



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**COMPLEXO NIMESULIDA-PRATA E ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA COM O
QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

Luis Eduardo Mosquera Narváez

Belém-PA

2020

Luis Eduardo Mosquera Narváez

**COMPLEXO NIMESULIDA-PRATA E ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA COM O
QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

A dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

Aluno: Luis Eduardo Mosquera Narvaez.

Orientador: Prof^a.Dr^a Marta Chagas Monteiro.

Coorientador: Prof. Claudio Nahum

Belém-PA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

M894c: Mosquera Narvaez, Lui Eduardo
COMPLEXO NIMESULIDA-PRATA E ASSOCIAÇÃO
POLIMÉRICA COM O QUITOSANA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA / Lui
Eduardo Mosquera Narvaez. — 2020.
98 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Coorientação: Prof^a. Dra. Claudio Nahum Alves
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. Cinética de liberação.. 2. Complexo de
coordenação.. 3. Anti-edematogênico.. 4.
Antimicrobiano. I. Título.

CDD 615.1900724

Agradecimentos

Visualizar nossos objetivos, traçar o caminho para chegar a eles e alcançá-los, mostram uma longa jornada; carregado de esforço e sacrifício. Na qual as contribuições dos próprios e dos estranhos constituem a força, de modo que, no final, a recompensa por todo esse esforço é o sonho mais doce que se realiza. É assim que agradecer ao Pai Celestial, doador de vida e bênção, o meu principal desejo, assim como agradecer a minha mãe, Maria Teresa, uma mulher de apoio incondicional, meus irmãos, David Mauricio e Fabio Enrique, que sempre me levaram pelo caminho certo, meus familiares que sempre estiveram me ensinando as coisas valiosas da vida e me incentivaram a lutar constantemente. Eles são os principais motores do meu esforço emocional para ter sucesso. A Adan Galue que sempre deu uma mão de apoio incondicional e Leidy Villa que sempre estive ao meu lado, a sua companhia incondicional neste processo, e quem sempre me escuto e me apoio nos piores momentos, a Bárbara Moura pelo seu amor incondicional, bons conselhos e apoio, que me acompanharam a minha vida toda, obrigado por acreditar em mim.

Nesse sentido, agradeço àqueles que academicamente orientaram, iluminaram e enriqueceram meu crescimento profissional, pesquisadora Marcela Piedad Carrillo, professora Maria Soledad e professor Licurgo Peixoto De Brito. Meus agradecimentos a todos os que participaram desta pesquisa. Aos meus colegas de classe que, com suas recomendações, me permitiram avançar. A Kelly Lima, Ana Oliveira, Rose Guimarães e Robson doutorandos, quines me ajudaram com as suas recomendações possibilitaram potencializar o trabalho de pesquisa. Leticia Gaspar, Lucas Quadros, Julhana, Kaio Murilo, colegas que sempre me apoiaram com todos os experimentos. Também sou infinitamente grato com todos os professores da Universidade, aqueles que contribuíram substancialmente para minha formação acadêmica e pessoal. Especialmente às professoras Roseane Ribeiro e Marta Chagas, que deram ferramentas e fundamentos para o meu trabalho. Por outro lado, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas à Universidade Federal Do Pará, pela oportunidade de me formar nas suas instalações e as agências financiadoras, CNPq, CAPES e OEA, pela ajuda financeira. O professor Enéas Fontes, o professor Antônio Carvalho, pela sua contribuição para melhorar este trabalho.

Sou imensamente grato aos meus amigos, colegas e companheiros de luta, Maira Corredor, Roger Galindo, Luisa Vásquez, Fabian Villalba, Eliana Buitrago, Diana Molina, que nos altos e baixos estavam fortalecendo meu ser e promovendo meu trabalho. Para todos eles, agradecimentos infinitos, só espero que a distância nos permita criar laços mais fortes de amizade e trabalho interdisciplinar.

Por fim, agradeço aos leitores deste trabalho por sua dedicação, apreciação e o uso que eles podem fazer desse conhecimento para fins educacionais.

RESUMO

COMPLEXO NIMESULIDA-PLATA E ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA COM O QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

As reações adversas pela administração oral e parenteral de AINEs estão associados distúrbios gastrointestinais, assim como a toxicidade hepática e renal. Nesse sentido, a liberação controlada pode reduzir as reações adversas e melhorar a eficácia terapêutica dos AINEs. Portanto, se propor complexos de coordenação (Nimesulida-prata) e a sua associação polimérica com a quitosana, como alternativa terapêutica, sendo necessário conhecer a cinética de liberação e os fatores que afetam atividade farmacológica e um possível sinergismo entre seus constituintes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-quimicamente o complexo e a sua associação polimérica com a quitosana, assim como avaliar atividade biológica *in vivo* com ação anti-inflamatória e *in vitro* com ação antimicrobiana. A metodologia teve três etapas fundamentais, a primeira foi a caracterização físico-química, através ensaios de solubilidade, análise UV-vis, análise IV, análise TGA, Morfologia e tamanho de partícula, no qual se ajustaram modelos cinéticos tanto para o complexo, como para a associação polimérica, de acordo com o fenômeno de difusão. A segunda etapa é a atividade biológica *in vitro*, obtendo a CIM e CBM por técnica de microdiluição. Na terceira etapa foi avaliada a atividade anti-inflamatória, por edema de pata induzido por carragenina. O rendimento na síntese do complexo e da associação polimérica foi de 83,29%W/W com tamanho médio de 18,70 μ m e 91,20%W/W com tamanho médio de 124,17 μ m respectivamente. Se conseguiu identificar a transferência de elétrons dos compostos e as modificações nas vibrações pela presença do íon metálico. Se identifico que o complexo apresenta o modelo cinético de Korsmeyer, enquanto que a associação polimérica apresenta o modelo de Weibull. Ambos compostos apresentam atividade antimicrobiana pela presença do íon prata, com maior sensibilidade para bactérias gram negativas. A associação polimérica mostrou melhor efeito anti-edematogênico. A partir deste estudo pode-se concluir que os compostos sintetizados são uma alternativa de liberação controlada, de acordo a sua estabilidade química dada pela constante de equilíbrio.

Palavras-chave: Cinética de liberação. Complexo de coordenação. Anti-edematogênico. Antimicrobiano

ABSTRACT

NIMESULIDA-SILVER COMPLEX AND POLYMERIC ASSOCIATION WITH CHITOSAN: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION

Adverse effects from oral and parenteral administration of NSAIDs are associated with gastrointestinal disorders, as well as liver and renal toxicity. In this sense, controlled release can reduce adverse effects and improve the therapeutic efficacy of NSAIDs. Therefore, if it proposes coordination complexes (Nimesulide-silver) and its polymeric association with chitosan, as a therapeutic alternative, it is necessary to know the release kinetics and the factors affecting pharmacological activity and a possible synergism between its constituents. The objective of this work was to physicochemically characterize the complex and its polymeric association with chitosan, as well as to evaluate biological activity *in vivo* with anti-inflammatory action and *in vitro* with antimicrobial action. The methodology had three fundamental stages, the first was the physical-chemical characterization, through solubility tests, UV-vis analysis, IV analysis, TGA analysis, Morphology and particle size, in which kinetic models were established for both the complex and for the polymeric association, according to the diffusion phenomenon. The second step is biological activity *in vitro*, obtaining MIC and CBM by microdilution technique. In the third stage, anti-inflammatory activity was evaluated, due to carrageenan-induced paw edema. The yield in the synthesis of the complex and the polymeric association was 83.29% W / W with an average size of 18.70 μ m and 91.20% W / W with an average size of 124.17 μ m respectively. It was possible to identify the electron transfer of the compounds and the changes in vibrations by the presence of the metal ion. It is identified that the complex presents the Korsmeyer kinetic model, while the polymeric association presents the Weibull model. Both compounds have antimicrobial activity due to the presence of the silver ion, with greater sensitivity to gram - bacteria. The polymeric association showed a better anti-edematogenic effect. From this study it can be concluded that the synthesized compounds are a controlled release alternative, according to their chemical stability given by the equilibrium constant.

