente utilizado foi constituído por poços contendo solução de álcool absoluto (2% v/v). Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata. Após incubação por 48h, o sobrenadante foi retirado e, 100 uL da solução de MTT foi adicionada aos poços. Seguiu-se então nova incubação por 2 h 30 min. Ao final desse período, o sobrenadante foi removido para a adição de 100 uL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan. Finalmente, as placas passaram por leitura em leitor de placas em comprimento de onda de 595 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com as diluições em estudo foi realizado a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade. O ensaio foi realizado no Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora – Minas Gerais.

#### *4.3.4.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro*

Para determinar a atividade anti-inflamatória das NPs, células J774A.1 foram cultivadas e plaqueadas conforme previamente descrito. Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi retirado e as células foram estimuladas com 1µg/ml de LPS de *Escherichia coli*, para avaliação da produção de citocinas, ou a combinação de 1µg/ml de LPS e 0,9ng/mL de IFN- $\gamma$ , para avaliação da produção de NO. Nova incubação foi realizada por uma hora, quando então as amostras (DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT) foram adicionadas aos poços (n=4) na concentração de 200 ug/mL (referente ao fármaco). Como controle, foram utilizados poços contendo células estimuladas com LPS ou LPS + IFN- $\gamma$ , porém não tratadas com as amostras. Além disso, poços cujas células não foram estimuladas e nem tratadas também foram incluídos no experimento. Após 48 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi coletado para dosagem de óxido nítrico e citocinas, conforme descrito a seguir. Os ensaios foram realizados no Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora – Minas Gerais

#### 4.3.4.9 *Dosagem de Óxido Nítrico*

Como o óxido nítrico possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical foi mensurada pela formação do nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), através do método de Griess (Wang et al, 2018). Sobrenadantes das culturas celulares foram colocados em placas de 96 poços (50µl/poço) e misturados com 50 µl de reagente de Griess (1% sulphanilamide/0.1% *N*-(1-naphtyl) - ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Após 5 minutos de incubação, o produto da reação foi lido em leitor de microplaca em comprimento de onda de 550 nm. A concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi obtida por comparação com uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de NaNO<sub>2</sub>.

#### 4.3.4.10 *Dosagem de Citocinas*

A dosagem das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes das culturas celulares foi realizada pelo método de ELISA do tipo sanduíche utilizando os kits comerciais (Becton e Dickinson Company) de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 4.3.5 **Análises estatísticas**

Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (One Way ANOVA) /Dunnett, considerando-se o nível de significância de 0,05. A comparação entre as amostras foi feita através do teste de significância de Tukey em programa GraphPad Prism 9.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação nanoestruturada visando ao controle da liberação, aumento da eficácia e redução dos efeitos colaterais decorrentes do uso sistêmico da DEX quando de sua utilização para o tratamento da SRAG. Para tanto, foram desenvolvidas nanopartículas constituídas por PLGA em virtude das características de baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade desse polímero (RAWAL et al., 2017). Além disso, como forma de incrementar a atividade anti-inflamatória da DEX, propusemos a modificação de superfície das nanopartículas com a quitosana. Esse polímero catiônico apresenta diversas propriedades biológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2020). Dessa forma, nossa teoria é a de que a atividade sinérgica entre o fármaco e a quitosana possa permitir a redução da dose de DEX administrada, o que poderia refletir na redução de efeitos indesejáveis característicos desse corticóide. Nesse sentido, para o preparo das nanopartículas, optamos por empregar uma dose inicial (5 mg) menor que aquela utilizada atualmente na prática clínica (6 mg). Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO FDEX E DEXAc

#### 5.1.1 Diâmetro hidrodinâmico médio (Dhm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

Como já descrito, avaliamos inicialmente a influência de diferentes formas de DEX nas propriedades físico-químicas das NP. Abaixo estão apresentados os resultados de DHm, Pdl e PZ para as formulações desenvolvidas.

Tabela 1 - Valores\* de DHm, Pdl e PZ para as diferentes formulações de nanopartículas contendo ou não FDEX e DEXAc\*\*

Formulação	DHm (nm)	Pdl	PZ (mV)
NP-Bd	193,1 ± 6,9 <sup>a</sup>	0,084 ± 0,00 <sup>c</sup>	-5,18 ± 1,2 <sup>e</sup>
NP-FDEX	197,1 ± 1,9 <sup>a</sup>	0,095 ± 0,01 <sup>c</sup>	-5,88 ± 1,6 <sup>e</sup>
NP-Bs	222,8 ± 7,5 <sup>b</sup>	0,099 ± 0,01 <sup>d</sup>	-10,6 ± 2,8 <sup>f</sup>
NP-DEXAc	207,3 ± 6,7 <sup>b</sup>	0,107 ± 0,0 <sup>d</sup>	-11,83 ± 1,4 <sup>f</sup>

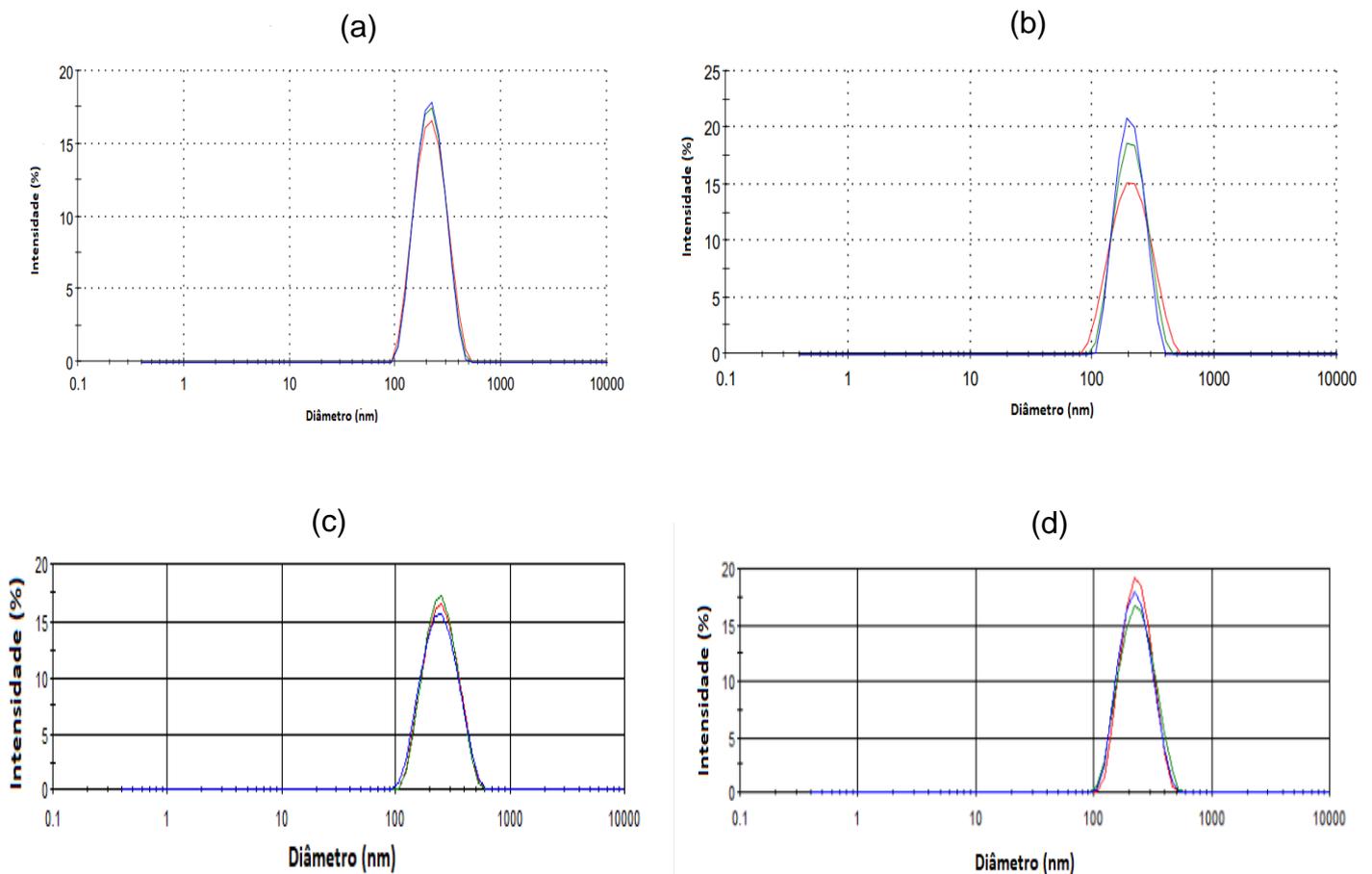
\*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

\*\*Letras iguais representam valores sem diferença estatisticamente significativa (ANOVA)

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Os resultados referentes ao DHm para as diferentes formulações estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, tanto para o método de emulsificação-evaporação de solvente (KIZILBEY, 2019), quanto para o método de dupla emulsificação-evaporação de solvente (RIBEIRO et al, 2021). Além disso, os valores obtidos para as NP-Bd e NP-FDEX não diferem estatisticamente, assim como para as formulações NP-Bs e NP-DEXAc. Nesse sentido, comportamentos semelhantes foram relatados em outros estudos nos quais diferentes formas da DEX foram incorporadas em nanopartículas constituídas por PLGA e PVA (RYU et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021). Os gráficos de distribuição de tamanho das nanopartículas desenvolvidas são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Distribuição de tamanho das NP por intensidade (n=3) (a) NP-Bd; (b) NP-FDEX; (c) NP-Bs; (d) NP-DEXAc



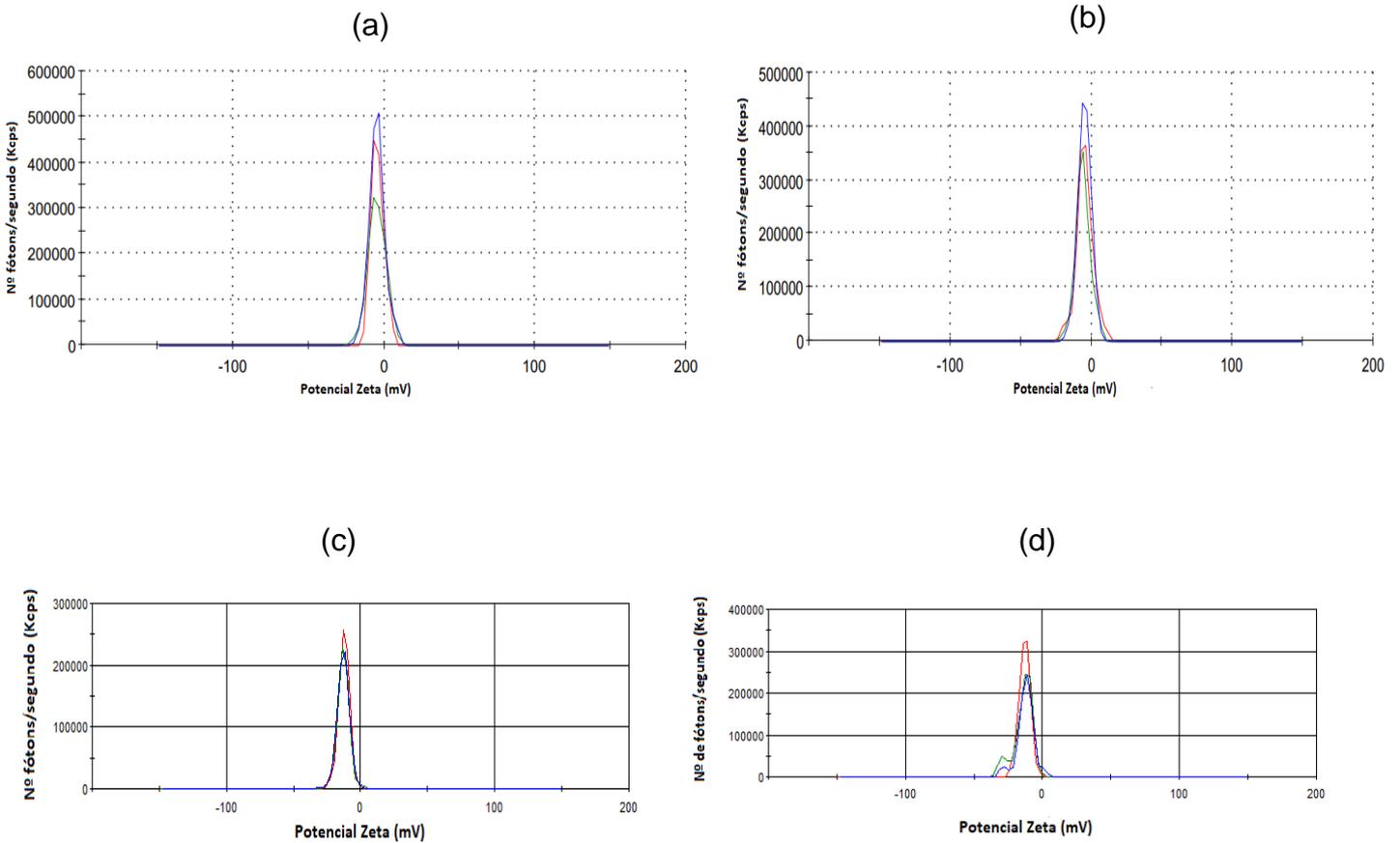
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Em relação ao Pdl, todas as formulações apresentam-se como sistemas monodispersos, uma vez que possuem valores menores que 0,3 (LU; LV; LE, 2019). Uma vez que esse parâmetro está intimamente ligado à estabilidade do sistema coloidal, esses dados são importantes indicativos de sistemas estáveis (AMARAL et al., 2019).

O PZ é um parâmetro importante para o reconhecimento e distribuição dos nanossistemas após sua administração por diferentes vias de administração, além de um indicativo da sua estabilidade. Nesse caso, NP com valores de PZ elevados (em módulo) tendem a se repelir e, por consequência, a dispersão apresentará maior possibilidade de apresentar estabilidade pela diminuição da agregação das partículas (SILVA et al., 2020). Sob essa perspectiva, valores de PZ compreendidos entre  $\pm 0-10$  mV são característicos de sistemas altamente instáveis. Já as dispersões apresentando PZ na faixa de  $\pm 10-20$  mV são consideradas relativamente estáveis. Por sua vez, valores entre  $\pm 20-30$  mV e  $> \pm 30$  mV são típicos de formulações moderadamente estáveis e altamente estáveis, respectivamente (ARDANI et al., 2017).

Para todas as nanopartículas, valores de PZ negativos foram encontrados (Tabela 1). Esses resultados podem ser explicados devido à natureza do PLGA, um polímero que contém grupos terminais com carboxilas livres, conferindo natureza negativa às NP (KHANAL et al., 2016). Nesse sentido, nossos resultados são semelhantes aos encontrados na literatura (KHANAL et al., 2016; KIM et al., 2021; RIBEIRO et al., 2021). Por meio dos dados obtidos, observamos que não houve diferença estatística entre os valores de PZ para as NP-Bs e as NP-DEXAc ( $-10,6 \pm 2,8$  mV e  $-11,8 \pm 1,4$  mV, respectivamente - Tabela 1). De modo semelhante, não houve diferença estatística entre os valores de PZ para as NP-Bd e as NP-FDEX ( $-5,18 \pm 1,2$  e  $-5,88 \pm 1,6$ , respectivamente - Tabela 1). Esses dados podem indicar que o fármaco, em suas diferentes formas (FDEX e DEXAc), esteja localizado principalmente no interior da matriz polimérica. Ademais, é importante mencionar que os valores de PZ dessas amostras sugerem que os sistemas possuem baixa estabilidade eletrostática.

Figura 11- Distribuição de PZ das NP (n=3) (a) NP-Bd; (b) NP-FDEX; (c) NP-Bs; (d) NP-DEXAc



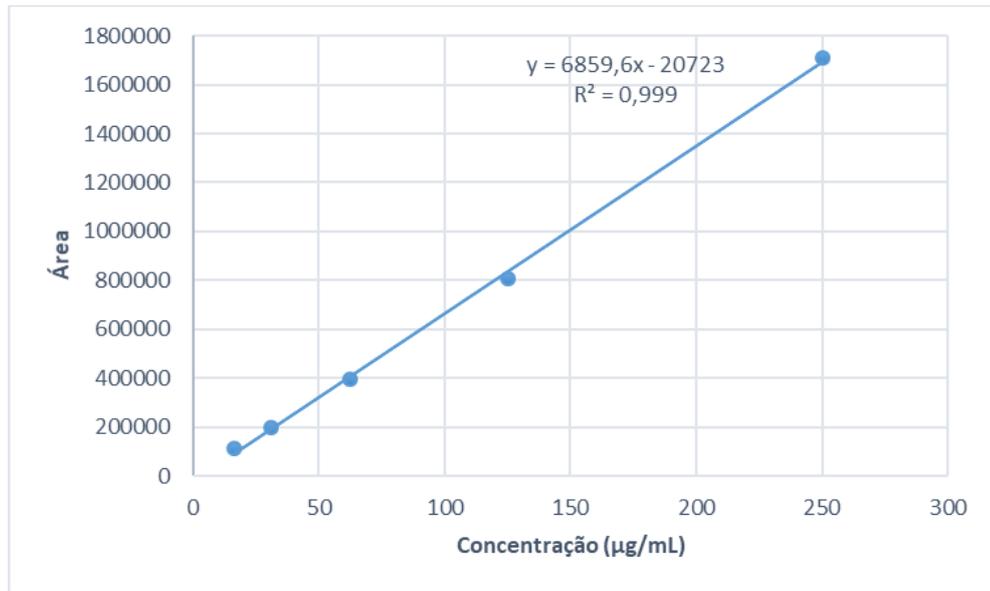
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 5.1.2 Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)

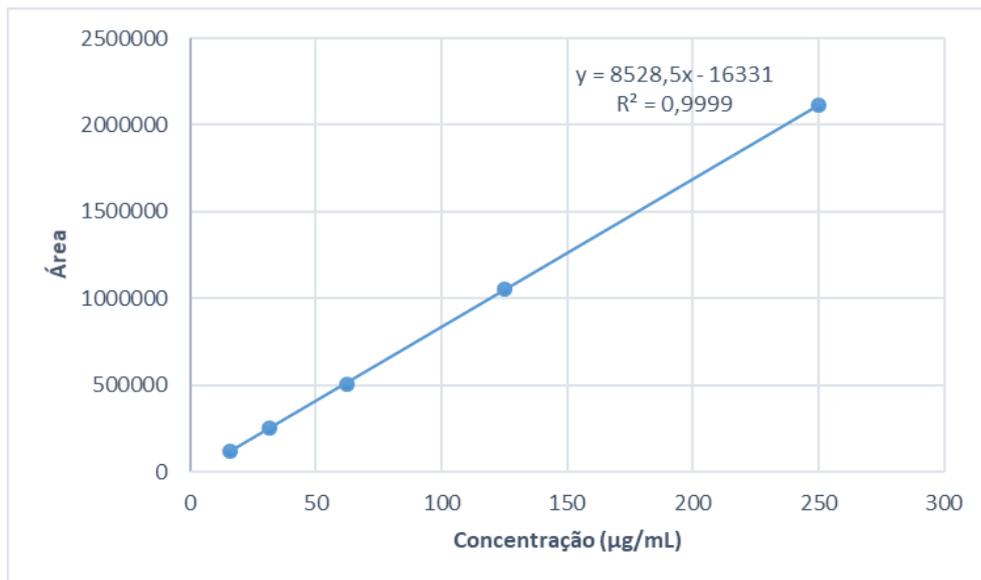
Para a avaliação da EE da FDEX e DEXAc nas NP, a quantificação do fármaco não encapsulado foi realizada empregando-se a técnica de CLAE. Para isso, foram construídas, primeiramente, curvas analíticas nas concentrações de 250  $\mu\text{g/mL}$ ; 125  $\mu\text{g/mL}$ ; 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 31,25  $\mu\text{g/mL}$  e 15,62  $\mu\text{g/mL}$  de FDEX ou DEXAc. A necessidade da construção de duas curvas se dá pela diferença de solubilidade entre as formas do fármaco, sendo FDEX hidrossolúvel e DEXAc hidrofóbica, como mencionado anteriormente. Assim, a curva analítica para avaliação da EE das NP-FDEX foi construída em água ultrapura, enquanto aquela para avaliação da EE das NP-DEXAc foi construída em etanol 70 $^{\circ}\text{GL}$ . As curvas, as equações das retas e os coeficientes de determinação são mostrados na Figura 12.

Figura 12 - Curvas analíticas para (a) FDEX e (b) DEXAc nas concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; 125  $\mu\text{g/mL}$ ; 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 31,25  $\mu\text{g/mL}$  e 15,62  $\mu\text{g/mL}$ .

(a)



(b)

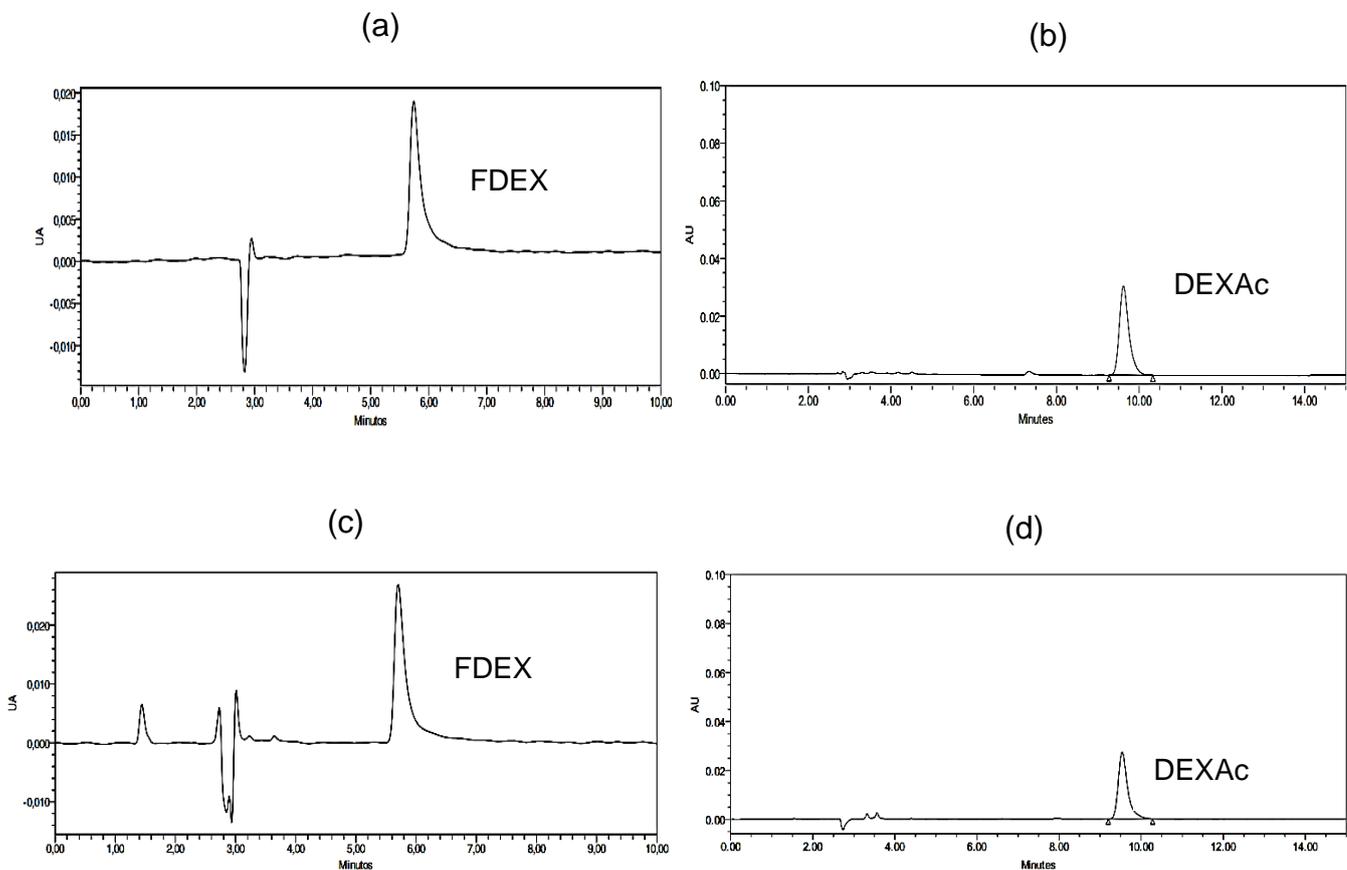


Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Em relação aos cromatogramas, obtivemos um pico bem resolvido em 244 nm, com tempo de retenção próximo a 6 minutos para FDEX (Figura 13a) e próximo a 10 minutos para DEXAc (Figura 13b). Esta diferença ocorre devido às interações entre a fase estacionária, a fase móvel e o fármaco, que, por se apresentar sob formas diferentes, interage também de maneira distinta. Ao utilizar cromatografia de fase reversa, a FDEX, por ser hidrofílica, interage mais fortemente com a fase móvel e por isso desloca-se mais rapidamente. O contrário é observado no cromatograma

referente à DEXAc, forma do fármaco de natureza hidrofóbica, o qual se liga de maneira forte à fase estacionária, aumentando o tempo de retenção. Estes mesmos comportamentos foram observados nos cromatogramas referente aos sobrenadantes das nanopartículas (Figuras 14c e 14d)

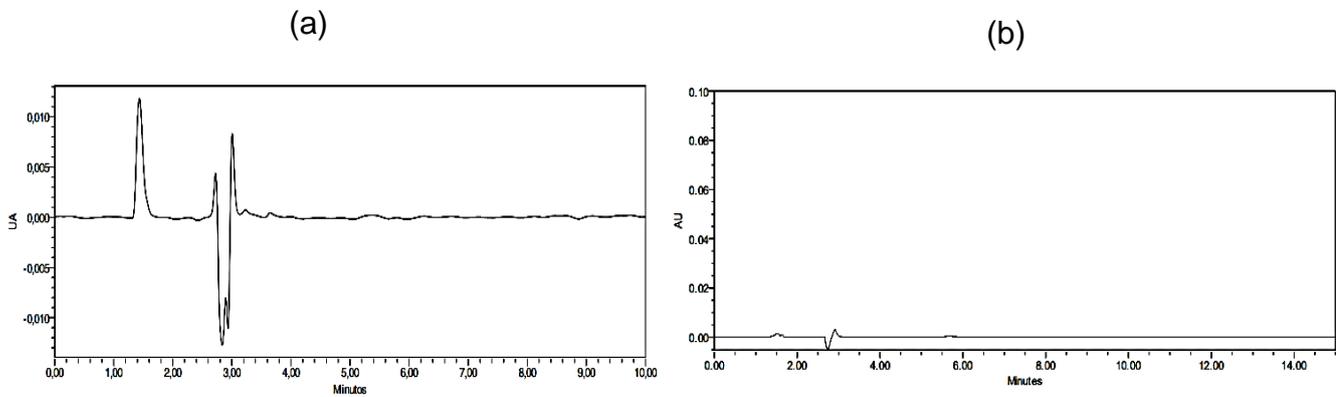
Figura 13 - Cromatogramas referentes ao padrão de FDEX (a) e DEXAc à 62,5 µg/mL (ponto central das curvas analíticas) (b); ao sobrenadante das NP-FDEX (c) e ao sobrenadante das NP-DEXAc (d). Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Ressalta-se ainda que não houve interferência dos constituintes das formulações na detecção da DFEX e DEXAc, conforme demonstrado nos cromatogramas da Figura 14:

Figura 14 - Cromatogramas referentes ao sobrenadante das NP-Bd (a) e NP-Bs (b). Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5 $\mu$ L, tempo de eluição de 15 minutos. Detecção dos picos em 244nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de EE e DL para as NP-FDEX e NP-DEXAc:

Tabela 2 - Valores\* de EE e DL para as nanopartículas desenvolvidas (n=3)

	NP-FDEX			NP-DEXAc		
	EE (%)	m (mg)	DL (%)	EE (%)	m (mg)	DL (%)
Média $\pm$ DP	19,8 $\pm$ 15,68	0,99 $\pm$ 0,78	1,65 $\pm$ 1,30	83,7 $\pm$ 1,04	4,18 $\pm$ 0,05	6,96 $\pm$ 0,09

m = massa de fármaco nas nanopartículas.

\*Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3)

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Nota-se uma diferença discrepante entre os valores de EE e DL encontrados para NP-FDEX e NP-DEXAc, indicativo de que a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do fármaco apresentou papel essencial na encapsulação do fármaco.

Para as NP-FDEX, obtivemos baixo valor de EE, com elevada variabilidade entre os lotes, o que é constatado pelo valor do desvio padrão. Além disso, o DL, calculado tendo como base a massa total de fármaco encapsulado e a massa da matriz polimérica das nanopartículas, foi igualmente baixo. Esse comportamento pode ser devido à tendência do fármaco, altamente hidrossolúvel, em se difundir da fase interna aquosa para a fase externa aquosa durante o processo de formação da

emulsão múltipla. De fato, a literatura aponta que essa é uma das desvantagens do método de dupla emulsificação-evaporação de solvente (ASTETE; SABLIOV, 2006; OPERTI et al., 2021).

Por outro lado, para as NP-DEXAc, houve uma elevada EE (aproximadamente 84%), o que pode sugerir que as condições empregadas no método de emulsificação-evaporação do solvente foram eficientes para a incorporação da DEXAc às nanopartículas. Esse resultado é semelhante ao relatado em outros estudos os quais empregaram a mesma metodologia. A esse respeito, Ali e colaboradores (2013) encontraram valor igual a 89%, enquanto Vazquez e co-autores alcançaram porcentagem entre 75-85% para a encapsulação da DEXAc em nanopartículas constituídas por PLGA e PVA. É importante mencionar que o método escolhido para a preparação dessa formulação de nanopartículas é indicado quando da utilização de fármacos hidrofóbicos (HATHOUT *et al.*, 2021), caso do DEXAc. Nesse contexto, a associação do fármaco à matriz polimérica pode ser alcançada por meio de interações hidrofóbicas e/ou devido à miscibilidade do fármaco no polímero (BUDHIAN *et al.*, 2007).

Por fim, o valor de DL foi compatível com os observados em estudo prévio, onde os valores variaram de 4,59 a 6,42% quando da encapsulação da DEXAc em nanopartículas de PLGA (LU; LV; LE, 2019).

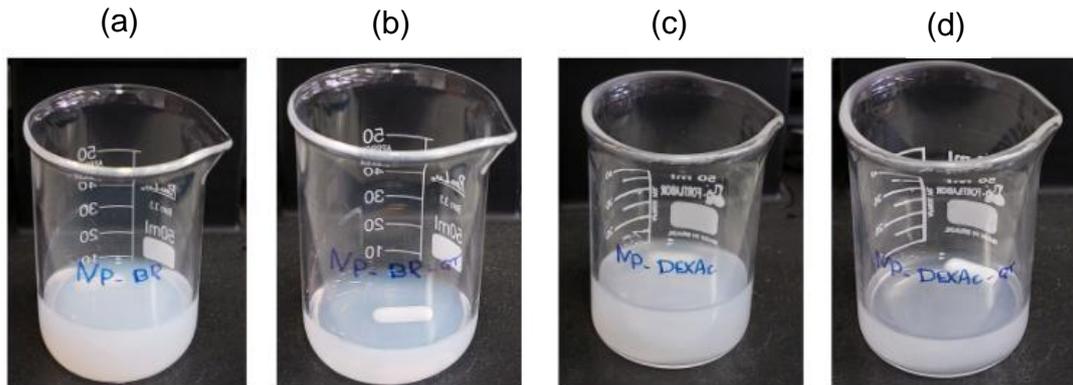
Diante dos resultados obtidos, sobretudo em relação à eficiência de incorporação do fármaco nas nanopartículas, optamos por prosseguir o trabalho com as NP-DEXAc. Assim, essa formulação foi revestida com QT (NP-DEXAc-QT) e os resultados referentes à sua caracterização são descritos a seguir. Para fins de comparação, nanopartículas brancas foram igualmente revestidas (NP-Bs-QT) e caracterizadas. Além disso, as NP-Bs e as NP-DEXAc também foram incluídas nos ensaios seguintes.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS

Em relação às características macroscópicas, todas as formulações preparadas apresentaram-se homogêneas e com aspecto leitoso típico, conforme Figura 15. As formulações foram caracterizadas em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade, potencial zeta, eficiência de

encapsulação, *drug loading* e morfologia, bem como por meio das técnicas de difração de raios X e FTIR, perfil de liberação, citotoxicidade e avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*. Os resultados obtidos estão descritos abaixo.

Figura 15 - Aspecto das formulações finais de (a) NP-Bs; (b) NP-Bs-QT; (c) NP-DEXAc; (d) NP-DEXAc-QT



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 5.2.1 Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

Na Tabela 3 estão representados os resultados referentes ao DHm, Pdl e PZ para as NP-Bs-QT e para as NP-DEXAc-QT.