Keywords: Release kinetics. Coordination complex. Anti-edematogenic. Antimicrobial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipo de prostaglandinas, efeito sobre alguns órgãos e os receptores involucrado	16
Tabela 2 Solubilidade da NMS em diferentes meios solventes a diferentes pH.....	20
Tabela 3 Solubilidade do complexo NMS ± L-lisina β-ciclodextrina Versus NMS pura em diferentes pH.....	21
Tabela 4 Modelos cinéticos mais amplamente usado, na avaliação de liberação de fármacos	34
Tabela 5 Avaliação da solubilidade dos complexos sintetizados NMS-Ag e NMS-Ag-Ch	39
Tabela 6 Delineamento experimental dos procedimentos in vivo.....	50
Tabela 7 Testes de solubilidade qualitativa, com três solventes diferentes à temperatura ambiente.....	59
Tabela 8 Resumo dos dados faixa de comprimento de onda teórica e experimental para o grupo das sulfonamidas	64
Tabela 9 Morfologia, tamanho e dados estatísticos das amostras das microparticulas sintetizadas	71
Tabela 10 coeficientes de correlação avaliados para os diferentes modelos cinéticos de liberação de fármaco do complexo NMS-Ag	74
Tabela 11 Coeficientes de correlação avaliados para os diferentes modelos cinéticos de liberação de fármaco da associação polimérica NMS-Ag-Ch	77
Tabela 12 CIM e CBM dos Compostos de NMS frente as cepas bacterianas ATCC	80

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Rota de biossíntese das prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Alvo dos anti-inflamatórios não-esteroidais.	14
Figura 2. Efeito da inibição das PG citoprotetoras pelos AINEs	18
Figura 3 Estrutura molecular de alguns AINEs com grupos funcionais sulfonil, amina e sulfonamida	20
Figura 4 Mecanismo de toxicidade da NMS. A) Possível transformação metabólica da NMS do grupo nitroso em hidroxilamina B.) Formação teórica de metabólitos reativos e seus efeitos sobre o desacoplamento mitocondrial da fosforilação oxidativa, depleção de ATP e apoptose através de Bcl.	23
Figura 5: Estrutura da quitosana	26
Figura 6: Solubilidade do quitosana dependendo da alteração do pH e do grau de desacetilação	27
Figura 7. Diferentes morfologias obtidas de micropartículas. A) Microcápsula; B) microcápsula multinucleada ou microesfera; C) microesfera irregular; D) cacho de microesferas irregulares; E); F) microcápsula com dupla parede.	28
Figura 8 Etapas do mecanismo de liberação das micropartículas por difusão em meio aquoso	31
Figura 9 Fluxograma do processo de síntese do complexo NMS-Ag	37
Figura 10 Procedimento da associação polimérica com a quitosana	38
Figura 11 Esquema do procedimento da cinética de liberação	43
Figura 12 Procedimentos preparação das concentrações das soluções de trabalho, onde Vf é o volume final.....	45
Figura 13 Procedimentos preparação do inóculo Bacteriano	46
Figura 14 Quantidades usadas para cada um dos poços de dissolução, para a avaliação da amostra, controle positivo, controle negativo e controle de inóculo	47
Figura 15 Representação Esquemática da Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).	54
Figura 16 Representação esquemática da determinação da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox.....	55
Figura 17 Representação esquemática de determinação da atividade da glutathiona reduzida (GSH).	56
Figura 18 Ionização da estrutura da nimesulida e ressonância.....	57
Figura 19 Processo de obtenção do complexo NMS-Ag. A-) Produto final da síntese do complexo NMS-Ag. B-) Material obtido após filtração a frio. C-) Mudança de cor do material após o processo de secagem a 40 ° C.....	58
Figura 20 Associação polimérica entre Ch e o complexo NMS-Ag. A-) Diagrama da possível interação do complexo NMS-Ag-Ch. B-). Sólido obtido por centrifugação.	59
Figura 21 Testes de solubilidade qualitativa dos complexos sintetizados em três solventes A-) complexo NMS-Ag B) complexo NMS-Ag-Ch.....	60
Figura 22 Curva de calibração da NMS em metanol avaliada ao comprimento de onda de 295 nm	61
Figura 23 Espectro de absorção ultravioleta para NMS puro (azul), para complexo NMS-Ag (vermelho), quitosana pura (amarelo) e complexo NMS-Ag-Ch (verde)	62
Figura 24 Espectro infravermelho da NMS	64
Figura 25 Espectro infravermelho do complexo Nimesulide-Prata (NMS-Ag)	65

Figura 26 Espectro infravermelho de NMS pura (vermelho) e NMS-Ag (azul) na área da impressão digital.....	66
Figura 27 Espectro infravermelho do complexo NMS-Ag-Ch.....	67
Figura 28 Análise termogravimétrica realizada no complexo NMS-Ag, em modo dinâmico a uma taxa de aquecimento de 10 ° C / min e atmosfera de nitrogênio	68
Figura 29 Análise termogravimétrica realizada no complexo NMS-Ag-Ch, em modo dinâmico a uma taxa de aquecimento de 10 ° C / min e atmosfera de nitrogênio	69
Figura 30 Diagrama de caixas da Morfologia das micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch	70
Figura 31 Diagrama de caixas do tamanho das micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch	71
Figura 32 Curva de calibração da NMS em buffer Fosfatos 7,4 com absorbância a 394 nm	72
Figura 33 Cinética de liberação para as micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, de acordo a NMS% liberado em função do tempo.....	73
Figura 34 Modelos cinéticos com melhores coeficientes de correlação, para o complexo NMS-Ag A-) Modelo de Korsmeyer B-) Modelo de Weibull.....	75
Figura 35 Representação gráfica do processo de difusão da NMS do complexo NMS-Ag...	76
Figura 36 Modelos cinéticos com melhores coeficientes de correlação, para a associação polimérica NMS-Ag-Ch A-) Modelo de Korsmeyer B-) Modelo de Weibull	77
Figura 37 Representação gráfica do processo de difusão da NMS da associação polimérica NMS-Ag-Ch.....	78
Figura 38 Aspecto das micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch antes da cinética de liberação (T0) e aspecto das micropartículas ao final da cinética de liberação (Tf)	78
Figura 39 Procedimento para a avaliação anti-inflamatório de cada um dos compostos no processo induzido por carragenina	81
Figura 40 Avaliação da NMS, o complexo NMS-Ag, e associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch em modelo de edema de pata induzido por carragenina e avaliação dos parâmetros do estresse oxidativo. A) Evolução do edema no tempo. B) Avaliação do edema nos tempos de 60, 90 e 120 min. C) Fotografias da evolução do edema nos tempos de 60, 90 e 120 min. D) Avaliação de TBARS aos 240 min na pata do animal. E) Avaliação de TEAC aos 240 min na pata do animal. F) Avaliação de GSH aos 240 min na pata do animal.....	84

LISTA DE ABREVIações, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

IV	Infravermelho
UV-vis	Ultravioleta visível
TGA	Termogravimetria
DTG	Derivada da curva de Termogravimétria
NMS	Nimesulida
Ag ⁺	Íon Prata
Ch	Quitosana
PPGF	Programa de Pós-Graduação do em Física
PPGCF	Programa de Pós-Graduação do em Ciências Farmacêuticas
COX-1	Enzima Ciclooxygenase 1
COX-2	Enzima Ciclooxygenase 2
AINES	Anti-inflamatórios Não-esteróides
NMS-Ag	Complexo nimesulida-prata
NMS-Ag-Ch	Complexo de Nimesulida-prata com revestimento de quitosana
EROs	Espécies reativas de oxigênio
NADP	Enzima nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato
PABA	Ácido pata aminoácido benzoico
DHPPP	7,8-di-hidro-6-hidroxipterin-pirofosfato
DHPS	Enzima di-hidroperato sintetase
DMSO	Dimetilsulfoxido
ATP	Adenosina trifosfato
AgNPs	Nanopartículas de prata
Papp	Coefficiente de permeabilidade aparente
PGE2	Prostaglandina E2
Cs	Concentração de saturação
SED	Sistema de entrega de drogas
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Inflamação	13
2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	15
2.3 Funções fisiológicas das COX e PG	15
2.4 Nimesulida (NMS)	19
2.4.1 TOXICIDADE DA NMS	22
2.5 Complexos	24
2.6 Uso da prata para fins terapêuticos	25
2.7 Quitosana	26
2.8 Sistemas Micro-particulados	28
2.8.1 MECANISMOS DE LIBERAÇÃO.....	29
2.8.2 MODELOS CINÉTICOS	32
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Síntese e caracterização do complexo Nimesulida-Prata (NMS-Ag) e associação polimérica com o quitosana, Nimesulida-Prata-Quitosana (NMS-Ag-Ch)	36
4.1.1. REAGENTES EMPREGADOS NA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO E A SUA ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA.....	36
4.1.2 SÍNTESE DO COMPLEXO NIMESULIDA - PRATA (NMS-AG).....	36
4.1.3 ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA COM A QUITOSANA.....	37
4.1.4 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE DO COMPLEXO (NMS-Ag) E ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA (NMS-Ag-Ch)	38
4.1.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO – CONTEÚDO DE NMS NAS MICROPARTÍCULAS..	39
4.1.5.1 Solução padrão de NMS 0,05mg/mL.....	39
4.1.5.2 Construção da Curva Analítica	39
4.1.5.3 Determinação de NMS nas micropartículas	39
4.1.6 ANÁLISE ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV- Vis)	40
4.1.7 ANALISE INFRA VERMELHO (IV)	40
4.1.8. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	40
4.1.9. MORFOLOGIA E TAMANHO DAS PARTÍCULAS	41

4.1.10 CURVA DE CALIBRAÇÃO - CINÉTICA DE LIBERAÇÃO pH 7,4	41
4.1.10.1 Solução padrão de NMS 0,02mg/mL	41
4.1.10.2 Construção da Curva Analítica	42
4.1.11 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO	42
4.2 Avaliação biológica das micropartículas	43
4.2.1 ANALISE MICROBIOLÓGICA	43
4.2.1.1 Reagentes empregados no análise microbiologica do complexo e a sua associação polimérica	43
4.2.1.1.1 Meios de cultura	43
4.2.1.1.2 Cepas dos micro-organismos testados	44
4.2.1.2 Preparação das concentrações das soluções de trabalho	44
4.2.1.3 Preparo do inóculo bacteriano	45
4.2.1.4. Concentração inibitória mínima (CIM)	46
4.2.1.5 Concentração bactericida mínima (CBM)	47
4.2.2 AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA	48
4.2.2.1 Reagentes empregados no análise anti-inflamatório do complexo e a sua associação polimérica	48
4.2.2.2 Animais em experimentação	48
4.2.2.2.1 <i>Obtenção dos animais e eutanásia</i>	48
4.2.2.2.2 <i>Delineamento experimental e esquema terapêutico</i>	50
4.2.2.2.3 Esquema para o tratamento de ação anti-inflamatória da NMS, o complexo NMS-Ag e a associação polimérica NMS-Ag-Ch	51
4.2.3 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	52
4.2.3.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	53
4.2.3.2 Determinação da capacidade antioxidante total equivalente ao trolox (teac)	54
4.2.3.3 Determinação da glutatona reduzida	55
4.3 Análise estatística	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Síntese do Complexo Nimesulida - Prata (NMS-Ag)	57
5.2. Associação polimérica com a Quitosana	58
5.3 Ensaio de solubilidade dos complexos NMS-Ag e NMS-Ag-Ch e Quantificação da NMS nas amostras	59
5.4 Caracterização do complexo NMS-Ag e NMS-Ag-Ch	61
5.4.1 ANÁLISE DA ABSORBÂNCIA NO ESPECTRO UV-VIS	62
5.4.2 ANALISE DO ESPECTRO INFRAVERMELHO (IV)	63
5.4.3 ANALISE TERMOGRAVIMÉTRICO TGA	68
5.5 Morfologia e tamanho das partículas	70

5.6 Cinética de liberação a pH 7,4	71
5.7 Atividade biológica	78
5.7.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	78
5.7.2 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO COMPLEXO E SUA ASSOCIAÇÃO POLIMERICA COM A QUITOSANA.....	80
6. CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

A inflamação se caracteriza por ser uma resposta generalizada e não específica a um processo infeccioso ou uma agressão tecidual na tentativa de reestabelecer a homeostase do organismo (Pereira, 2013; Florentino et al. 2017). A terapia atual para inflamação e dor se baseia na utilização de fármacos opióides (dexametasona, prednisona) e AINES (naproxeno, ibuprofeno, nimesulida) entre outros. Os AINES apresentam boa atividade terapêutica, e podem ser usadas no tratamento de várias doenças, incluindo artrite reumatóide, osteoartrite, dor leve e moderada, dismenorréia, dores musculares, cefaléia, febre, tendinite, sinovite, entre outros (BHATTACHARYA et al., 2010, SINGH et al., 2010).

A Nimesulida pertence à classe farmacológica dos AINES, especialmente ao grupo sulfonilida, usada em inflamações do trato respiratório, tendinite, sinovite e artrite reumatoide (SINGLA; CHAWLA; SINGH, 2000). A Nimesulida caracteriza-se por ter os grupos funcionais sulfonil e amina, que formam a sulfonamida que confere propriedades de um ácido fraco. Também tem a capacidade de ser um receptor de prótons e doador de elétrons na formação de ligações de hidrogênio (SULEYMAN et al., 2008). Atualmente, as limitações na utilização de Nimesulida e outros AINEs estão principalmente associadas a solubilidade, biodisponibilidade, toxicidade e reações adversas, principalmente pelo uso prolongado em tratamentos com sistemas convencionais de administração (ZHONG et al., 2012) como a oral, na qual apresenta uma absorção lenta e muito variável, além de metabolismo de primeiro passo no fígado, diminuindo a concentração do fármaco. Outras vias de administração como a parenteral evita distúrbios gastrointestinais e o metabolismo de primeiro passo, além disso a intramuscular ao ser uma zona vascularizada se difunde rapidamente nas fibras e se absorve.

Diversas estratégias têm sido pesquisadas para reduzir ou evitar as reações adversas da Nimesulida incluindo: diferentes formas de administração como tópica e parenteral, modificação estrutural (DE PAIVA et al., 2012), (Su et al., 2010), como a adição de grupos funcionais (PERICHERLA et al., 2007) à formação de complexos metalo-orgânicos (DE PAIVA et al., 2012, BINI et al., 2019) e a utilização de carregadores (PIEL et al., 1997, DE PAIVA et al., 2014). O desenvolvimento de polímeros de coordenação e micropartículas poliméricas que contém o ativo apresentam a possibilidade na liberação controlada, que permite ao fármaco estar por

um período de tempo mais prolongado no sitio alvo (HUERTA; ABERTURAS; MOLPECERES, 2015, ALVES et al., 2007), além de melhorar características físico-químicas do fármaco, como a solubilidade dependendo da constante de equilíbrio, que está em função do pH, temperatura e tipo de solvente.

Nesse contexto, a utilização de complexos de coordenação (NMS-Ag) e associação polimérica (NMS-Ag-Ch) como sistema de micropartículados pode ser uma alternativa no tratamento antiedematoso, sendo necessário conhecer os fatores afetam a atividade biológica *in vivo* e *in vitro* partindo de um possível sinergismo entre os seus constituintes, relacionado com a sua estabilidade química, visto que poderia melhorar as características farmacocinéticas e por consequência a sua eficácia terapêutica. Desta forma, este estudo desenvolve novas estratégias para uma liberação controlada, com atividade antimicrobiana e antiedematosa, envolvendo complexos e a associação polimérica como ferramentas com um possível sinergismo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inflamação

Inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora, um processo defensivo fisiológico contra agressões ambientais (VILLALBA. 2014). Esse processo pode ser agudo ou crônico. A inflamação aguda tem uma evolução relativamente breve; na qual reações químicas e celulares são desencadeadas por mediadores químicos, principalmente histamina, leucotrienos, IL-1, TNF- α na área danificada, levando a alterações vasculares potentes (vasodilatação, aumento da permeabilidade), resultando a um extravasamento de exsudato. Simultaneamente, às alterações vasculares, ocorre a migração de neutrófilos dos vasos para o local da lesão, com intuito de fagocitar. A fagocitose do agente agressor e sua destruição, ocorre principalmente por produção de espécies reativas de oxigênio (DALGLEISH et al., 2007, PINAZO-DURAN; BOSCÁ-GOMAR, 2012, REGAL et al., 2016). A inflamação crônica ocorre quando a agressão é persistente, com exposição prolongada ou em reações autoimunes. As características celulares são de Infiltração inflamatório por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, seguida de destruição tecidual que é produzida pela persistência do agente agressor ou pelas células inflamatórias e a tentativa de reparo com produção de tecido conjuntivo. (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2011)

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos irritativos, vasculares, exsudativos, celulares, mediadores derivados de células e resposta imune. Alguns autacoides como a histamina e a serotonina, são considerados mediadores de ação rápida (primários). A bradicinina, prostaglandina tromboxano e leucotrienos, são mediadores de ação prolongada (secundários), agem promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (CALDER, 2008). Estes são alguns dos mediadores da inflamação que consistem em moléculas pequenas (eicosanoides) sintetizadas a partir do ácido araquidônico.