Tabela 3 - Valores\* de DHm, Pdl e PZ para as NP revestidas com QT

Formulações	DHm (nm)	Pdl	PZ (mV)
NP-Bs-QT	261,5 ± 12,9 <sup>a</sup>	0,190 ± 0,02	+23,0 ± 1,8 <sup>b</sup>
NP-DEXAc-QT	264,4 ± 4,4 <sup>a</sup>	0,249 ± 0,0	+30,0 ± 1,6 <sup>b</sup>

\*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3)

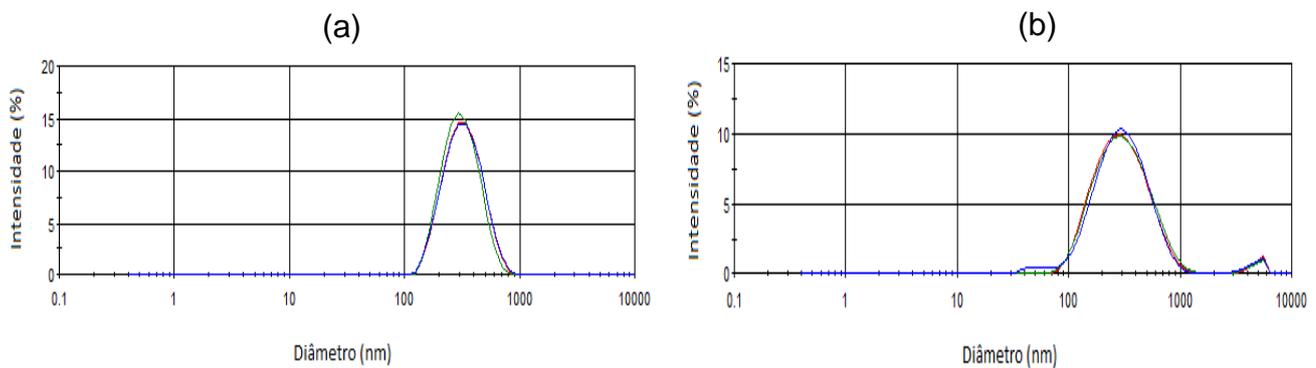
\*\*Letras iguais representam valores sem diferença estatisticamente significativa

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Ao avaliarmos o DHm para as NP-Bs-QT e NP-DEXAc-QT quando em comparação às NP-Bs (222,8 ± 7,5 nm) e NP-DEXAc (207,3 ± 6,7 nm) (Tabela 1), observamos um aumento de tamanho. Esse dado sugere o primeiro indício da

ocorrência do revestimento e pode ser corroborado por meio dos resultados obtidos para a distribuição de tamanho dessas nanopartículas (Figura 16), quando em comparação à distribuição de tamanho das nanopartículas sem revestimento (Figuras 10c e 10d).

Figura 16 - Distribuição de tamanho das NP por intensidade (n=3)



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

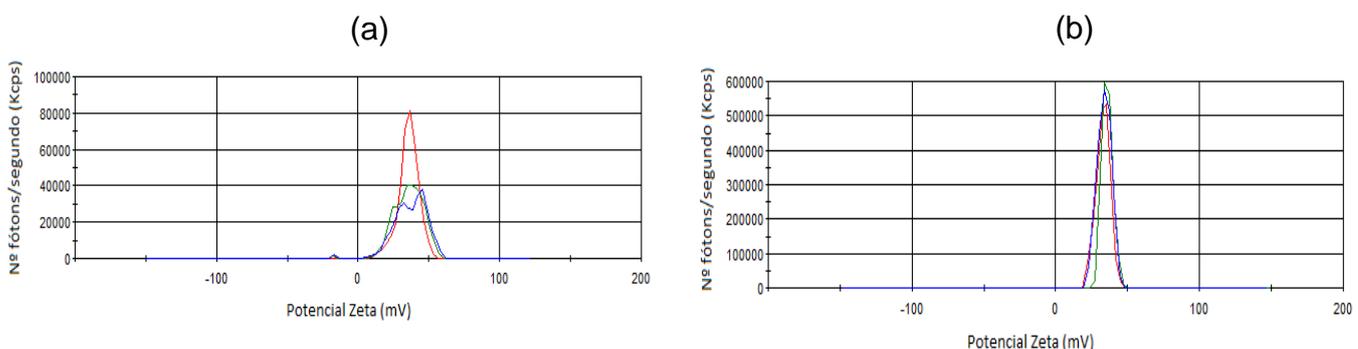
Nesse caso, é interessante observar a obtenção de um maior valor de Pdl para as NP-DEXAc-QT ( $0,249 \pm 0,0$ ) (Tabela 3) em detrimento às NP-DEXAc ( $0,107 \pm 0,0$ ) (Tabela 1). Esse resultado pode ser evidenciado pela distribuição bimodal apresentada após o revestimento com quitosana (Figura 15b). Entretanto, apesar de um maior valor de Pdl, as NP-DEXAc-QT podem ser caracterizadas como um sistema monodisperso, já que o valor encontrado se situa abaixo de 0,3 (LU; LV; LE, 2019). Esse dado é particularmente importante, uma vez que, como já descrito, o Pdl está atrelado à estabilidade do sistema coloidal (AMARAL et al., 2019). A esse respeito, vale ressaltar que, para todas as formulações desenvolvidas, obtivemos essa característica.

A partir do revestimento das NP com quitosana, é possível notar a inversão do PZ para valores positivos ( $+23,0 \pm 1,8$  mV para as NP-Bs-QT e  $+30,0 \pm 1,61$  mV para as NP-DEXAc-QT) (Tabela 3). Nesse caso, as cargas positivas são decorrentes da presença da QT protonada, devido à sua solubilização prévia em solução de ácido acético diluído. A mudança do PZ fica evidente a partir da observação dos gráficos de distribuição do potencial zeta para as diferentes formulações (Figuras 11c, 11d e

17) e reforça a ocorrência da adsorção da quitosana à superfície das NP. A esse respeito, a literatura descreve que o revestimento de nanoestruturas pode ser alcançado devido ao fato da quitosana se apoiar na superfície das partículas, por meio do enredamento das cadeias poliméricas, resultando em uma estrutura nuclear revestida. Além disso, é sabido que a interação entre as cargas negativas presentes na superfície dos nanossistemas ( $PZ = -10,6 \pm 2,8 \text{ mV}$  e  $-11,8 \pm 1,4 \text{ mV}$  para as NP-Bs e NP-DEXAc, respectivamente - Tabela 1) e as cargas positivas da quitosana contribuem para a eficiência do revestimento (TAVARES et al., 2020; WANG et al., 2010). Ainda, cabe destacar que, com o incremento do valor de PZ propiciado a partir do revestimento das nanopartículas, a formulação final (NP-DEXAc-QT) poderá apresentar estabilidade coloidal eletrostática satisfatória.

É importante mencionar que, assim como em nosso trabalho, outros estudos da literatura também reportaram um aumento no DHm e uma inversão de PZ (para valores positivos) para formulações de NP constituídas por PLGA e revestidas com QT (CHRONOPOULOU et al., 2013; AL-NEMRAWI et al., 2018; LU et al., 2019; AHMAD et al., 2020).

Figura 17 - Distribuição de PZ das NP (n=3) para (a) NP-Bs-QT e (b) NP-DEXAc-QT



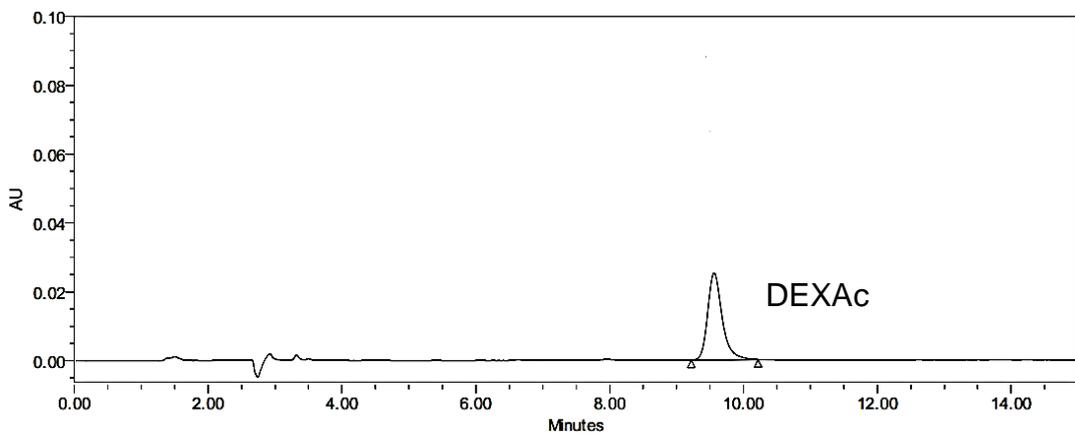
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

### 5.2.2 Eficiência de encapsulação (EE) e drug loading (DL)

Para a avaliação da EE da DEXAc nas NP após o revestimento com quitosana (NP-DEXAc-QT), a quantificação do fármaco não encapsulado foi realizada empregando-se a técnica de CLAE, nas mesmas condições já citadas anteriormente (item 4.3.2.2). A curva, a equação da reta e o coeficiente de determinação foram mostrados na Figura 11b

Como já apresentado, no cromatograma referente à DEXAc obtivemos um pico bem resolvido em 244 nm, com tempo de retenção próximo a 10 minutos (Figura 13b). O mesmo comportamento foi obtido para o cromatograma correspondente aos sobrenadantes das NP-DEXAc-QT.

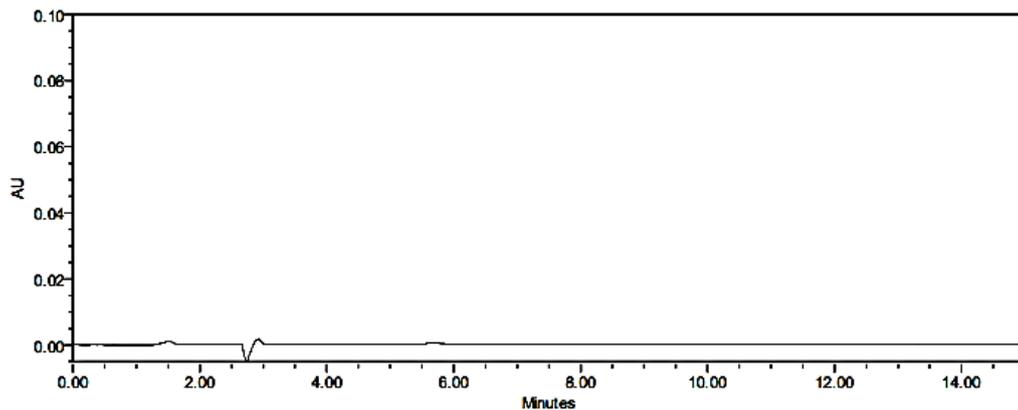
Figura 18 - Cromatograma referente ao sobrenadante das NP-DEXAc-QT. Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Observando o cromatograma referente ao sobrenadante das NP-Bs-QT, é importante ressaltar que não houve interferência dos constituintes da formulação na detecção da DEXAc (Figura 19).

Figura 19 - Cromatograma referente ao sobrenadante das NP-Bs-QT. Fase móvel: metanol + 0,1 % ácido fórmico: água ultrapura + 0,1% ácido fórmico (65:35), isocrática. Volume de injeção de 5µL, tempo de eluição de 15 minutos Detecção dos picos em 244nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de EE e DL para as NP-DEXAc-QT

Tabela 4 -Valores\* de EE e DL para as nanopartículas desenvolvidas (n=3)

	NP-DEXAc-QT		
	EE (%)	m (mg)	DL (%)
Média ± DP	78,5 ±0,26	3,93 ±0,01	6,53 ± 0,02

m = massa de DEXAc nas nanopartículas.

\*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3)

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Para as NP-DEXAc-QT, apesar de não haver diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no valor de EE em comparação às nanopartículas não-revestidas (Tabela 2), observamos uma diminuição na massa de DEXAc encapsulada. Nesse caso, é possível que, durante o revestimento das nanopartículas pela quitosana, tenha havido o deslocamento e consequente perda de uma pequena parte do fármaco para o meio externo.

Ademais, de modo semelhante ao observado em nosso trabalho, Khanal e colaboradores (2016) observaram diminuição no DL ao desenvolverem NP de PLGA revestidas com quitosana para encapsulação do diclofenaco de sódio. No estudo, esse parâmetro variou de 3,92% para 3,13% após revestimento das nanopartículas com quitosana. Como já mencionado, esse comportamento pode ser devido ao

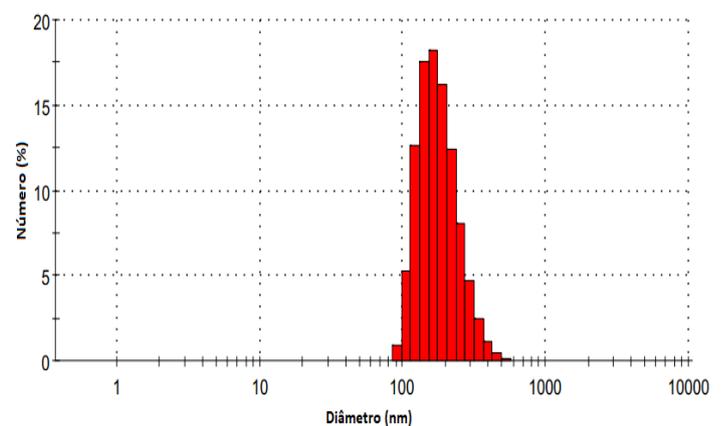
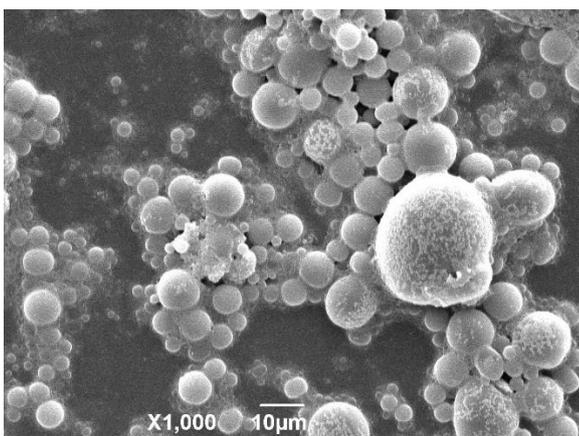
deslocamento de parte do fármaco durante o processo de revestimento das nanoestruturas.

### 5.2.3 Morfologia

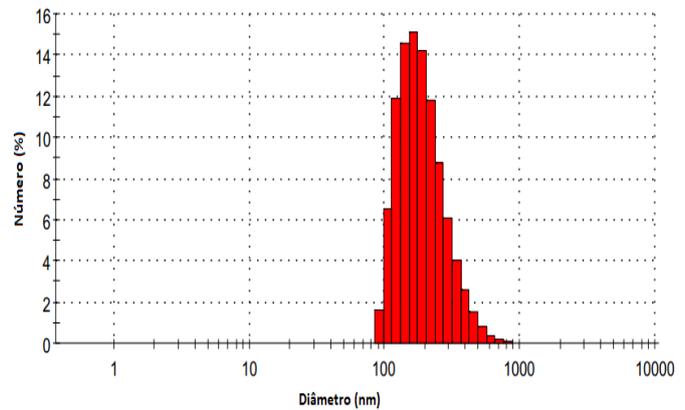
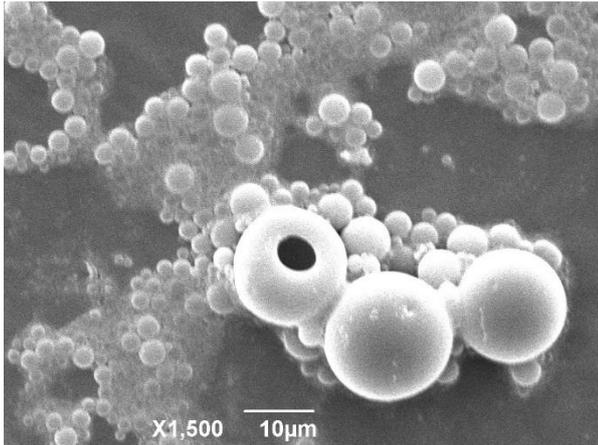
As imagens de MEV mostram, para ambas as formulações (NP-Bs e NP-Bs-QT) partículas esféricas com tamanho nanométrico, compatível com os resultados de DLS e homogeneidade em relação ao formato. Entretanto, nota-se uma diferença no aspecto da superfície das nanopartículas sem revestimento em detrimento às revestidas. Enquanto as NP-Bs apresentam superfície de aspecto rugoso (Figura 20a), as NP-Bs-QT demonstram uma superfície mais lisa (Figura 20b). Essa diferença pode ser devido à presença da QT na superfície externa das nanopartículas, o que seria um indício adicional da ocorrência do revestimento. Análises futuras serão conduzidas visando avaliar se a presença da DEXAc é capaz de alterar a morfologia das nanoestruturas.