O ácido araquidônico é liberado por fosfolipídios de membrana, catalisada pela enzima Fosfolipase A2, que é ativada pela ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5A nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos e/ou das reações antígeno anticorpo nos mastócitos da lesão. O ácido araquidônico é biotransformado pelas duas isoformas das enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e lipoxigenases

(5-LOX), em PGs, TXs e leucotrienos.(DALGLEISH et al., 2007, BRUNTON; LAZO; PARKER, 2011) (Figura 1)

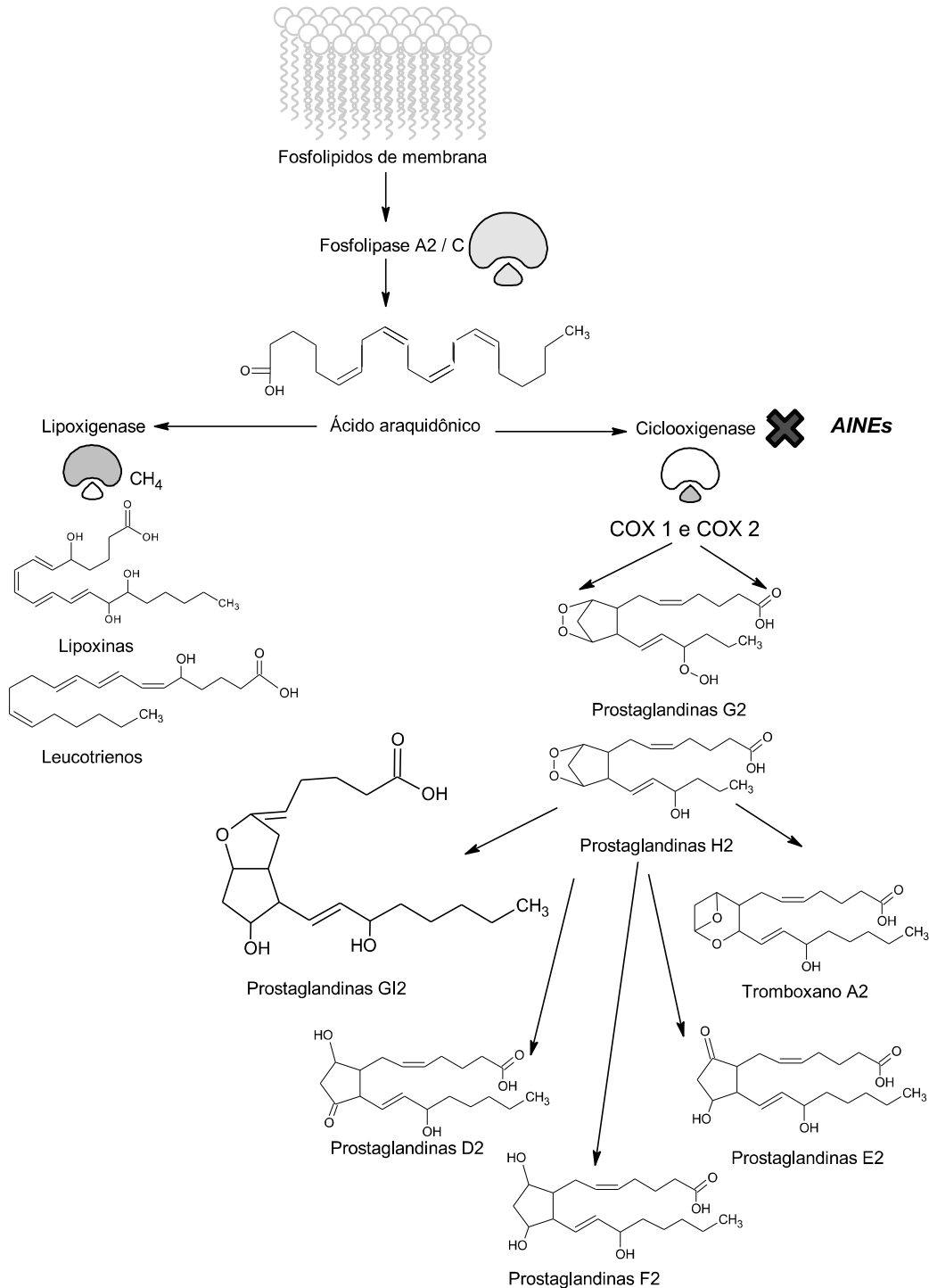


Figura 1: Rota de biossíntese das prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Alvo dos anti-inflamatórios não-esteroidais.

Fonte: Adaptado de (GILMAN'S; GOODMAN, 2008). Software-Chemsketch

2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs são amplamente usados na clínica para tratamentos de processos inflamatórios agudos e crônicos, pela sua atividade antipirética e analgésica. Todos os AINES podem causar reação adversa, principalmente aos pacientes tratados por via oral, entre estes, irritação da mucosa gástrica, toxicidade renal e hepática (BATLOUNI, 2009, SINGH et al., 2010, NÆSDAL; BROWN, 2006). A distribuição dos AINEs no corpo determina-se pelas suas propriedades químicas, como a lipossolubilidade e a constante de ionização pKa que varia de 2 a 6,5 característica dos ácidos fracos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2011). Tradicionalmente, os AINEs são classificados pela sua estrutura química como derivados dos ácidos salicílico, acético e fenilacético, propiônico, fenâmico e enólico (CHALLENGES; BENEFITS, 2017).

A maioria dos AINEs apresentam uma ligação a proteínas plasmáticas de 90%, com metabolismo hepático, sua ação varia de 4 a 24 horas, com uma vida média de 6 horas aproximadamente (SINGLA; CHAWLA; SINGH, 2000, BRUNTON; LAZO; PARKER, 2011). Seu mecanismo de ação é mediado pela inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que são responsáveis pela biossíntese de PG e outros mediadores da dor (SINGLA; CHAWLA; SINGH, 2000). O efeito dos AINEs na produção de PG é também a principal causa de sua toxicidade, resultando em disfunções plaquetárias, bronco espasmo, alteração da função renal, hipertensão arterial, úlcera péptica, dentre outras (CHALLENGES; BENEFITS, 2017, NOROIAN; CLIVE, 2002, TILO; SUSANNE; GARRET, 2006).

2.3 Funções fisiológicas das COX e PG

A COX é uma glicoproteína dimérica integral de membrana, encontrada predominantemente no retículo endoplasmático, tem um canal estreito e hidrofóbico e apresentam dois sítios catalíticos, o sítio cicloxigenase e o sítio peroxidase, que catalisam a biossíntese de prostaglandina. O sítio cicloxigenase converte o ácido araquidônico em PGG₂ que por sua vez, é reduzido ao intermediário instável PGH₂ pelo sítio peroxidase.(RICCIOTTI; FITZGERALD, 2014a)

A COX-1 é expressada constitutivamente em vários tecidos como rins, estômago, fígado, células epiteliais do trato gastrointestinal, entre outros (DUBOIS et al., 1998,ZIDAR et al., 2009). A COX-2 é uma enzima induzida, responsável pela

formação de PG em sitios de inflamação, como tem sido demonstrada em tecidos sinoviais de pacientes portadores de artrite reumatoide (MORITA, 2002). No entanto, alguns tecidos como os rins compartilham as PG sintetizadas pelas COX-1 e pelas COX-2. As PG derivadas da COX-2 podem ter papel critico na manutenção do fluxo sanguíneo medular renal e excreção de sódio (KUMMER; COELHO, 2002).

As PGs têm uma grande variedade de atuação como na resposta imune, coagulação sanguínea, ovulação, metabolismo ósseo, crescimento e desenvolvimento neuronal, cicatrização de feridas, , tônus vascular, inflamação e hiperalgesia de curta e longa duração, manutenção da integridade gastrointestinal, função renal, e assim por diante (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2011), na tabela 1 se mostra os tipos de prostaglandinas e a função no órgão, assim como o respectivo receptor.

Tabela 1: Tipo de prostaglandinas, efeito sobre alguns órgãos e os receptores involucrado

PG	Função no órgão e Receptor	Referencia
PGE2 PGD2 PGF2A	Função renal, efeitos diuréticos, natriuréticos, antagonizam a ação da vasopressina, inibe a reabsorção de cloreto, balance renal de sódio Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR) Receptor DP1 e DP2(CRTH2) Receptor FPa, FPb	(POYSER, 1973)(DUBOIS et al., 1998)(DUBOIS et al., 1998) (BATLOUNI, 2009)(PETER E. LIPSKY et al., 2015)
PGE2	Induz maturação do ovulo Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR)	(TSAFRIRI et al., 1972)(TAKAHASHI; HAGIWARA; OGIWARA, 2018)
PGE2 PGF2A	Vaso constritores cerebrais, nervos e função cerebral Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR) Receptor FPa, FPb	(WOLFE; COCEANI, 1979)(PETER E. LIPSKY et al., 2015)
PGE2	Metabolismo ósseo < 3mg/Kg Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR)	(DUBOIS et al., 1998)(PILBEAM et al., 2008) (MILLER; MALFAIT; MILLER, 2020)(OOSTINGA et al., 2020)
PGE2 PGF2A PGD2 PGI2	Processos inflamatórios Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR) Receptor FPa, FPb Receptor DP1 e DP2(CRTH2)	(POYSER, 1973)(DUBOIS et al., 1998)(RICCIOTTI; FITZGERALD, 2014b)

	Receptor IP	
PGE2	Coagulação sanguínea	(HOWIE et al., 1973)(FASANO;
PGI2	Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR)	SEQUEIRA, 2017)
	Receptor IP	
PGE2	Resposta imune	(KALINSKI, 2013)(MILLER;
	Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR)	MALFAIT; MILLER, 2020)
PGE2	Manutenção da integridade gastrointestinal, inibe	(DUBOIS et al., 1998)(PETER E.
PGI2	a formação de úlceras	LIPSKY et al., 2015)
	Receptor EP1, EP2, EP3, EP4 (GPCR)	
	Receptor IP	

Fonte: Autor

É assim como a ação dos AINES pode alterar algumas funções dos órgãos, como por exemplo, as PG sintetizadas nos túbulos renais produzidas principalmente pelas COX-1, interferem na depuração de sódio e água corporal e o uso dos AINES podem causar edema, retenção de sódio, entre outros. De igual maneira as PG que são produzidas na superfície do epitélio gástrico sintetizadas pelas COX-1 são responsáveis em manter a arquitetura glandular do estômago, reduzem a secreção de ácido, aumentam a secreção de íon bicarbonato e melhoram o fluxo sanguíneo, além disso estão envolvidas na prevenção de erosões e ulcerações. (ZIDAR et al., 2009 ,DUBOIS et al., 1998). Alguns estudos mostram que a inibição da COX pelos AINEs, leva a redução na síntese de PG vasodilatadoras, desviando o ácido araquinôdico para a via da LOX, que aumenta a formação de leucotrienos no tecido. Desta forma, os AINES podem levar a vasoconstrição na mucosa gástrica, além de isso observou-se que a adesão de neutrófilos ao endotélio provoca sua ativação, com a conseqüente liberação de radicais livres e proteases, substâncias que podem ser responsáveis por grande parte das lesões epiteliais e endoteliais (BJARNASON; B, 1999)

Figura 2.