Figura 20 - Micrografias por MEV para as nanopartículas brancas com seus respectivos histogramas de distribuição de tamanho por número (a) NP-Bs e (b) NP-Bs-QT

(a)



(b)



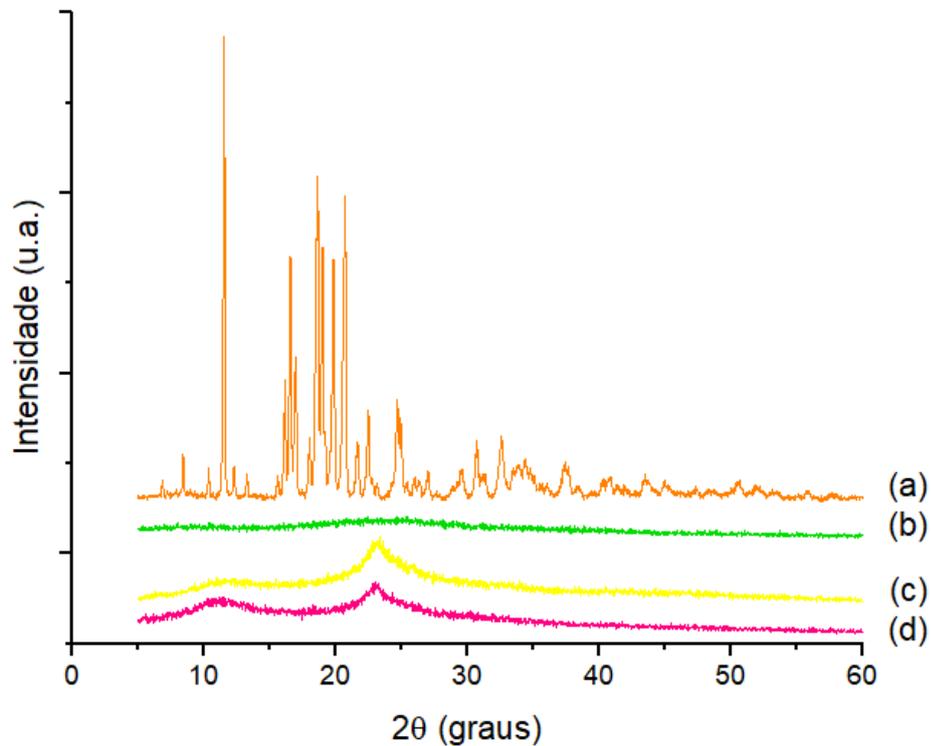
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

#### 5.2.4 Difração de raios X (DRX)

A técnica de DRX tem por objetivo caracterizar matérias-primas e sistemas sólidos, podendo ser empregada para avaliar o grau de cristalinidade, além da composição de fases das amostras (ALI *et al.*, 2013). Para o ensaio, analisamos as matérias-primas isoladas (DEXAc, PLGA, PVA e QT), bem como as formulações desenvolvidas (NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT).

O difratograma da DEXAc é mostrado na Figura 21a. Nesse caso, os principais picos registrados nos ângulos de difração em  $2\theta$  estão localizados em  $11,68^\circ$ ;  $16,35^\circ$ ;  $18,74^\circ$ ;  $19,34^\circ$  e  $20, 21^\circ$ . Os picos agudos e bem definidos, com deslocamento visível da linha de base confirmam a natureza cristalina deste fármaco. Resultados semelhantes foram reportados em outros estudos da literatura (ALI *et al.*, 2013).

Figura 21 - Difratogramas das matérias primas puras (a) DEXAc; (b) PLGA; (c) PVA; (d) quitosana



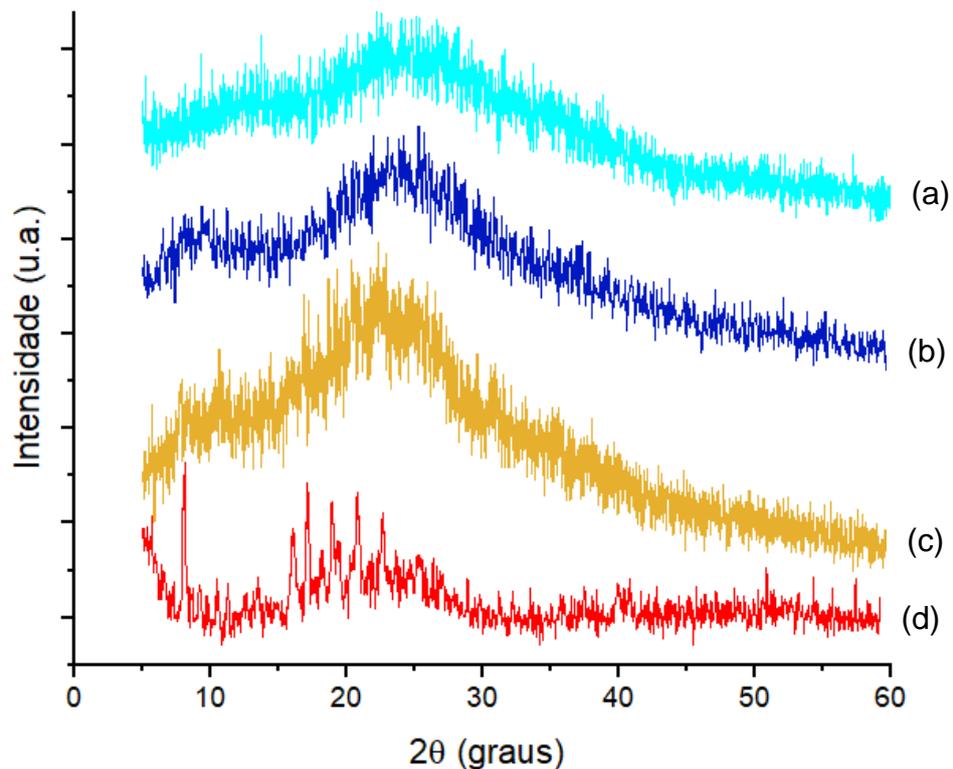
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Em relação ao PLGA (Figura 21b), nenhum pico majoritário foi observado, o que corrobora a natureza amorfa desse polímero (MOHAMMADI et al., 2021). Já o PVA e a quitosana apresentaram caráter semi-cristalino, com halos característicos em  $2\theta$ :  $23,19^\circ$  e  $22,8^\circ$ , respectivamente (Figuras 21c e 21d). Tais comportamentos estão concordantes com dados publicados (GARCÍA-CERDA et al., 2007; ZHANG et al., 2005).

Por meio da análise do difratograma referente às NP-Bs (Figura 22a), pode-se notar o comportamento típico apresentado para o PLGA. Dessa forma, é possível sugerir que o polímero permaneça com estrutura amorfa após formação das nanopartículas. As NP-DEXAc (Figura 22c) apresentaram padrão semelhante ao das NP-Bs e bastante diferente do difratograma típico da DEXAc (Figura 21a). Assim, a ausência dos picos característicos e discretos indica a amorfização do fármaco e sugere que este esteja molecularmente disperso na matriz polimérica. Resultados semelhantes foram relatados por Yadav e co-autores (2010) e Mohammadi e

colaboradores (2021), os quais encapsulam, respectivamente, etoposídeo e anfotericina B em nanopartículas de PLGA.

Figura 22- Difratomogramas das formulações nanoestruturadas (a) NP-Bs; (b) NP-Bs-QT; (c) NP-DEXAc; (d) NP-DEXAc-QT



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

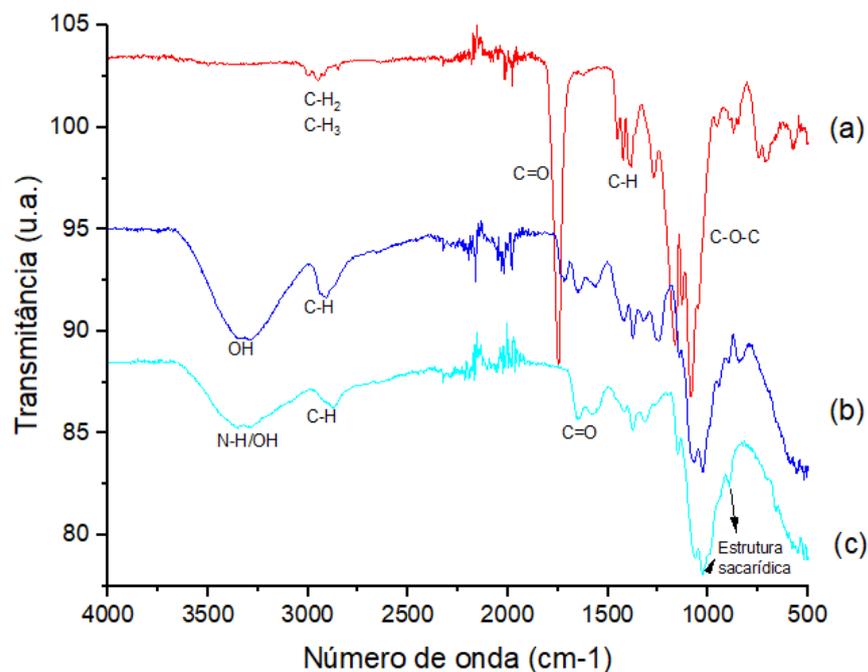
Ao avaliarmos os difratogramas referentes às nanopartículas revestidas com quitosana, observamos, para as NP-Bs-QT (Figura 22b), comportamento semelhante ao obtido para a quitosana pura (Figura 21d). Esse dado pode corroborar a ocorrência do recobrimento das nanopartículas por esse polímero catiônico. Em relação à formulação final (NP-DEXAc-QT, Figura 22d), constatamos a presença de halo característico da quitosana pura e, além disso, de picos inerentes à DEXAc, os quais encontram-se menos intensos quando em comparação ao fármaco puro (Figura 21a). Nesse caso, o aparecimento de picos característicos do fármaco pode apresentar relação com a questão já mencionada de que, durante o processo de revestimento, a quitosana desloque parte da DEXAc para o meio externo. No trabalho conduzido por Khanal e colaboradores (2016) os autores observaram resultado semelhante quando da encapsulação do diclofenaco de sódio em NP de

PLGA-quitosana, o que reforça a teoria sobre o deslocamento de parte fármaco durante o processo.

### 5.2.5 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR/ATR)

A FTIR/ATR foi realizada a fim de investigar modificações químicas ocorridas após a nanoestruturação, como surgimento, supressão ou desaparecimento de bandas para a confirmação da encapsulação da DEXAc e da ocorrência do revestimento das NP. Os espectros obtidos estão representados nas Figuras 23, 24 e 25.

Figura 23 - Espectros de infravermelho de (a) PLGA; (b) PVA e (c) QT



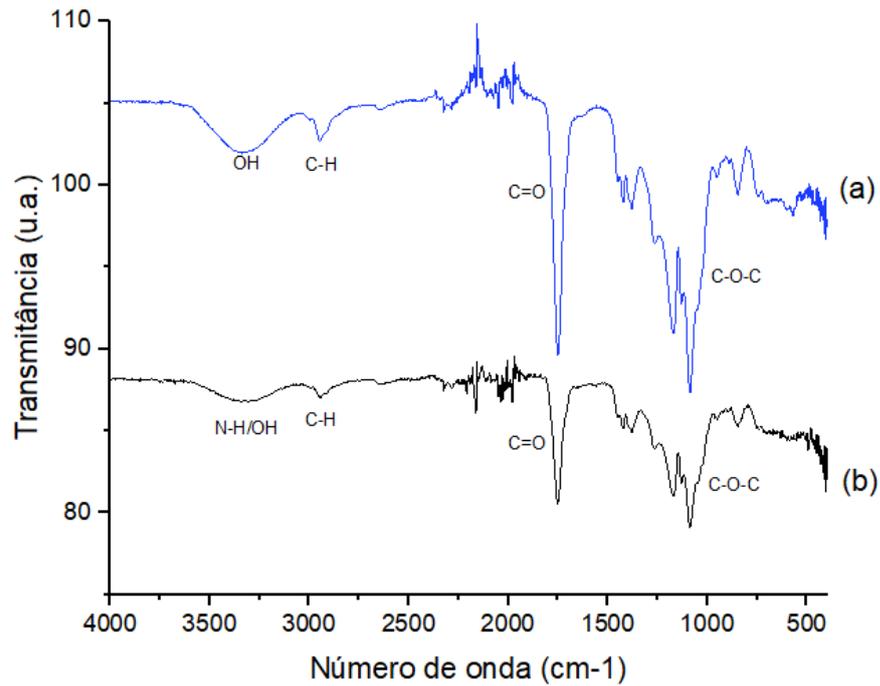
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

No espectro do PLGA (Figura 23a) há um estiramento C–O–C em 1175 cm<sup>-1</sup>, e em torno de 1390–1440 cm<sup>-1</sup> uma banda correspondente à ligação C-H. Em 1760 cm<sup>-1</sup> observa-se o estiramento correspondente à carbonila (C=O) do ácido láctico da molécula de PLGA, e, próximo a 3000 cm<sup>-1</sup>, bandas correspondentes a ligações C-H e C-H<sub>2</sub>. Esses resultados são compatíveis com o reportado na literatura (KHANAL *et al.*, 2016). Por sua vez, os espectros referentes ao PVA e à QT (Figuras 23b e 23c,

respectivamente) se assemelham, apresentando em comum uma banda referente à hidroxila (OH) em torno de 3200-3570  $\text{cm}^{-1}$  e banda referente à ligação C-H em 2930-2870  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, a QT possui, em aproximadamente 3500  $\text{cm}^{-1}$ , mesclado à banda da ligação hidroxila (OH), uma banda correspondente à ligação  $\text{NH}_2$ , correspondente à amina primária alifática. Ademais, a banda referente à carbonila (C=O) de amida se apresenta em aproximadamente 1750  $\text{cm}^{-1}$ , além de bandas entre 750-1000  $\text{cm}^{-1}$  referentes à estrutura sacarídica da molécula (KANG *et al.*, 2017; PEREIRA, ARRUDA; STEFANI, 2015).

No espectro das NP-Bs (Figura 24a), como previsto, observamos padrões de ligações característicos do PLGA (C=O e C-O-C) e do PVA (-OH e C-H), os quais são os constituintes dessas nanopartículas. Ao observarmos o comportamento das NP-Bs-QT (Figura 24b) é possível notar o estiramento característico do grupamento  $\text{NH}_2$ , o que é típico da molécula de QT (Figura 23C). Esse dado pode corroborar a ocorrência do revestimento das NP e foi observado em outro estudo publicado na literatura (LU; LV; LE, 2019). É importante ressaltar que, apesar das NP-Bs (Figura 24a) também apresentarem uma banda do grupo hidroxila em número de onda próximo do estiramento referente ao grupamento amina, esta se refere, provavelmente, ao PVA remanescente após processo de lavagem. Por outro lado, é possível supor, também, que a diminuição de intensidade dos estiramentos referentes aos grupos C=O e C-O-C nas NP-Bs-QT (Figura 24b) possa ser devido às possíveis interações entre a QT e o PLGA. Essa observação pode representar uma indicação adicional da ocorrência do revestimento. De fato, durante esse procedimento, interações eletrostáticas, bem como interações hidrofóbicas podem governar a adsorção da QT à superfície das NP (LEMARCHAND *et al.*, 2004).

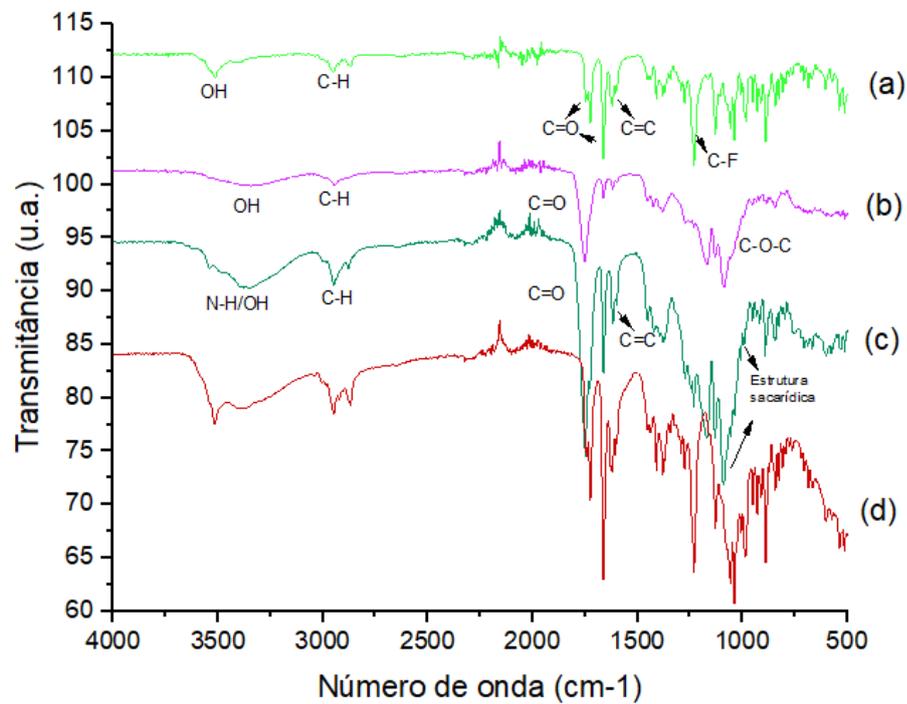
Figura 24 - Espectros de infravermelho de (a) NP-Bs e (b) NP-Bs-QT



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Nos espectros de FTIR da Figura 25, pode-se observar os estiramentos característicos da DEXAc (Figura 25a) em torno de  $3500\text{ cm}^{-1}$  correspondente à hidroxila (OH) e bandas próximas a  $3000\text{ cm}^{-1}$  referentes a ligações C-H. Em aproximadamente  $1740$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, foram verificadas as vibrações de estiramento dos grupos carbonila (C=O) C-20 e C-3. A vibração de estiramento das ligações duplas (C=C) conjugadas à carbonila C-3 foi observada em aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Já a banda de estiramento da ligação C-F foi verificada em aproximadamente  $1250\text{ cm}^{-1}$ . Esses dados são semelhantes aos reportados na literatura (KUMAR et al., 2017; SILVA et al., 2011).

Figura 25 - Espectros de infravermelho de (a) DEXAc; (b) NP-DEXAc; (c) NP-DEXAc-QT e (d) mistura física dos componentes



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Avaliando o espectro de NP-DEXAc (Figura 25b) nota-se a ausência do estiramento característico da DEXAc referente à ligação C-F em 1250 cm<sup>-1</sup>. Além disso, a banda referente ao grupo OH encontra-se suprimida e as bandas características da ligação C-H estão diminuídas. Essas observações podem ser decorrentes de interações do fármaco com a matriz polimérica de PLGA, o que pode reforçar a ocorrência da encapsulação.

Para as NP-DEXAc-QT (Figura 25c), observamos, como esperado, a ausência do pico característico da DEX em 1250 cm<sup>-1</sup> (C-F). Ademais, é possível constatar a presença de estiramentos característicos da QT, incluindo a banda correspondente à amina primária. Nesse sentido, o espectro obtido é bastante semelhante ao observado para as NP-Bs-QT (Figura 24b), o que corrobora a ocorrência do revestimento das NP-DEXAc. Por outro lado, é interessante observar o aparecimento do estiramento referente às ligações duplas (C=C) características da DEXAc (Figura 25c). Esse resultado, como já descrito, pode ser devido ao possível deslocamento de parte do fármaco ocasionado durante o processo de revestimento. Comportamento semelhante encontra-se descrito na literatura (KANG et al., 2017; KHANAL et al., 2016).

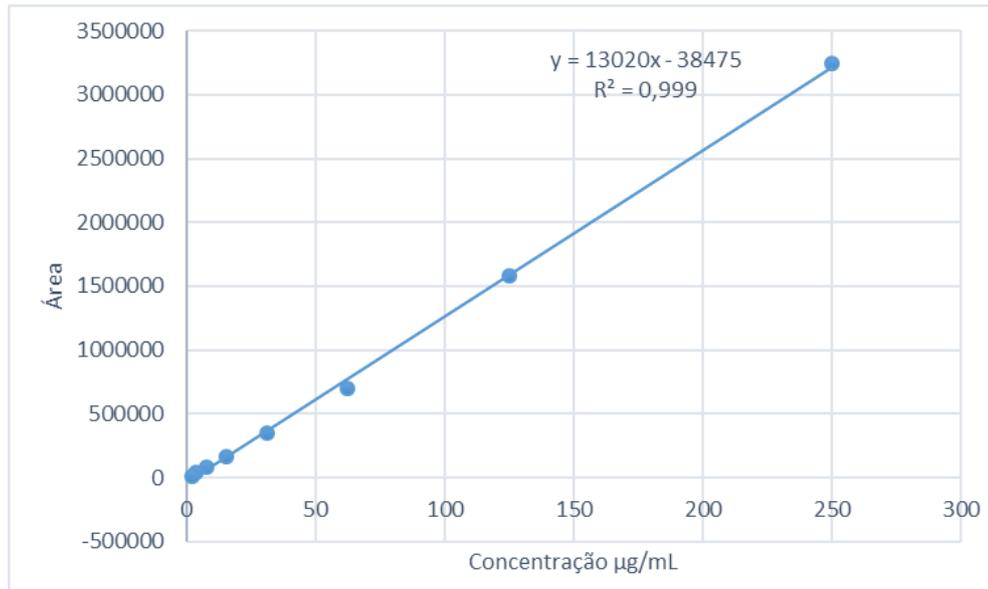
Na mistura física dos componentes das formulações (Figura 25d) pode-se verificar bandas e estiramentos característicos de todos os compostos puros, diferentemente das formulações. Este fato reforça as evidências já demonstradas de formação das nanopartículas de PLGA, encapsulação da DEXAc e ocorrência do revestimento.

### **5.2.6 Avaliação do perfil de liberação *in vitro***

Para a avaliação do perfil de liberação da DEX a partir das nanopartículas, bem como para investigar a influência do revestimento neste parâmetro, as formulações (NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT) foram submetidas a um meio de dissolução capaz de simular o fluido biológico sanguíneo (Tampão fosfato, pH 7,4 a 37 °C). No ensaio, utilizamos o método de diálise e as alíquotas foram coletadas, no meio receptor, em intervalos de tempo pré-determinados por um período de 24 horas.

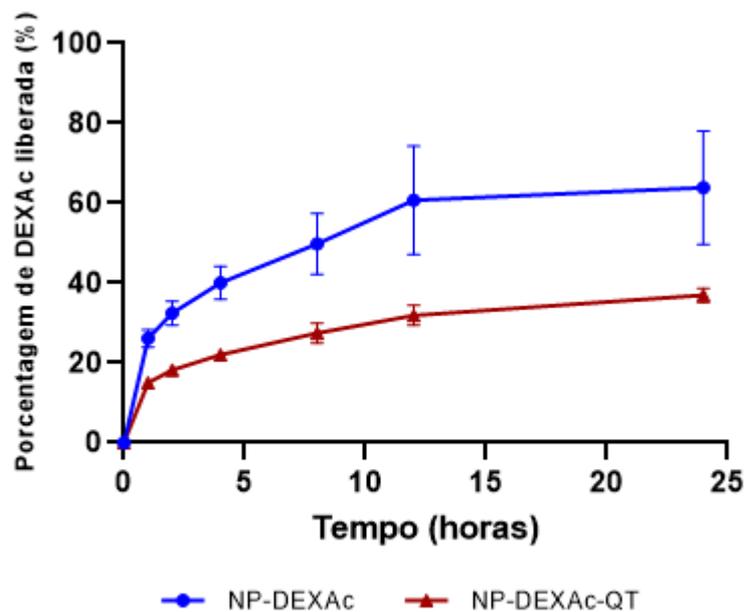
Uma curva analítica foi construída para a quantificação da DEXAc nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95 µg/mL e está representada na Figura 25, juntamente com o coeficiente de correlação e a equação da reta correspondente. Os resultados de perfil de liberação de DEXAc frente às NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT estão ilustrados na Figura 26 e discutidos a seguir.

Figura 26 - Curva analítica para DEXAc nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95 µg/mL.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Figura 27 - Perfis de liberação de DEXAc encapsulado em NP-DEXAc e NP-DEXAc em meio de dissolução PBS pH 7,4 (n=3. Barras representam o desvio padrão)



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas constituídas por PLGA pode ocorrer em função da difusão do fármaco através da matriz polimérica e/ou por meio dos processos de erosão/degradação do polímero (HINES; KAPLAN, 2013). Nesse cenário, é possível perceber que, para as NP-DEXAc, houve uma rápida liberação de parte do DEXAc (cerca de 26%) após 1 hora. Esse efeito, denominado

“*burst release*” é comumente relatado para nanopartículas de PLGA e pode estar relacionado à difusão do fármaco que se encontra adsorvido à superfície externa da matriz polimérica (LU et al., 2019). Por outro lado, a liberação mostrou-se mais lenta a partir de 2h, com 60% do fármaco liberado em 12h. Após esse período, a liberação do DEXAc se deu de forma sustentada, alcançando uma porcentagem de aproximadamente 64%. Comportamento semelhante foi obtido no estudo de Kim e colaboradores (2019), no qual os autores constataram uma rápida liberação inicial do DEXAc a partir das NP de PLGA (~20% após 1h), seguida por um perfil de liberação sustentada durante o restante do experimento (com cerca de 50% do fármaco liberado após 24h).

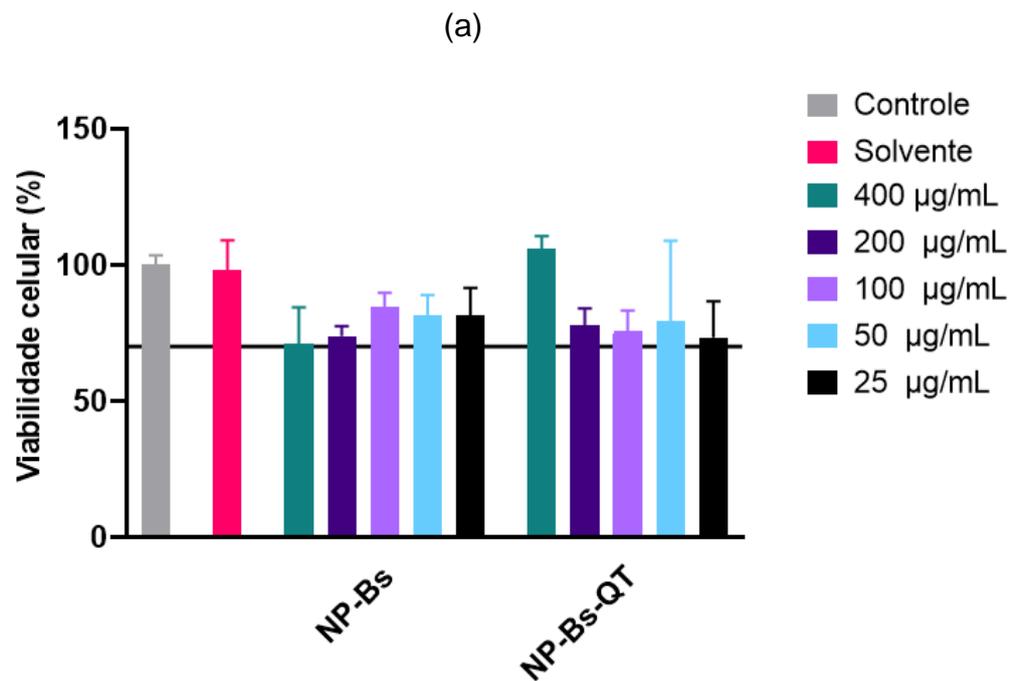
Em relação às NP-DEXAc-QT, nota-se que o revestimento com QT, como esperado, foi capaz de modificar a liberação do fármaco a partir das nanopartículas. Nesse caso, a porcentagem de liberação inicial de DEXAc (15,06%) foi menor que a observada para as nanopartículas não revestidas. Além disso, é possível verificar um maior controle na liberação do fármaco, sendo que, após 24h, apenas 37% do fármaco foi quantificado no meio receptor. É possível que esse comportamento seja devido ao efeito “barreira” proporcionado pela QT, ocasionado pelo intumescimento desse polímero, o que pode limitar a liberação do fármaco, controlando sua difusão (TAVARES et al., 2020). Esse dado indica que as NP revestidas podem ser capazes de propiciar um perfil de liberação mais lento e sustentado para o DEXAc, o que poderia contribuir para a manutenção de sua concentração plasmática por longos períodos, com redução da dose e/ou frequência de administração. Resultado similar foi descrito por Chronopoulou e colaboradores (2013), os quais avaliaram a liberação da dexametasona a partir de nanopartículas de PLGA revestidas por quitosana.

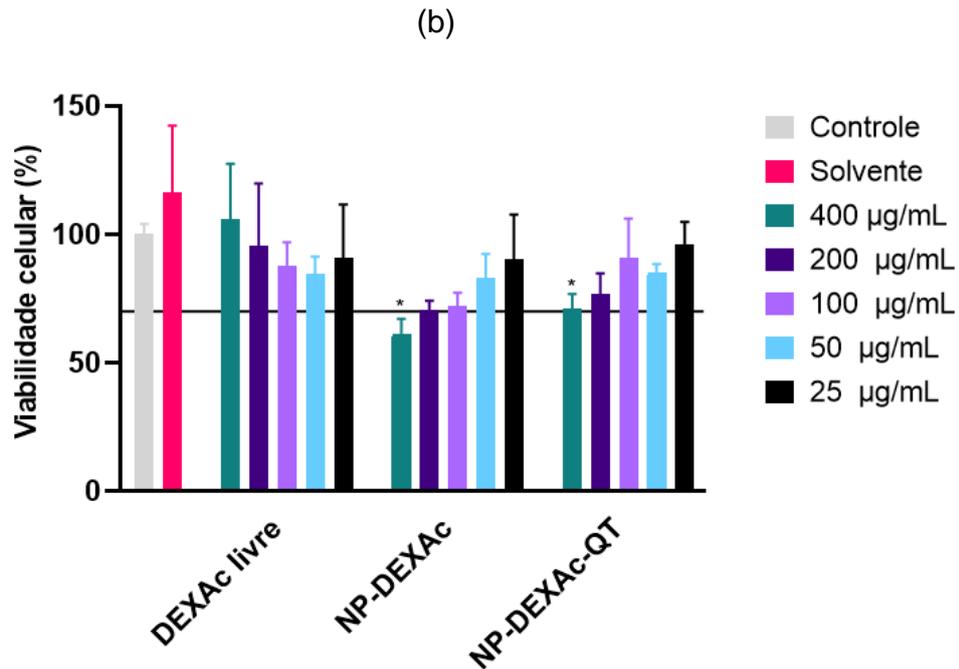
### **5.2.7 Avaliação da citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade das nanopartículas (NP-Bs; NP-Bs-QT; NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT), bem como do fármaco livre foi realizada por meio do ensaio do metabolismo do sal de tetrazólio (MTT) em linhagem celular de macrófagos (J774A.1). O MTT é um sal amarelo hidrossolúvel, o qual se converte, via enzima succinil-desidrogenase mitocondrial, em uma substância insolúvel de coloração roxa (formazan). Assim, a absorvância deste produto pode ser medida por

espectrofotometria da região do visível (TAVARES, 2013). Na Figura 28 são apresentados os resultados obtidos.

Figura 28 - Influência das NP-Bs e NP-Bs-QT (a) e DEXAc; NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT (b) na viabilidade de células J774A.1. [n= 4. Barras representam o desvio padrão. Diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle são marcadas por\*]





Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Para as NP-Bs, não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle para nenhuma das concentrações avaliadas. Além disso, em todos os casos, a viabilidade celular foi maior ou igual a 70%, o que, segundo a ISO 10993-5, não caracteriza efeito tóxico. O mesmo comportamento foi observado para as NP-Bs-QT. Resultados semelhantes foram relatados na literatura para a viabilidade de macrófagos (linhagem J774A.1) expostos à nanopartículas constituídas por PLGA revestidas (SINGH, 2016) ou não (VAN de VEN et al., 2011) por quitosana. Esses resultados podem corroborar as propriedades de biocompatibilidade e baixa toxicidade para os polímeros utilizados no preparo das nanopartículas.