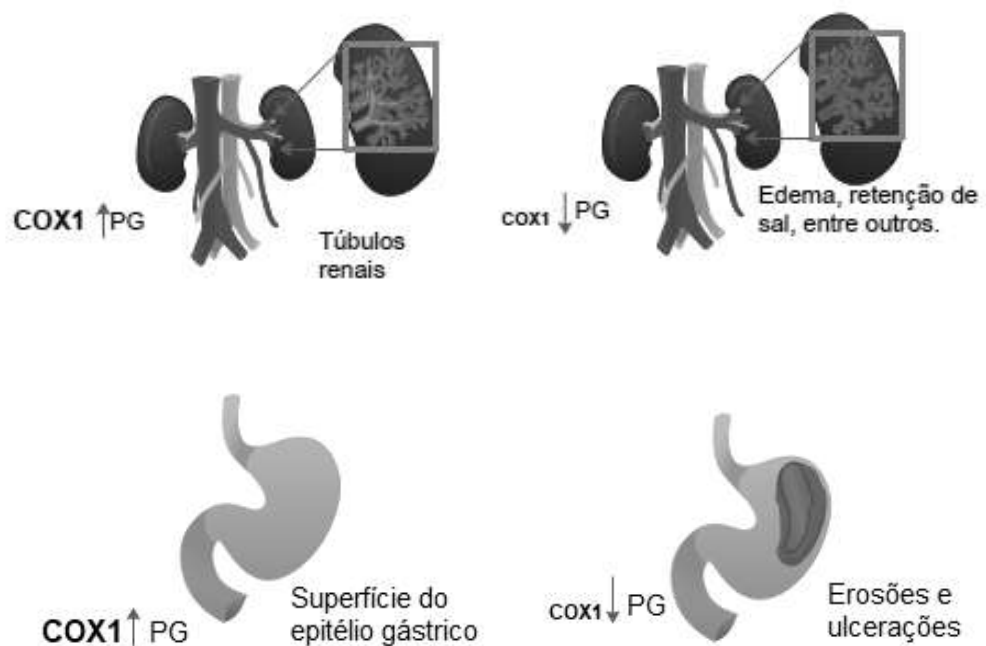


Figura 2. Efeito da inibição das PG citoprotetoras pelos AINEs
Fonte: Autor. Software-Edraw Max, ciencia, orgaos humanos.

Por outro lado, Inibidores seletivos ou afins da COX-2 são associados com menos dano gastrointestinal que AINEs convencionais, porém o tratamento com inibidores específicos da COX-2 podem retardar a cicatrização de úlceras já formadas ou ainda reduzir a capacidade de defesa diante de microorganismos invasores, apesar de provavelmente não iniciarem o dano gástrico como é observado com AINEs convencionais (KUMMER; COELHO, 2002). Além disso, inibidores específicos COX-2 suprimem a produção de PGI₂ pelas células endoteliais, mas não alteram a produção de TXA₂ plaquetário. Este consequente desequilíbrio a favor de fatores pró-trombóticos pode levar a agregação plaquetária e vasoconstrição, com maior tendência para oclusão vascular e isquemia tissular (EMERY, 2002)

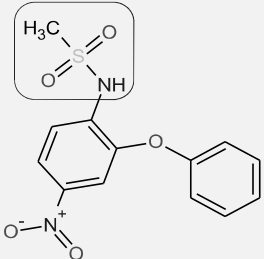
Em virtude dos efeitos sistêmicos pelo uso oral e parenteral de AINEs em casos de tratamentos prolongados é importante o estudo de sistemas especiais de micropartículas ou nanopartículas de liberação controlada, para assim melhorar a distribuição, diminuir a dosagem do medicamento, diminuir as flutuações das concentrações plasmáticas, melhorar o controle do fármaco no local de liberação para evitar degradação dele no organismo (PUGLIA et al., 2008). As vantagens terapêuticas que apresentam estes sistemas especiais, são a redução de reações adversas, aumento da eficácia e evitar a biodegradação do fármaco durante a

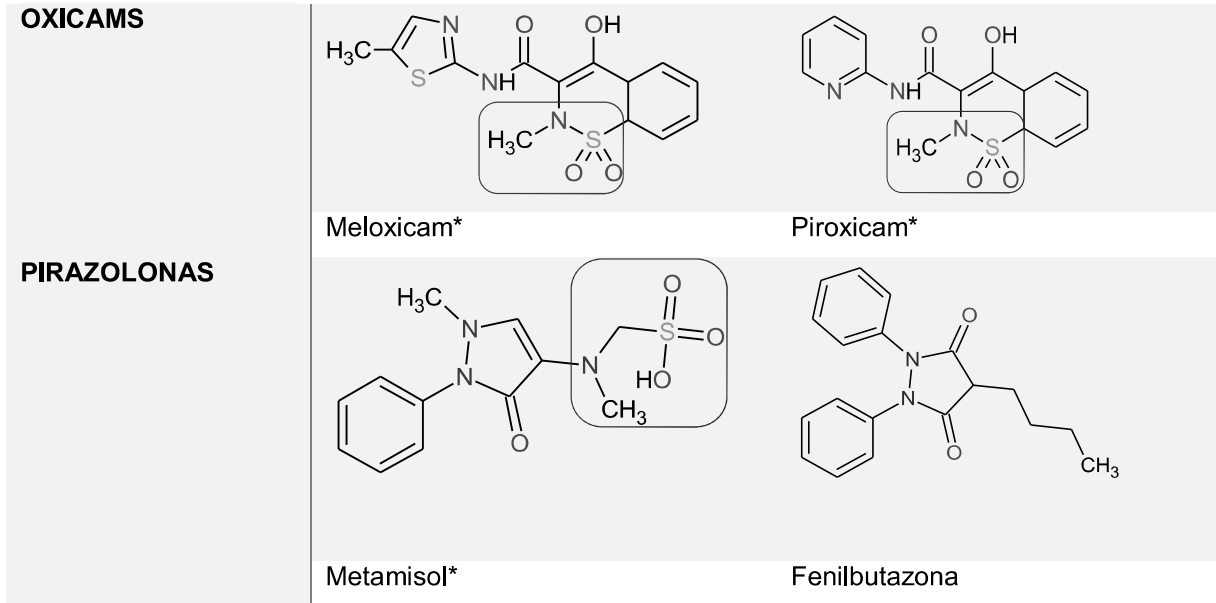
biodistribuição. Um dos fármacos pertencente aos AINES que nos últimos anos tem sido estudado para a administração por micro e nano-partículas é a nimesulida, devido as suas características físico-químicas e estruturais.

2.4 Nimesulida (NMS)

A NMS ou 4-nitro-2-fenoxi-metanos-sulfonanilida, tem peso molecular de 308,31g/mol, é um AINEs que pertence ao grupo sulfonanilida, difere de outros grupos de medicamentos como oxicams (meloxicam, piroxicam) e pirazolonas (metamizol, fenilbutazona), pela sua estrutura química, já que a NMS tem o grupo sulfonamida, com uma amina secundária, que lhe confere propriedades de ácido fraco em vez do grupo carboxila, levando assim a menos reações adversas gastrointestinais, entanto o meloxicam, piroxicam e metamisol são aminas terciarias (KOVA; MOKRY; KLIMES, 2003, SINGLA; CHAWLA; SINGH, 2000)(Figura 3).