Em relação à DEXAc livre, para todas as concentrações testadas, os valores de viabilidade celular não diferiram significativamente em relação ao grupo controle. Ademais, todos os valores se mantiveram acima de 70%. Por outro lado, para ambas as formulações de nanopartículas, a exposição das células às concentrações de 400 µg/mL fez com que houvesse uma diminuição significativa da viabilidade quando em comparação ao grupo controle. Uma hipótese para explicar esse resultado pode estar relacionada à elevada capacidade de internalização das nanopartículas (VAN HEES et al., 2020), com consequente exposição das células à uma dose de DEXAc maior do que a alcançada com o fármaco livre, resultando em

efeitos tóxicos. Nesse sentido, existe o relato de que a DEXAc é capaz de induzir apoptose em linhagem celular de macrófagos (Al et al., 2020). No entanto, experimentos adicionais deverão ser realizados para confirmarmos essa possibilidade. Apesar disso, para a formulação NP-DEXAc-QT, o valor de viabilidade atingiu 70% e, como já descrito, não pressupõe a ocorrência de efeitos tóxicos às células. Esse dado pode sugerir que a quitosana contribui para uma maior tolerabilidade desta linhagem celular, sendo tal comportamento também observado no estudo de Singh e co-autores (2016). Por fim, para as menores concentrações, tanto em relação às NP-DEXAc quanto para as NP-DEXAc-QT, não houve indícios de citotoxicidade. Pelo exposto, a concentração de 200 µg/mL foi escolhida para a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* das nanopartículas.

### **5.2.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro***

A SRAG tem como principal evento agravante a chamada “tempestade de citocinas”, em que o organismo libera de forma exacerbada citocinas pró-inflamatórias para combater o vírus, acarretando danos ao tecido pulmonar (KESHITA et al., 2021). Dentre as principais citocinas envolvidas neste fenômeno, estão IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  (ABDIN et al., 2020). Dessa forma, nessa parte do trabalho investigamos se a nanoestruturação, bem como a presença da quitosana, influenciaram na atividade inibitória da DEXAc frente à essas citocinas. Além disso, uma vez que o óxido nítrico (NO) está diretamente envolvido na resposta inflamatória, investigamos a influência das formulações nos níveis dessa substância. Os resultados encontrados são relatados a seguir.

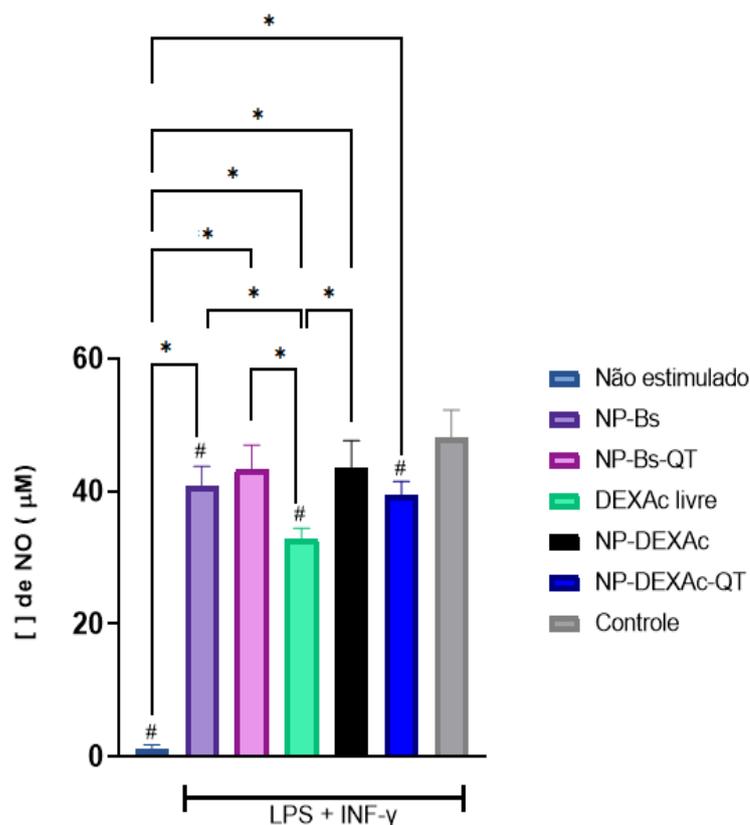
#### **5.2.8.1 Dosagem de Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que assume papel importante nos processos inflamatórios, promovendo relaxamento muscular dos vasos sanguíneos, levando a vasodilatação, além de reduzir a agregação plaquetária. Seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (POLUHA;

GROSSMANN, 2018). Nesse sentido, os níveis de NO refletem a gravidade da inflamação em curso (SIU et al., 2018)

O doseamento *in vitro* de NO foi realizado a fim de investigar a ação anti-inflamatória da DEXAc e das formulações desenvolvidas (NP-Bs; NP-Bs-QT; NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT), de forma que, a inibição de sua formação pode indicar diminuição do processo inflamatório. A atividade anti-inflamatória frente ao NO foi determinada indiretamente pela reação de Griess para medir a concentração de nitrito no meio de cultura, após o estímulo das células com LPS e INF- $\gamma$ . Os resultados são apresentados na Figura 29 e discutidos a seguir.

Figura 29 - Dosagem de NO em linhagem J774A.1 estimulada com LPS e INF- $\gamma$  e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT (n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas ( $p>0,05$ ) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por \*



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Após análise dos dados, foi possível perceber que DEXAc foi o tratamento mais eficaz na inibição da produção de NO. No entanto, a redução apresentada (~31,6%), muito embora seja estatisticamente maior que a observada para o controle, está aquém do que foi observado em outros trabalhos (A QURESHI et al.,

2011; WANG et al., 2017). Nesse caso, é possível que o excesso de estímulo, propiciado pela presença do INF- $\gamma$ , tenha interferido negativamente na atividade da DEXAc. Esse fato já foi relatado em outro trabalho (KORHONEN et al., 2002). Entretanto, vale ressaltar que, para esse ensaio, o INF- $\gamma$  é importante para garantir uma maior produção de óxido nítrico, bem como para mimetizar o que ocorre na resposta imune adquirida (ABBAS; LICHTMAN; PILLAL, 2015). Com relação às formulações de nanopartículas, a maior redução foi observada para as NP-DEXAc-QT sendo que, nesse caso, não houve diferença significativa quando em comparação à redução observada para o fármaco livre. De fato, existem relatos que confirmam a capacidade da quitosana em inibir a produção de NO em linhagem celular de macrófagos (YANG et al., 2009; CHANG et al., 2019). Assim, é possível que o efeito sinérgico entre a DEXAc e a QT tenha contribuído para esse resultado, o qual não foi ainda mais pronunciado, possivelmente devido à liberação controlada do fármaco a partir das nanopartículas.

#### 5.2.8.2 *Dosagem de citocinas*

O estudo da modulação de citocinas foi realizado avaliando-se a inibição de IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , as quais estão diretamente envolvidas na hiperinflamação em decorrência da resposta imune frente ao SARS-COV-2. Esse quadro caracteriza a fisiopatologia da COVID grave, situação na qual ocorrem alterações principalmente em nível pulmonar, ocasionando a SRAG. Esse é um fator preditivo de gravidade da doença devido à forte associação com a falência de múltiplos órgãos e a consequente ocorrência de óbitos (NAPOLEÃO et al., 2021).

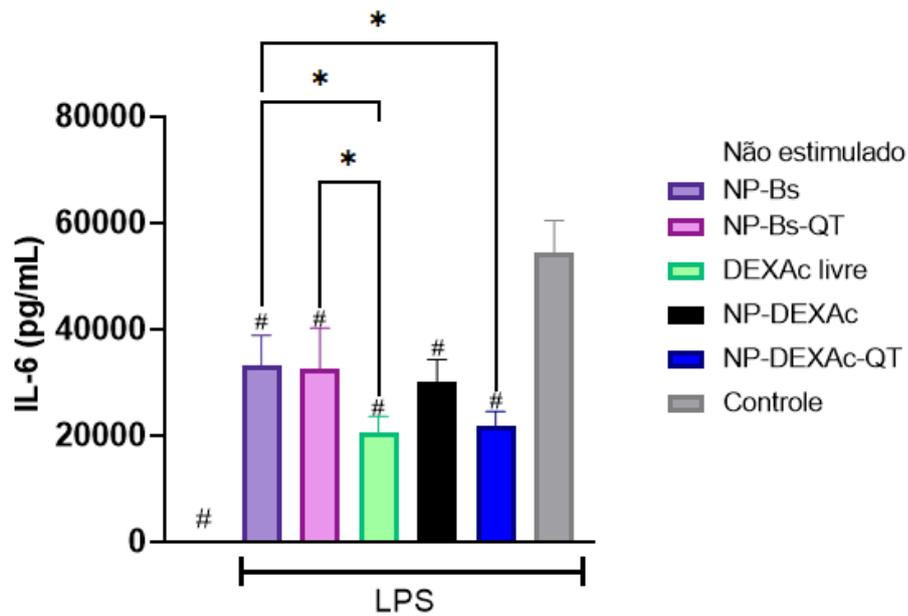
A IL-6 é uma citocina que desempenha papel importante nas respostas inflamatórias agudas, exercendo efeitos locais e sistêmicos. É responsável por estimular a produção de neutrófilos na medula óssea, induz a síntese de reagentes de fase aguda pelo fígado e está diretamente envolvida na diferenciação de células T auxiliares para o fenótipo TH17, que apresenta grande potencial inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAL, 2015). Além disso, essa citocina possui papel de destaque na SRAG, uma vez que seus níveis se elevam em pacientes com COVID-19 grave (ABDIN et al., 2021). Ademais, tendo em vista o importante papel desta citocina na COVID19, estratégias que visam bloquear a ação/produção da IL-6 têm

vido propostas e estudadas como alternativas para o manejo da SRAG (MONTAZERSAHEB et al., 2022)

A IL-12, outra citocina pró-inflamatória importante, é secretada principalmente por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (MAL; TRINCHIERI, 2001). Essa citocina estimula a produção de IFN- $\gamma$  por ILC1s, células NK e células T, além de intensificar a citotoxicidade mediada pela célula NK e pelo CTL. É também responsável pela diferenciação de células TH1 e está envolvida na proliferação e manutenção de células TH17 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAL, 2015; A VIGNALI; KUCHROO, 2012). Assim, tendo em vista que esta citocina aumenta a ativação de várias células do sistema imune, a IL-12 também está associada à tempestade de citocinas, no contexto da SRAG (NAPOLEÃO et al., 2021).

Por sua vez, o TNF- $\alpha$ , um mediador produzido principalmente por células dendríticas e macrófagos, apresenta como principal efeito fisiológico a promoção da resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecções, além de ativá-los (ABBAS; LICHTMAN; PILLAL, 2015). Esse mediador também está envolvido na resposta imune exacerbada e na tempestade de citocinas decorrentes da replicação rápida e intensa do SARS-CoV-2 no organismo (HU et al., 2021). Na COVID, já foi demonstrado que esta citocina está relacionada, entre outros, com hiper responsividade brônquica, redução do calibre das vias aéreas e aumento da neutrofilia do trato respiratório. Além disso, ela é capaz de deteriorar o epitélio respiratório através da indução da produção de outras citocinas inflamatórias e metaloproteinases. (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015). Assim como para a IL-6, o bloqueio da ação/produção de TNF- $\alpha$  no contexto da COVID19 também tem demonstrado efetividade (FELDMANN et al., 2020). Pelo exposto, e considerando que a DEXAc vem sendo amplamente utilizada para o tratamento da SRAG, avaliamos os efeitos da nanoestruturação e do revestimento das nanopartículas com QT na atividade inibitória desse corticóide frente à IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  produzidas por macrófagos J774A.1 estimuladas com LPS. Os resultados estão apresentados nas Figura 30, 31 e 32, respectivamente.

Figura 30 - Dosagem de IL-6 em linhagem J744A.1 estimulada com LPS e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT [n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por \*]



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

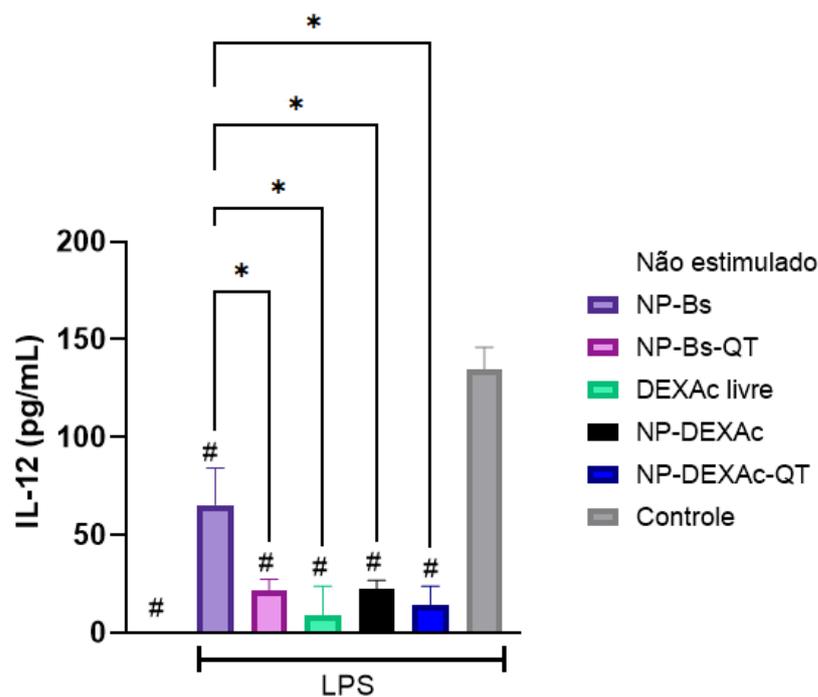
Os resultados demonstram que todas as amostras apresentaram efeito inibitório estatisticamente maior quando em comparação ao controle. A inibição provocada pelas NP-Bs pode ser resultante de interações não específicas entre a IL-6 e as NP, como relatado por Simón-Vázquez e colaboradores (2022). Além disso, não houve diferença significativa na modulação da IL-6 entre as NP-Bs e as NP-Bs-QT. Esse resultado foi surpreendente, uma vez que existe a comprovação do efeito inibitório da QT de baixo peso molecular frente a essa citocina (CHANG et al., 2019). Apesar disso, para as NP-DEXAc-QT observamos uma inibição significativamente maior que a apresentada pelas NP-Bs. Ainda, o efeito inibitório foi comparável ao observado para a DEXAc. Nesse caso, como já descrito, o controle da liberação do fármaco propiciado pelas nanopartículas revestidas pode explicar esse achado. Esses resultados podem sugerir que o revestimento apresente o potencial de contribuir com a ação da DEXAc, seja pela atividade intrínseca desse polímero, ou devido ao aumento da captação celular do fármaco propiciado pelas nanopartículas carregadas positivamente (LU et al., 2019; DURÁN et al., 2019).

Nesse sentido, nanopartículas de PLGA-QT possibilitaram o aumento da captação e retenção da dexametasona em linhagens celulares de hepatócitos (C3A) e fibroblastos (3T6) (CHRONOPOULOU et al., 2013). Entretanto, como já mencionado, experimentos adicionais deverão ser realizados para a comprovação

do incremento da internalização das nanopartículas na linhagem celular utilizada neste estudo.

Por fim, é importante destacar que, para as NP-DEXAc, apesar de não existir diferença significativa em relação ao fármaco livre, o efeito inibitório frente à IL-6 mostrou-se comparável às NP-Bs. Esse resultado corrobora a hipótese de que o revestimento com quitosana seja capaz de contribuir para a redução nos níveis dessa citocina.

Figura 31 - Dosagem de IL-12 em linhagem J744A.1 estimulada com LPS e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT [n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por \*]

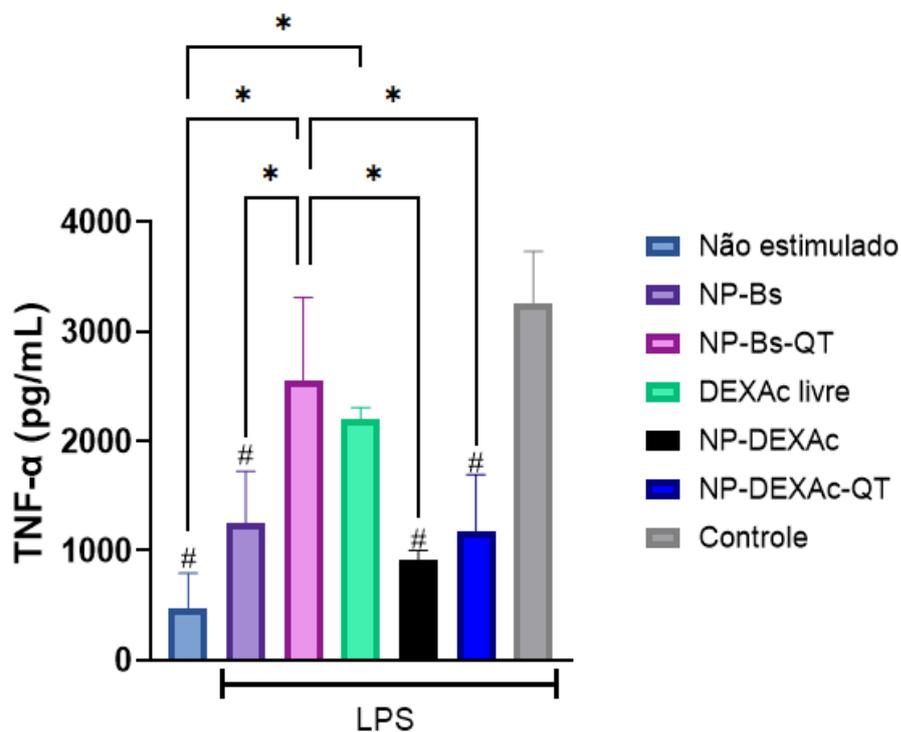


Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Os resultados encontrados para a inibição da IL-12 reforçam os indícios de que a presença da quitosana na superfície das nanopartículas seja capaz de modular os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Nesse caso, tanto as NP-Bs-QT quanto as NP-DEXAc-QT apresentaram maior redução nos níveis de IL-12 quando comparadas às NP-Bs. O efeito observado para as NP-Bs-QT foi, inclusive,

comparável ao observado para a DEXAc. A esse respeito, a literatura demonstra a atividade inibitória da quitosana, sob a forma de nanopartículas, sobre essa citocina em estudos *in vitro* (Gonçalves et al., 2015).

Figura 32 - Dosagem de TNF- $\alpha$  em linhagem J744A.1 estimulada com LPS e tratada com DEXAc, NP-Bs, NP-Bs-QT, NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT [n=4. Barras representam desvio padrão. Diferenças significativas ( $p>0,05$ ) em relação ao controle são marcadas por # e entre as amostras são marcadas por \*]



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Nesse caso, os resultados evidenciam que as nanopartículas contendo o fármaco (NP-DEXAc e NP-DEXAc-QT) apresentaram inibição significativamente maior que a observada para o controle, o que não ocorreu para a DEXAc livre. Além disso, é interessante observar que as NP-DEXAc-QT propiciaram uma maior diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  quando em comparação às NP-Bs-QT. Esses dados podem reforçar o efeito positivo da nanoestruturação do fármaco, bem como do revestimento das nanopartículas na modulação dessa citocina. Ademais, a diferença observada entre as nanopartículas revestidas (NP-DEXAc-QT e NP-Bs-QT) corroboram a hipótese do efeito sinérgico entre a DEXAc e a QT. Nesse sentido,

como já descrito, o efeito modulatório da QT frente à TNF- $\alpha$  já foi descrito na literatura (CHANG et al., 2019). Por fim, observamos novamente o inesperado efeito para as NP-Bs, o que, como já relatado, pode ser devido a interações não específicas entre as NP e a citocina (Simón-Vázquez et al., 2022).

## 6 CONCLUSÃO

Comparativamente à FDEX, a utilização do DEXAc mostrou-se mais adequada em relação à eficiência de incorporação do fármaco ( $EE = 83,7 \pm 1,04\%$ ), o que pode estar atrelado à diferença de solubilidade entre as diferentes formas de DEX. Após o revestimento das nanopartículas contendo ou não DEXAc, foi observado um aumento no DHm, além de uma inversão no PZ, o qual tornou-se essencialmente positivo. Tais modificações podem sugerir que o revestimento com QT foi adequadamente alcançado, o que foi corroborado pelas análises de MEV, DRX e FTIR. Ademais, as técnicas de DRX e FTIR permitiram comprovar a incorporação da DEXAc na matriz polimérica das nanopartículas. A esse respeito, também observamos uma elevada eficiência de encapsulação desse fármaco nas nanopartículas revestidas ( $EE = 78,5 \pm 0,26\%$ ). Por meio do ensaio de citotoxicidade, constatamos que a presença da QT pôde contribuir para uma maior tolerabilidade das células. Além disso, a formulação revestida propiciou inibição significativa dos mediadores inflamatórios. Dessa forma, o carreador desenvolvido apresentou características físico-químicas e atividade biológica satisfatórias e pode ser considerado promissor para futura aplicação no tratamento da SRAG associada à COVID-19.

## REFERÊNCIAS

- A VIGNALI, Dario A; KUCHROO, Vijay K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 722-728, 19 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2366>.
- A QURESHI, Asaf; TAN, Xiaoyu; REIS, Julia C; BADR, Mostafa Z; PAPASIAN, Christopher J; MORRISON, David C; QURESHI, Nilofer. Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by  $\delta$ -tocotrienol and quercetin. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 239, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-10-239>.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª Edição. Elsevier, 2015
- ABDIN, Shifaa M.; ELGENDY, Sara M.; ALYAMMAHI, Shatha K.; ALHAMAD, Dima W.; OMAR, Hany A.. Tackling the cytokine storm in COVID-19, challenges and hopes. **Life Sciences**, [S.L.], v. 257, p. 118054, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118054>.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed., 2019. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017
- AHMAD, Niyaz; AHMAD, Rizwan; ALRASHEED, Ridha Abdullah; ALMATAR, Hassan Mohammed Ali; AL-RAMADAN, Abdullah Sami; BUHEAZAH, Taysser Mohammed; ALHOMOUD, Hussain Salman; AL-NASIF, Hassan Ali; ALAM, Md Aftab. A Chitosan-PLGA based catechin hydrate nanoparticles used in targeting of lungs and cancer treatment. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 2344-2357, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.023>.
- Al, Fulu; ZHAO, Guohua; LV, Wu; LIU, Bin; LIN, Jie. Dexamethasone induces aberrant macrophage immune function and apoptosis. **Oncology Reports**, [S.L.], p. 254-263, 13 dez. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2019.7434>.
- ALESSI, Janine; OLIVEIRA, Giovana B. de; SCHAAN, Beatriz D.; TELO, Gabriela H.. Dexamethasone in the era of COVID-19: friend or foe? an essay on the effects of dexamethasone and the potential risks of its inadvertent use in patients with diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-11, 7 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13098-020-00583-7>
- AL-HALLAK, Mhd Kamal; SARFRAZ, Muhammad Khan; AZARMI, Shirzad; ROA, Wilson H; FINLAY, Warren H; LÖBENBERG, Raimar. Pulmonary delivery of inhalable nanoparticles: dry powder inhalers. **Therapeutic Delivery**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 1313-1324, out. 2011. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/tde.11.100>.
- ALI, Hazem; KALASHNIKOVA, Irina; WHITE, Mark Andrew; SHERMAN, Michael; RYTTING, Erik. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 454, n. 1, p. 149-157, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.010>.

AL-NEMRAWI, Nusaiba; ALSHRAIEDEH, Nid'a; ZAYED, Aref; ALTAANI, Bashar. Low Molecular Weight Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles for Pulmonary Delivery of Tobramycin for Cystic Fibrosis. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 28, 8 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph11010028>

AMARAL, Andre Correa; SAAVEDRA, Pedro H.V.; SOUZA, Ana Camila Oliveira; MELO, Maryanne Trafani de; TEDESCO, Antonio Claudio; MORAIS, Paulo Cesar; FELIPE, Maria Sueli Soares; BOCCA, Anamelia Lorenzetti. Miconazole loaded chitosan-based nanoparticles for local treatment of vulvovaginal candidiasis fungal infections. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 174, p. 409-415, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.048>.

ANWER, M. K.; JAMIL, S.; ANSARI, M. J.; IQBAL, M.; IMAM, F.; SHAKEEL, F.. Development and evaluation of olmesartan medoxomil loaded PLGA nanoparticles. **Materials Research Innovations**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 193-197, 15 abr. 2016. Maney Publishing. <http://dx.doi.org/10.1179/1433075x15y.0000000049>.

ARAF, Mona G. Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles for Enhanced Ocular Anti-Inflammatory Efficacy of Atorvastatin Calcium. **International Journal Of Nanomedicine**, Cairo, v. 5, n. 15, p. 1335-1347, mar. 2020.

ARDANI, H K; IMAWAN, C; HANDAYANI, W; DJUHANA, D; A HARMOKO,; FAUZIA, V. Enhancement of the stability of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of Diospyros discolor Willd. leaves using polyvinyl alcohol. **Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S.L.], v. 188, p. 012056, abr. 2017. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1757-899x/188/1/012056>.

ASTETE, Carlos E.; SABLIOV, Cristina M.. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. **Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 247-289, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1163/156856206775997322>

AZZAZY, Hassan Mohamed El-Said; FAHMY, Sherif Ashraf; MAHDY, Noha Khalil; MESELHY, Meselhy Ragab; BAKOWSKY, Udo. Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles Loaded with Peganum harmala Alkaloids with Promising Antibacterial and Wound Healing Activities. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 2438, 18 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano11092438>.

BARBOSA, Ana Isabel; LIMA, Sofia A. Costa; REIS, Salette. Development of methotrexate loaded fucoidan/chitosan nanoparticles with anti-inflammatory potential and enhanced skin permeation. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 124, p. 1115-1122, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.014>.

BEGINES, Belén; ORTIZ, Tamara; PÉREZ-ARANDA, María; MARTÍNEZ, Guillermo; MERINERO, Manuel; ARGÜELLES-ARIAS, Federico; ALCUDIA, Ana. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: recent developments and future prospects. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1403, 19 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano10071403>.

BHATT, Priyanka; FNU, Gulimierouzi; BHATIA, Deepak; SHAHID, Amna; SUTARIYA, Vijaykumar. Nanodelivery of Resveratrol-Loaded PLGA Nanoparticles for Age-Related Macular Degeneration. **Aaps Pharmscitech**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 1-

9, 21 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-020-01836-4>.

BUDHIAN, Avinash; SIEGEL, Steven J.; WINEY, Karen I.. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 336, n. 2, p. 367-375, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.061>.

CAMPOS, Izabella Maria Ferreira; SANTOS, Thiago Melo; CUNHA, Gabriella Maria Fernandes; SILVA, Kláudia Maria Machado Neves; DOMINGUES, Rosana Zacarias; CUNHA JÚNIOR, Armando da Silva; FIGUEIREDO, Kátia Cecília de Souza. Preparation and release characteristics of dexamethasone acetate loaded organochlorine-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Journal Of Applied Polymer Science**, [S.L.], v. 131, n. 23, p. 1-6, 15 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/app.41199>.

CHANG, Shun-Hsien; LIN, Yi-Yung; WU, Guan-James; HUANG, Chung-Hsiung; TSAI, Guo Jane. Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 131, p. 167-175, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.066>

CHATZITAKI, Aikaterini-Theodora; JESUS, Sandra; KARAVASILI, Christina; ANDREADIS, Dimitrios; FATOUROS, Dimitrios G.; BORGES, Olga. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: in vitro and ex vivo evaluation of efficacy and safety. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 589, p. 119776, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119776>.

CHRONOPOULOU, Laura; MASSIMI, Mara; GIARDI, Maria Federica; CAMETTI, Cesare; DEVIRGILIIS, Laura Conti; DENTINI, Mariella; PALOCCI, Cleofe. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: a sustained drug release strategy for cell cultures. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 103, p. 310-317, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.063>.

COUVREUR, P.. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 21-23, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.010>;

DANDAMUDI, Madhuri; MCLOUGHLIN, Peter; BEHL, Gautam; RANI, Sweta; COFFEY, Lee; CHAUHAN, Anuj; KENT, David; FITZHENRY, Laurence. Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles Encapsulating Triamcinolone Acetonide as a Potential Candidate for Sustained Ocular Drug Delivery. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1590, 30 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13101590>.

DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; BRETON, Aude Le; PRÉAT, Véronique. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 161, n. 2, p. 505-522, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>

DURÁN, Verónica; YASAR, Hanzey; BECKER, Jennifer; THIYAGARAJAN, Durairaj; LORETZ, Brigitta; KALINKE, Ulrich; LEHR, Claus-Michael. Preferential uptake of chitosan-coated PLGA nanoparticles by primary human antigen presenting

cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S.L.], v. 21, p. 102073, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2019.102073>

FELDMANN, Marc; MAINI, Ravinder N; WOODY, James N; HOLTGATE, Stephen T; WINTER, Gregory; ROWLAND, Matthew; RICHARDS, Duncan; HUSSELL, Tracy. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10234, p. 1407-1409, maio 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30858-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30858-8).

FIOLET, Thibault; KHERABI, Yousra; MACDONALD, Conor-James; GHOSN, Jade; PEIFFER-SMADJA, Nathan. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 202-221, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>.

GARAKANI, Sadaf Saeedi; DAVACHI, Seyed Mohammad; BAGHER, Zohreh; ESFAHANI, Anahita Heraji; JENABI, Niki; ATOUFI, Zhaleh; KHANMOHAMMADI, Mehdi; ABBASPOURRAD, Alireza; RASHEDI, Hamid; JALESSI, Maryam. Fabrication of chitosan/polyvinylpyrrolidone hydrogel scaffolds containing PLGA microparticles loaded with dexamethasone for biomedical applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 164, p. 356-370, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.138>.

GARCÍA-CERDA, L.A.; ESCAREÑO-CASTRO, M.u.; SALAZAR-ZERTUCHE, M.. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-cobalt ferrite nanocomposites. **Journal Of Non-Crystalline Solids**, [S.L.], v. 353, n. 8-10, p. 808-810, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2006.12.046>.

GARG, Unnati; CHAUHAN, Swati; NAGAICH, Upendra; JAIN, Neha. Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 195-204, 1 jun. 2019. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2019.023>.

GONÇALVES, Raquel Madeira; PEREIRA, Ana Catarina Leite; PEREIRA, Inês Odila; OLIVEIRA, Maria José; BARBOSA, Mário Adolfo. Macrophage response to chitosan/poly-( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles carrying an anti-inflammatory drug. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 327-345, 20 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-015-5496-1>

GU, Pengfei; WUSIMAN, Adelijiang; ZHANG, Yue; LIU, Zhenguang; BO, Ruonan; HU, Yuanliang; LIU, Jiaguo; WANG, Deyun. Rational Design of PLGA Nanoparticle Vaccine Delivery Systems To Improve Immune Responses. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 5000-5012, 17 out. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00860>.

HATHOUT, Rania M.; A MAHMOUD, Orchid; ALI, Dalia s; MAMDOUH, Marina; A METWALLY, Abdelkader. Modeling Drugs-PLGA Nanoparticles Interactions Using Gaussian Processes: pharmaceutical informatics approach. **Biomaterials**, [S.L.], v. /, n. /, p. 1-8, 20 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.20944/preprints202104.0524.v1>.

HAWLEY, Lewis R.J. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 15th Ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

HINES, Daniel J.; KAPLAN, David L.. Poly(lactic-co-glycolic) Acid-Controlled-Release Systems: experimental and modeling insights. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 257-276, 2013. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013006475>

HUANG, Rui; ZHU, Chuanwu; WANG, Jian; XUE, Leyang; LI, Chunyang; YAN, Xiaomin; HUANG, Songping; ZHANG, Biao; ZHU, Li; XU, Tianmin. Corticosteroid therapy is associated with the delay of SARS-CoV-2 clearance in COVID-19 patients. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 889, p. 173556, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173556>.

ISIDORI, Andrea M; POFI, Riccardo; HASENMAJER, Valeria; LENZI, Andrea; PIVONELLO, Rosario. Use of glucocorticoids in patients with adrenal insufficiency and COVID-19 infection. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 472-473, jun. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2213-8587\(20\)30149-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2213-8587(20)30149-2).

ISLAM, Nazrul; FERRO, Vito. Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. **Nanoscale**, [S.L.], v. 8, n. 30, p. 14341-14358, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6nr03256g>.

ISMAIL, Ruba; SOVÁNY, Tamás; GÁCSI, Attila; AMBRUS, Rita; KATONA, Gábor; IMRE, Norbert; CSÓKA, Ildikó. Synthesis and Statistical Optimization of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Encapsulating GLP1 Analog Designed for Oral Delivery. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 1-16, 13 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-019-2620-9>.

JIN, Ying-Hui; CAI, Lin; CHENG, Zhen-Shun; CHENG, Hong; DENG, Tong; FAN, Yi-Pin; FANG, Cheng; HUANG, Di; HUANG, Lu-Qi. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). **Military Medical Research**, [S.L.], v. 7, n. 1, 6 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40779-020-0233-6>.

KALLIOLIAS, George D.; IVASHKIV, Lionel B.. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 49-62, 10 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.

KANG, Ra-Hye; KWON, Ji-Yeong; KIM, Yeojin; LEE, Sang-Min. Cisplatin-Mediated Formation of Polyampholytic Chitosan Nanoparticles with Attenuated Viscosity and pH-Sensitive Drug Release. **Langmuir**, [S.L.], v. 33, n. 36, p. 9091-9099, 30 ago. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02043>.