As propriedades físico-químicas da NMS estão ligadas a sua estrutura estereoquímica. A conformação molecular é estabilizada pela ligação de hidrogênio intramolecular NH \cdots O, a coesão do cristal de NMS é o resultado dessas interações e das forças de van der Waals (DUPONT et al., 1995). Apresenta-se como um pó cristalino amarelado, com ponto de fusão entre 147 e 149°C (SINGLA; CHAWLA; SINGH, 2000); (KOVA; MOKRY; KLIMES, 2003). Sua degradação térmica TG inicia sob 210°C até 390°C (PERPETUO et al., 2013)

GRUPO	ESTRUTURA MOLECULAR
SULFONANILIDA	 <p data-bbox="909 1870 1061 1899">Nimesulida**</p>



*Moléculas com grupos funcionais sulfonil, aminas e sulfonamida

**Sulfonamida da NMS com uma amina secundária, que faz uma interação mais forte no sítio alvo

Figura 3 Estrutura molecular de alguns AINEs com grupos funcionais sulfonil, amina e sulfonamida

Fonte: Adaptado de (BIRKH; BASEL, 2005) Software-Chemsketch

A NMS é um ácido fraco, com pKa entre 6,4 - 6,8, é pouco solúvel em água, é solúvel em acetona, clorofórmio, acetato de etila, metanol e levemente solúvel em etanol (ROBERTO, 1997), A Tabela 2 mostra alguns solventes nos quais a NMS é solúvel. Seu coeficiente de partição em n-octanol / água é de 1.788 (SINGLA; CHAWLA; SINGH, 2000, RUFER et al., 1984, DEMETRIS; COSTAS, TSANTILIKAKOULIDOU, 2007, ROBERTO, 1997)(BIRKH; BASEL, 2005)

Tabela 2 Solubilidade da NMS em diferentes meios solventes a diferentes pH

<i>Solvente</i>	<i>Solubilidade (mg mL)</i>	<i>Constante dieletrica (ξ) dos solventes</i>
<i>Água</i>	0,014	78,36
<i>Glicerol</i>	0,218	42,5
<i>Metanol</i>	8,812	32,63
<i>Etanol</i>	3,320	24,3
<i>Butanol</i>	2,120	17,1
<i>n-octano</i>	0,970	9,72
<i>Etilenglicol</i>	0,510	37,7
<i>Propilenglicol</i>	1,760	32,0
<i>Polietilenglicol (PEG) 400</i>	63,120	12,4
<i>Glicero: Etanol</i>		

80%:20%	0,691	38,86
60%:40%	1,693	35,22
10%:90%	4,040	26,12
PEG (400): Etanol		
80%:20%	9,900	21,92
60%:40%	24,640	19,54
90%:10%	65,600	13,59
Água: Etanol		
80%:20%	0,101	67,55
60%:40%	0,125	56,74
90%:10%	3,320	24,30
Glicina-NaOH buffer pH		
7	0,034	-
7,9	0,081	-
8,84	0,807	-
9,42	3,886	-
9,52	6,914	-
10,17	34,639	-

Fonte: (BIRKH; BASEL, 2005)

O coeficiente de partição mede a solubilidade diferencial da NMS, porém esta pode ser mudada alterando a sua estrutura, como por exemplo fazendo um complexo de inclusão com ciclodextrina. Alguns estudos mostram que para aumentar a hidrosolubilidade da NMS pura, há necessidade de incorporá-la em um complexo de NMS ± L-lisina β-ciclodextrina. A formação deste complexo aumentou sua solubilidade em água (PIEL et al., 1997) (Tabela 3). No entanto, a segurança gástrica da NMS depende da concentração da droga atingida na mucosa gástrica, a melhoria da solubilidade do fármaco com o complexo β-ciclodextrina, pode aumentar a irritação gástrica devido a uma elevada concentração local do fármaco (JOUZEAU et al., 1997).

Tabela 3 Solubilidade do complexo NMS ± L-lisina β-ciclodextrina Versus NMS pura em diferentes pH

pH	Solubilidade do complexo (mg / mL)	Solubilidade da droga pura (mg / mL)	Fator de solubilidade
5	0,05	0,005	10
6,80	2,373	0,015	160
7,00	36.4	0,01	3600

Fonte: (PIEL et al., 1997)

A NMS é uma inibidora de COX-2 é usada para o tratamento da osteoartrite (RANNOU; PELLETIER; MARTEL-PELLETIER, 2016), artrite reumatóide aguda (JAMES R; O'DELL, 2004,KOVA; MOKRY; KLIMES, 2003) dor leve e moderada; dismenorreia (GILMAN'S; GOODMAN, 2008, MARJORIBANKS et al., 2009) dor muscular, dor de cabeça (BENDTSEN et al., 2012) e febre (GILMAN'S; GOODMAN, 2008)

2.4.1 TOXICIDADE DA NMS

As mitocôndrias, além de serem a principal fonte de energia, atuam como um centro de sinalização responsável por iniciar a morte celular (apoptose ou necrose), independentemente da via (SINGH et al., 2010). As EROs produzidas nas mitocôndrias têm sido vistas como um mecanismo de toxicidade da NMS, induzindo apoptose celular (SINGH et al., 2010). Esses fatores causam alterações na permeabilidade mitocondrial, diminuição da adenosina trifosfato (ATP) e aumento de cálcio citosólico, levando ao processo de necrose dos hepatócitos (BERSON; CAZANAVE; DESCATOIRE, 2006, MINGATTO, 2003). Estas reações são mostradas na Figura 4A e as reações subsequentes focadas na toxicidade mitocondrial que leva à apoptose são mostradas na Figura 4B (DUPONT et al., 1995).

. Na mitocôndria a bio-transformação da NMS gera metabólitos reativos que são provavelmente derivados nitrosos ou da hidroxilamina (BERSON; CAZANAVE; DESCATOIRE, 2006; BOELSTERLI, 2006). O grupo nitro ($O = N = O$) tem a capacidade de interferir na produção de energia e na homeostasia do cálcio intracelular (MINGATTO, 2003). A NMS transfere prótons para a matriz mitocondrial, diminuindo o potencial de sua membrana e aumentando a respiração celular (BERSON; CAZANAVE; DESCATOIRE, 2006). O aumento da respiração leva à depleção progressiva da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), à oxidação e depleção da glutatona e o aumento intracelular das EROs (BOELSTERLI, 2006) (Figura 4B).

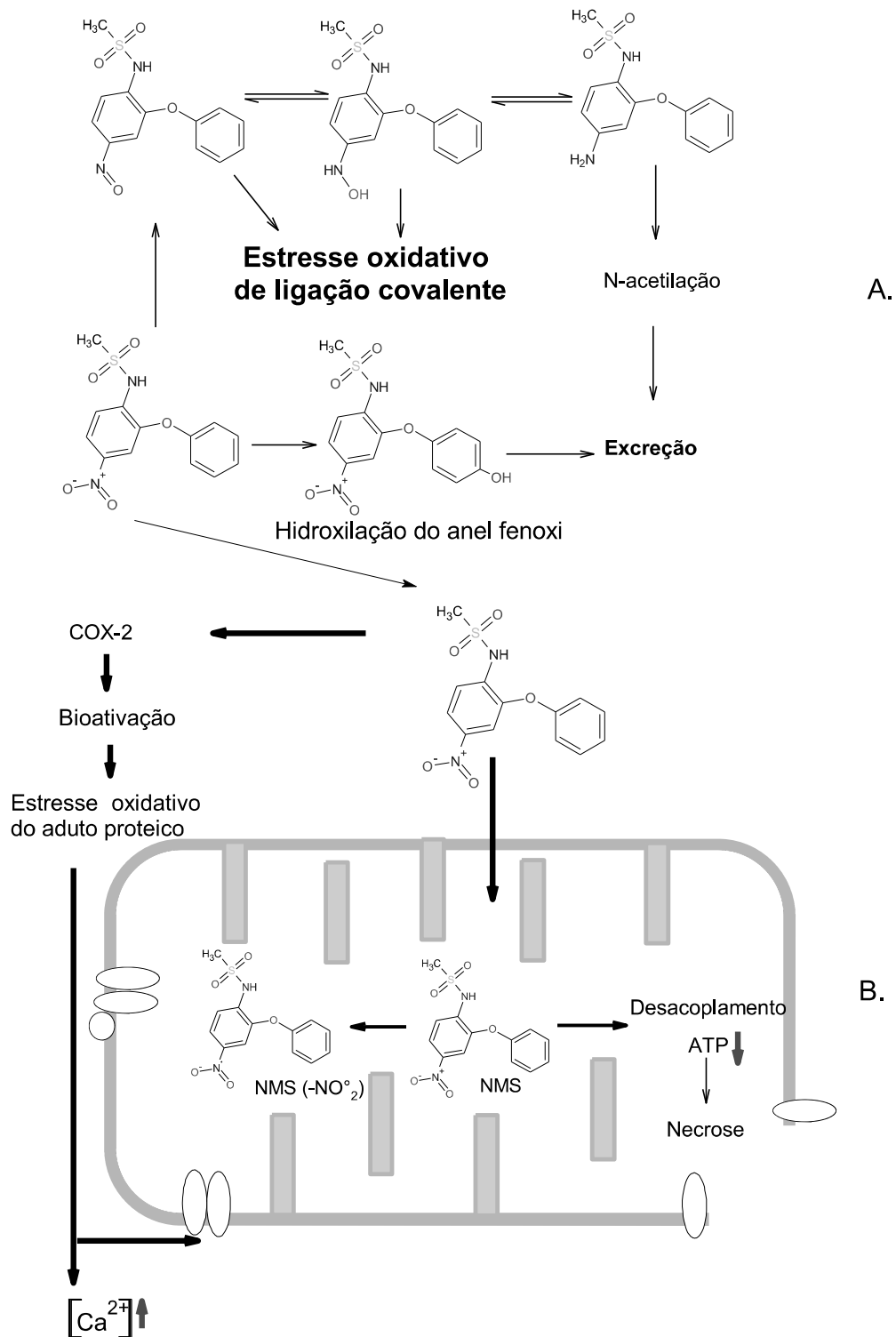


Figura 4 Mecanismo de toxicidade da NMS. A) Possível transformação metabólica da NMS do grupo nitroso em hidroxilamina B.) Formação teórica de metabólitos reativos e seus efeitos sobre o desacoplamento mitocondrial da fosforilação oxidativa, depleção de ATP e apoptose através de Bcl.