KESHTA, Mohamed S.; ALARABI, Dalal; ABOUSALEH, Mohammad A.; SALMAN, Mustafa Thaer; TAHA, Omer E.; ZEIDAN, Anas A.. COVID-19 versus SARS: a comparative review. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 967-977, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.04.007>.

KHANAL, Shalil; ADHIKARI, Udhav; RIJAL, Nava; BHATTARAI, Shanta; SANKAR, Jagannathan; BHATTARAI, Narayan. PH-Responsive PLGA Nanoparticle for Controlled Payload Delivery of Diclofenac Sodium. **Journal Of Functional**

**Biomaterials**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 21, 2 ago. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jfb7030021>

KIM, Dong-Hwan; MARTIN, David C.. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. **Biomaterials**, [S.L.], v. 27, n. 15, p. 3031-3037, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.12.021>.

KIM, Dong-Hyun; NGUYEN, Thu Nhan; HAN, Young-Min; TRAN, Phuong; RHO, Jinhung; LEE, Jae-Young; SON, Hwa-Young; PARK, Jeong-Sook. Local drug delivery using poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in thermosensitive gels for inner ear disease treatment. **Drug Delivery**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 2268-2277, 1 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2021.1992041>

KIZILBEY, Kadriye. Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method. **ACS Omega**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 555-562, 8 jan. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.8b02767>

KORHONEN, Riku; LAHTI, Aleks; HÄMÄLÄINEN, Mari; KANKAANRANTA, Hannu; MOILANEN, Eeva. Dexamethasone Inhibits Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production by Destabilizing mRNA in Lipopolysaccharide-Treated Macrophages. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 698-704, 1 set. 2002. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.62.3.698>.

KUMAR, Vijay; LEEKHA, Ankita; TYAGI, Aakriti; KAUL, Ankur; MISHRA, Anil Kumar; VERMA, Anita Kamra. Preparation and evaluation of biopolymeric nanoparticles as drug delivery system in effective treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 654-667, 17 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-2094-y>.

LAKKIREDDY, Harivardhan Reddy; BAZILE, Didier. Building the design, translation and development principles of polymeric nanomedicines using the case of clinically advanced poly(lactide(glycolide))-poly(ethylene glycol) nanotechnology as a model: an industrial viewpoint. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 107, p. 289-332, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.012>.

LEMARCHAND, Caroline; GREF, Ruxandra; COUVREUR, Patrick. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 327-341, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.02.016>.

LI, Sha; ZENG, Ying-Chun; PENG, Ke; LIU, Chang; ZHANG, Zhi-Rong; ZHANG, Ling. Design and evaluation of glomerulus mesangium-targeted PEG-PLGA nanoparticles loaded with dexamethasone acetate. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 143-150, 27 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-018-0052-4>.

LIU, Qin; XU, Kaiyuan; WANG, Xiang; WANG, Wenmei. From SARS to COVID-19: what lessons have we learned?. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 1611-1618, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2020.08.001>.

LU, Boting; LV, Xikun; LE, Yuan. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. **Polymers**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 304, 12 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11020304>.

MAKADIA, Hirenkumar K.; SIEGEL, Steven J.. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 26 ago. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym3031377>.

MAL, Xiaojing; TRINCHIERI, Giorgio. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. **Advances In Immunology**, [S.L.], p. 55-92, 2001. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)79002-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776(01)79002-5).

MALIK, Jonaid Ahmad; AHMED, Sakeel; MIR, Aroosa; SHINDE, Mrunal; BENDER, Onur; ALSHAMMARI, Farhan; ANSARI, Mukhtar; ANWAR, Sirajudheen. The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: new opportunities to new challenges. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 228-240, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.12.014>.

MARTÍN-SABROSO, Cristina; TAVARES-FERNANDES, Daniel Filipe; ESPADA-GARCÍA, Juan Ignacio; TORRES-SUÁREZ, Ana Isabel. Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: dexamethasone phosphate disodium microparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 458, n. 1, p. 188-196, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.026>.

MATTOS-SILVA, Paula; FELIX, Nathane Santanna; SILVA, Pedro Leme; ROBBA, Chiara; BATTAGLINI, Denise; PELOSI, Paolo; ROCCO, Patricia Rieken Macedo; CRUZ, Fernanda Ferreira. Pros and cons of corticosteroid therapy for COVID-19 patients. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, [S.L.], v. 280, p. 103492-103498, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2020.103492>

MENDES, Bárbara Simão. COVID-19 e SARS. **Ulakes Journal Med**, [S.I.], v. 1, n. 0, p. 41-49, jan. 2020

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J.. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 563-580, jan. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700\(97\)00048-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700(97)00048-8).

MIR, Maria; AHMED, Naveed; REHMAN, Asim Ur. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 159, p. 217-231, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.038>.

MOHAMMADI, Ghobad; FATHIAN-KOLAHKAJ, Mostafa; MOHAMMADI, Pardis; ADIBKIA, Khosro; FATTAHI, Ali. Preparation, Physicochemical Characterization and Anti-Fungal Evaluation of Amphotericin B-Loaded PLGA-PEG-Galactosamine Nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 311-317, 15 jul. 2020. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.34172/apb.2021.044>.

MONTAZERSAHEB, Soheila; KHATIBI, Seyed Mahdi Hosseiniyan; HEJAZI, Mohammad Saeid; TARHRIZ, Vahideh; FARJAMI, Afsaneh; SORBENI, Faramarz Ghasemian; FARAHAZADI, Raheleh; GHASEMNEJAD, Tohid. COVID-19 infection: an

overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 153-162, 26 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>

NAPOLEÃO, Raffaella Neves Mont'Alverne; SANTIAGO, Ana Beatriz Gomes; MOREIRA, Mariella Almeida; SILVA, Sônia Leite da; SILVA, Silvia Fernandes Ribeiro da. COVID-19: compreendendo a .:tempestade de citocinas::. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 437-445, 12 maio 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.15150>.

NOREEN, Sobia; MAQBOOL, Irsah; MADNI, Asadullah. Dexamethasone: therapeutic potential, risks, and future projection during covid-19 pandemic. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 894, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173854>.

NOREEN, Sobia; MAQBOOL, Irsah; MADNI, Asadullah. Dexamethasone: therapeutic potential, risks, and future projection during covid-19 pandemic. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 894, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173854>.

OCHANI, Rohan Kumar. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. **Le Infezioni In Medicina**, Salerno, v. 1, n. 1, p. 20-36, mar. 2021.

OPERTI, Maria Camilla; BERNHARDT, Alexander; GRIMM, Silko; ENGEL, Andrea; FIGDOR, Carl Gustav; TAGIT, Oya. PLGA-based nanomedicines manufacturing: technologies overview and challenges in industrial scale-up. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 605, p. 120807, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120807>.

Park SE. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome - coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease19). *Clinical and Experimental Pediatrics*; 2020.

PATHAK, Yashwant; ISLAM, Nazrul (ed.). **Handbook of Lung Targeted Drug Delivery Systems**: recent trends and clinical evidences. [S.L.]: Taylor & Francis Group, 2021

PEREIRA, Valdir Aniceto; ARRUDA, Iza Natália Queiroz de; STEFANI, Ricardo. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 43, p. 180-188, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014>.

POLUHA, Rodrigo Lorenzi; GROSSMANN, Eduardo. Inflammatory mediators related to arthrognathic temporomandibular dysfunctions. **Brazilian Journal Of Pain**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 60-65, 2018. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20180013>.

POURHAJIBAGHER, Maryam; AZIMI, Maryam; HADDADI-ASL, Vahid; AHMADI, Hanie; GHOLAMZAD, Mehrdad; GHORBANPOUR, Sara; BAHADOR, Abbas. Robust antimicrobial photodynamic therapy with curcumin-poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles against COVID-19: a preliminary in vitro study in vero cell line as a

model. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 34, p. 102286, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102286>.

RAJITHA, P.; GOPINATH, Divya; BISWAS, Raja; SABITHA, M.; JAYAKUMAR, R.. Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1177-1194, 2 maio 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2016.1178232>.

RANG, H.P; DALE, M.M. **Editora Elsevier, 8ªedição, 2016**. Farmacologia Clínica. Fuchs, F.D.; Wannmacher, L. Editora Guanabara Koogan, 4ªedição, 2010.

RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E.. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 887-913, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>.

RAWAL T, PARMAR R, TYAGI RK, BUTANI S. Rifampicin loaded chitosan nanoparticle dry powder presents an improved therapeutic approach for alveolar tuberculosis. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 2017;154:321-30. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.044

RECOVERY GROUP. **Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. The New England Journal Of Medicine**, [S.L.], p. 693-704, fev. 2021.

RENÇBER, Seda; KÖSE, Fadime Aydın; KARAVANA, Sinem Yaprak. Dexamethasone loaded PLGA nanoparticles for potential local treatment of oral precancerous lesions. **Pharmaceutical Development And Technology**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 149-158, 22 nov. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2019.1673407>.

RIBEIRO, Susana Barbosa; ARAĐJO, Aurigena Antunes de; OLIVEIRA, Maisie Mitchele Barbosa; SILVA, Alaine Maria dos Santos; SILVA-JĐNIOR, Arnóbio Antônio da; GUERRA, Gerlane Coelho Bernardo; BRITO, Gerly Anne de Castro; LEITÃO, Renata Ferreira de Carvalho; ARAĐJO JUNIOR, Raimundo Fernandes de; GARCIA, Vinícius Barreto. Effect of Dexamethasone-Loaded PLGA Nanoparticles on Oral Mucositis Induced by 5-Fluorouracil. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 53, 4 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13010053>.

RYU, Woo Mi; KIM, Se-Na; MIN, Chang Hee; CHOY, Young Bin. Dry Tablet Formulation of PLGA Nanoparticles with a Preocular Applicator for Topical Drug Delivery to the Eye. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 651, 4 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics11120651>.

SAH, Hongkee; DESU; SAH; WOOD; THOMA. Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], p. 747, fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s40579>.

SALIAN, Vrishali S.; WRIGHT, Jessica A.; VEDELL, Peter T.; NAIR, Sanjana; LI, Chenxu; KANDIMALLA, Mahathi; TANG, Xiaoja; PORQUERA, Eva M. Carmona; KALARI, Krishna R.; KANDIMALLA, Karunya K.. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v.

18, n. 3, p. 754-771, 19 jan. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608>.

Shi H, Han X, Jiang N, Cao Y, Alwalid O, Gu J, et al. Radiological findings from 81 patients with COVID19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*; 2020.

SILVA, Gisele Rodrigues da; SILVA-CUNHA, Armando da; BEHAR-COHEN, Francine; AYRES, Eliane; ORÉFICE, Rodrigo L.. Biodegradable polyurethane nanocomposites containing dexamethasone for ocular route. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 414-422, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2010.10.019>.

SILVA, Natália Prado da; PEREIRA, Eloá do Carmo Rapozo Lavinias; DUARTE, Lucas Mattos; FREITAS, Jhamine Caroline de Oliveira; ALMEIDA, Camila Guimarães de; SILVA, Thiago Pereira da; MELO, Rossana C.N.; APOLÔNIO, Ana Carolina Morais; OLIVEIRA, Marcone Augusto Leal de; BRANDÃO, Humberto de Mello. Improved anti-Cutibacterium acnes activity of tea tree oil-loaded chitosan-poly( $\epsilon$ -caprolactone) core-shell nanocapsules. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 196, p. 111371, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111371>.

SIMÓN-VÁZQUEZ, Rosana; TSAPIS, Nicolas; LORSCHIEDER, Mathilde; RODRÍGUEZ, Ainhoa; CALLEJA, Patricia; MOUSNIER, Ludivine; VILLEGAS, Encarnación de Miguel; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, África; FATTAL, Elias. Improving dexamethasone drug loading and efficacy in treating arthritis through a lipophilic prodrug entrapped into PLGA-PEG nanoparticles. **Drug Delivery And Translational Research**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1270-1284, 6 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-021-01112-3>

SINGH, Pankaj K.; SAH, Prachi; MEHER, Jaya Gopal; JOSHI, Sumit; PAWAR, Vivek K.; RAVAL, Kavita; SINGH, Yuvraj; SHARMA, Komal; KUMAR, Animesh; DUBE, Anuradha. Macrophage-targeted chitosan anchored PLGA nanoparticles bearing doxorubicin and amphotericin B against visceral leishmaniasis. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 6, n. 75, p. 71705-71718, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra06007b>

SINGH, Pankaj K.; SAH, Prachi; MEHER, Jaya Gopal; JOSHI, Sumit; PAWAR, Vivek K.; RAVAL, Kavita; SINGH, Yuvraj; SHARMA, Komal; KUMAR, Animesh; DUBE, Anuradha. Macrophage-targeted chitosan anchored PLGA nanoparticles bearing doxorubicin and amphotericin B against visceral leishmaniasis. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 6, n. 75, p. 71705-71718, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra06007b>.

SIU, Frederick; YE, Shaotang; LIN, Hui; LI, Shoujun. Galactosylated PLGA nanoparticles for the oral delivery of resveratrol: enhanced bioavailability and in vitro anti-inflammatory activity. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 13, p. 4133-4144, jul. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s164235>.

TAVARES, Guilherme Diniz; GONÇALVES, José Eduardo; MONTEIRO, Lis Marie; LÖBENBERG, Raimar; STORPIRTIS, Silvia; BOU-CHACRA, Nádia Araci; CONSIGLIERI, Vladi Olga. N,N,N-trimethylchitosan-poly (n-butylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles as a potential oral delivery system for acyclovir. **Colloids And**

**Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 196, p. 111336, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111336>.

UCAR, Burcu; ACAR, Tayfun; ARAYICI, Pelin Pelit; DERMAN, Serap. A nanotechnological approach in the current therapy of COVID-19: model drug oseltamivir-phosphate loaded plga nanoparticles targeted with spike protein binder peptide of sars-cov-2. **Nanotechnology**, [S.L.], v. 32, n. 48, p. 485601, 7 set. 2021. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1361-6528/ac1c22>.

VEN, H. van de; VERMEERSCH, M.; MATHEEUSSEN, A.; VANDERVOORT, J.; WEYENBERG, W.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A.. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin  $\beta$ -aescin: factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 420, n. 1, p. 122-132, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.016>.

WANG, Huihui; WAN, Nanwei; MA, Lin; WANG, Zhongqiang; CUI, Baodong; HAN, Wenying; CHEN, Yongzheng. A novel and simple spectrophotometric method for detection of nitrite in water. **The Analyst**, [S.L.], v. 143, n. 19, p. 4555-4558, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8an01063c>.

WANG, Jinli; WANG, Ruining; WANG, Hui; YANG, Xiaofan; YANG, Jiahui; XIONG, Wenjing; WEN, Qian; MA, Li. Glucocorticoids Suppress Antimicrobial Autophagy and Nitric Oxide Production and Facilitate Mycobacterial Survival in Macrophages. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 458-470, 20 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01174-9>

WANG, Zhao H.; WANG, Zhan Y.; SUN, Chang S.; WANG, Chun Y.; JIANG, Tong Y.; WANG, Si L.. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. **Biomaterials**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 908-915, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.104>

WAYS, Twana M.; LAU, Wing; KHUTORYANSKIY, Vitaliy. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. **Polymers**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 267, 5 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym10030267>.

WHO. **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic**. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acesso em: 15 ago. 2022.

WU, Di; WU, Tiantian; LIU, Qun; YANG, Zhicong. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 94, p. 44-48, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>.

YADAV, Khushwant; SAWANT, Krutika. Formulation Optimization of Etoposide Loaded PLGA Nanoparticles by Double Factorial Design and their Evaluation. **Current Drug Delivery**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 51-64, 1 jan. 2010. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156720110790396517>.

YANG, Eun-Jin; KIM, Jong-Gwan; KIM, Ji-Young; KIM, Seong; LEE, Nam; HYUN, Chang-Gu. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. **Open Life Sciences**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 95-102, 1 fev. 2010. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-009-0066-5>.

YE, Qing; WANG, Bili; MAO, Jianhua. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **Journal Of Infection**, [S.L.], v. 80, n. 6, p. 607-613, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>

YOUSSEF, Jameel; NOVOSAD, Shannon A.; WINTHROP, Kevin L.. Infection Risk and Safety of Corticosteroid Use. **Rheumatic Disease Clinics Of North America**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 157-176, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.004>.

ZHANG, Yongqin; XUE, Changhu; XUE, Yong; GAO, Ruichang; ZHANG, Xiuli. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, [S.L.], v. 340, n. 11, p. 1914-1917, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2005.05.005>.