Fonte: (DUPONT et al., 1995). Software-Chemsketch

2.5 Complexos

Os complexos de coordenação são formados por uma porção orgânica e outra inorgânica. Moléculas como a NMS carregadas negativamente (ânions) também chamada de agente complexante, atuam como bases de Lewis e interagem com íons metálicos carregados positivamente (cátions). (PETRUCCI et al., 2002). O agente complexante deve ter átomos com pelo menos um par de elétrons de valência não compartilhados. Dentre os mais frequentes estão os átomos de oxigênio e nitrogênio. Em geral, as moléculas que possuem um único átomo doador de elétrons são chamadas de ligantes monodentados, que são caracterizadas por serem moléculas pequenas. Por outro lado, aqueles que têm mais de um átomo doador de elétrons são chamados de ligantes polidentados, que podem ser bidentados, tridentados, tetradentados, etc. Ligantes polidentados são usualmente chamados de agentes quelantes, uma vez que a capacidade de estabelecer duas ou mais junções simultâneas pode funcionar como pontes entre dois ou mais átomos centrais, levando à formação de enormes agregados macromoleculares que precipitam facilmente (PETRUCCI et al., 2002).

A formação de complexos de NMS com íons metálicos têm sido trabalhada anteriormente (KAUR; PURI; SINGLA, 2013) (DE PAIVA et al., 2012) com a finalidade de informar as constantes de estabilidade em função de valores de temperatura, pH e tipo solvente, mantendo constante a força iônica. Para estes estudos se uso vários íons metálicos que tem como alvo estabelecer se a formação dos complexos é espontânea e o papel deles na constante de estabilidade. A natureza do metal afeta a reatividade com o ligante e na formação favorável ou desfavorável do complexo, pois contêm orbitais de valência parcialmente preenchidos que são capazes de coordenar com ligantes para formar complexos. A ligação covalente coordenada entre o átomo doador e o centro metálico pode ser simples, dupla ou até tripla. Há tantas interações para a formação de complexos que é difícil prever, a partir da linguagem geral, o comportamento e as interações do metal com os ligantes aos quais ele pode ser anexado

O tipo íon de metal, o estado de oxidação, assim como, os elétrons na última camada (camada de valência), interferem na síntese do complexo. As várias combinações entre metais e ligantes resultam em compostos com diferentes propriedades, tais como solubilidade e polaridade. Um exemplo dessas aplicações

são os complexos metálicos a base de sulfonamida que frequentemente mostram efeitos biológicos aditivos ou sinérgicos causados pela combinação entre um átomo de metal e sulfonamida (NUNES et al., 2016). Muitos dos efeitos são devidos aos ligantes, e a suas propriedades físico-químicas.

A teoria do campo cristalino, assegura que a interação entre o metal e o ligante, pode ser considerada uma reação ácido-base de Lewis. A base com pares de elétrons livres seria o ligante e o receptor seriam os orbitais vazios no metal em seu papel ácido. No entanto, muitas dessas interações acontecem devido a forças eletrostáticas. Quando o ligante se aproxima ao metal, os orbitais “*d*” são perturbados pela carga negativa do ligante.

2.6 Uso da prata para fins terapêuticos

A prata (Ag) é um metal de transição que tem configuração eletrônica [Kr] 4d¹⁰ 5s¹, este metal é amplamente usado na formação de complexos que exibem propriedades antimicrobianas, antissépticas e anti-inflamatórias, bem como baixa toxicidade humana (Ag⁰)(BANTI, 2013)(DE PAIVA et al., 2012). A propriedade mais estudada está relacionada à sua atividade antimicrobiana, pois os íons de prata (Ag⁺) reagem com proteínas, alteram a estrutura da membrana bacteriana e inibem a replicação bacteriana se ligando ao DNA bacteriano (RAI; YADAV; GADE, 2009). Alguns de estas bactérias, tanto gram positivas como gram negativas, avaliadas com partículas de prata, se encontram: *Escherichia Coli*, *bacillus subtiles* (CARDOSO, 2016), *staphylococcus aureus* (STATHOPOULOU et al., 2018) *pseudomonas aeruginosas* (DE PAIVA et al., 2012) *Enterococcus faecalis* (WU et al., 2014), entre muitas outras.

O íon prata pode causar efeitos tóxicos, indução de estresse oxidativo com depleção de GSH (glutathiona reduzida), em associação com disfunção mitocondrial e produção de EROs *in vitro*, e um aumento na peroxidação lipídica quando linhas celulares humanas são expostos a AgNPs (ARORA et al., 2008), estes processos levam gradualmente à necrose ou à apoptose (Whitehouse 2015). Independentemente da aplicação, busca-se que os complexos não apresentem toxicidade, isso depende não apenas do tipo de íon metálico e seu estado de oxidação, também do ligante utilizado e da dose de administração para que apresente efeitos terapêuticos (DURÁN et al., 2019). Muitos de estes efeitos tóxicos estão

relacionados com o conceito de dose para nanotoxicologia se baseia em diferentes parâmetros, como: tamanho da partícula e sua área superficial, morfologia, composição química da superfície, estado de aglomeração/agregação, entre outras (DURÁN et al., 2019), é por isso que a associação polimérica é uma alternativa na redução da toxicidade, já que esta poderia alterar características como tamanho da partícula, morfologia e composição química superficial, esta última com uma possível liberação controlada do complexo, usando como biopolímeros a quitosana pelas suas propriedades físico-químicas.

2.7 Quitosana

A quitosana é um polímero linear de alto peso molecular (polissacarídeo catiônico) composto de unidades de glucosamina e N-acetil glucosamina, ligadas por ligações β (1-4), além de uma hidroxila primária na posição C3 e outra hidroxila secundária na posição C6 (SKAUGRUD; HAGEN, 1999), como demonstrado na Figura 5.

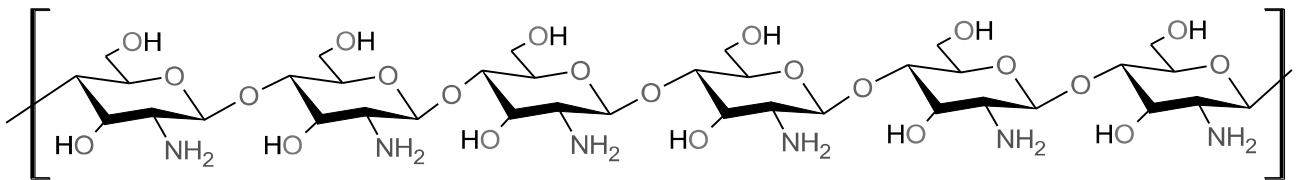


Figura 5: Estrutura da quitosana
Fuente: (LOPRETTI et al., 2007). Software-Chemsketch

A estrutura da quitosana apresenta semelhança com a estrutura da celulose, sendo também insolúvel em água, entretanto, em pH ácido, os grupos amino sofrem protonação, ficando totalmente carregada positivamente tornando-a solúvel (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004a ,GEORGE; ABRAHAM, 2006). A solubilidade da quitosana também depende, de certa forma, do peso molecular e do grau de desacetilação (Figura 6). O valor aparente de pKa do grupo amino e do grupo glucosamina é de 6,5. Este polímero é obtido por N-desacetilação termo-alcalina de quitina isolada de resíduos de crustáceos.

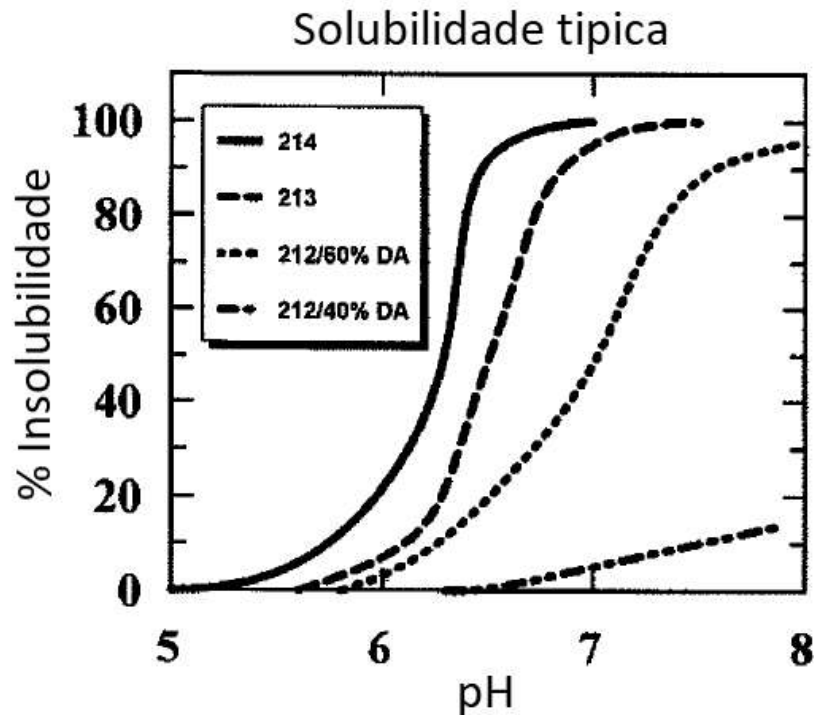


Figura 6: Solubilidade do quitosana dependendo da alteração do pH e do grau de desacetilação
Fuente: Adaptado de (SKAUGRUD; HAGEN, 1999)

A quitosana comparada com outros biopolímeros, apresenta várias vantagens, o que a torna candidata a aplicações biomédicas e como portadora de drogas para muitas vias possíveis de administração, como ocular e nasal (FELT et al., 2016). Dentre as vantagens, pode-se citar: sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos, evitando o uso de solventes orgânicos perigosos ao fabricar partículas, já que é solúvel em solução aquosa ácida, é uma poliamina linear contendo vários grupos de aminas livres que são facilmente disponíveis para reticulação, sua natureza catiônica permite a reticulação iônica com ânions multivalentes, além do caráter mucoadesivo, que aumenta o tempo residual no local de absorção (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004a) biodegradabilidade e biocompatibilidade *in vivo* (FELT et al., 2016, THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001) foi aprovado pelo FDA para uso em curativos de ferimentos (WEDMORE et al., 2006, KEAN; THANOU, 2010). Uma das características mais importantes da quitosana é a habilidade para obter sistemas particulados como micropartículas e nanopartículas geralmente para a liberação controlada do fármacos, sintetizadas por diferentes técnicas e métodos (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004a)

2.8 Sistemas Micro-particulados

As micropartículas são constituídas, basicamente, pelo núcleo, que pode ser único ou disperso na matriz ou pelo material envoltório, também chamado de casca. As partículas podem apresentar diferentes tipos de morfologia, podendo ser classificadas em: regular (esférica ou ovalada), ou irregular (Figura 7). A regularidade do formato da microcápsula, assim como a disposição de seu núcleo (único ou múltiplo) dependem, principalmente, da natureza do material de recheio e do método escolhido para a síntese das microcápsulas.

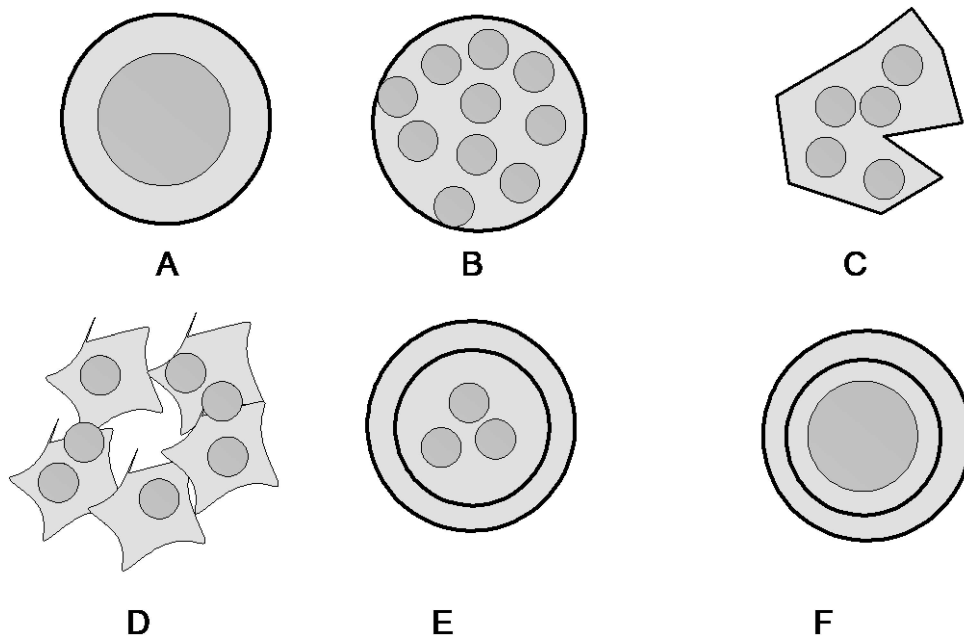


Figura 7. Diferentes morfologias obtidas de micropartículas. A) Microcápsula; B) microcápsula multinucleada ou microesfera; C) microesfera irregular; D) cacho de microesferas irregulares; E); F) microcápsula com dupla parede.

Fonte: Autor, Software-Chemsketch

O tamanho das micropartículas afeta o desempenho *in vivo* e determina as possíveis vias de administração. Para a via inalatória são utilizadas partículas entre 1 e 5 μm (EDWARDS et al., 2011), menores a 25 μm para o trato ocular (FLORENCE, 2018) e 10 a 250 μm para via intramuscular ou subcutânea (TRAN; BENOÎT; VENIER-JULIENNE, 2011). O carregamento de droga em sistemas microparticulados pode ser feito por dois métodos, isto é, durante a preparação de partículas (incorporação) e

após a formação de partículas (incubação). Nestes sistemas, a droga é fisicamente incorporada na matriz ou adsorvida na superfície (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004b).

O encapsulamento de AINEs em portadores micro e nanométricos poderia ser usado para superar algumas limitações previamente descritas. No entanto, o desenvolvimento de um transportador de fármaco com características desejáveis é um processo complexo que envolve a seleção de material de encapsulação apropriado, procedimento de encapsulação e ajuste das condições ótimas de encapsulação. Somente a seleção cuidadosa de materiais e técnicas de encapsulamento em relação à estrutura, propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas da droga e a via de administração podem resultar na melhoria geral da eficácia terapêutica dos AINEs (CHALLENGES; BENEFITS, 2017)

2.8.1 MECANISMOS DE LIBERAÇÃO

Diversos estudos efetuados dos sistemas de liberação controlada, levam a concluir que existem quatro mecanismos gerais através dos quais é possível classificar os sistemas de liberação controlada: Sistemas controlados por difusão, controlados quimicamente, ativados pelo solvente e controlados magneticamente. O sistema controlado por difusão é o modelo mais adequado quando se trabalha com biopolímeros (SÁEZ; HERNÁEZ; ANGULO, 2004)

A cinética de liberação da substância desejada está praticamente controlada pelas propriedades do polímero. Existem outros fatores de menor influência como o pH e temperatura do meio solvente. Para que a substância que vai liberar alcance o alvo desejado, em primeiro lugar, é necessário produzir a difusão da superfície do seu transportador até o meio envolvente (SÁEZ; HERNÁEZ; ANGULO, 2004). A liberação de fármaco a partir de sistemas particulados de quitosana envolve três mecanismos diferentes: (a) liberação da superfície das partículas, (b) difusão através da matriz emborrachada e (c) liberação devido à erosão do polímero (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004b). Na maioria dos casos, a liberação do medicamento segue mais de um tipo de mecanismo. Em caso de liberação da superfície, o fármaco adsorvido dissolve-se instantaneamente quando entra em contato com o meio de liberação. O fármaco aprisionado na camada superficial de

partículas também segue esse mecanismo. Este tipo de liberação de droga leva ao efeito de explosão (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004b) A liberação de drogas por difusão envolve três etapas. Primeiro, a água penetra no sistema de partículas, o que causa o inchaço da matriz; além disso, ocorre a conversão do polímero vítreo em matriz de borracha, enquanto o terceiro passo é a difusão do fármaco a partir da matriz de borracha inchada. Assim, a liberação é lenta inicialmente e depois, torna-se rápida (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004b) (Figura 8). Os mecanismos de liberação têm como objetivo demonstrar que as partículas podem ser utilizadas como um sistema de liberação controlada durante períodos de tempo longos, estudando os diferentes modelos cinéticos de liberação *in vitro*.

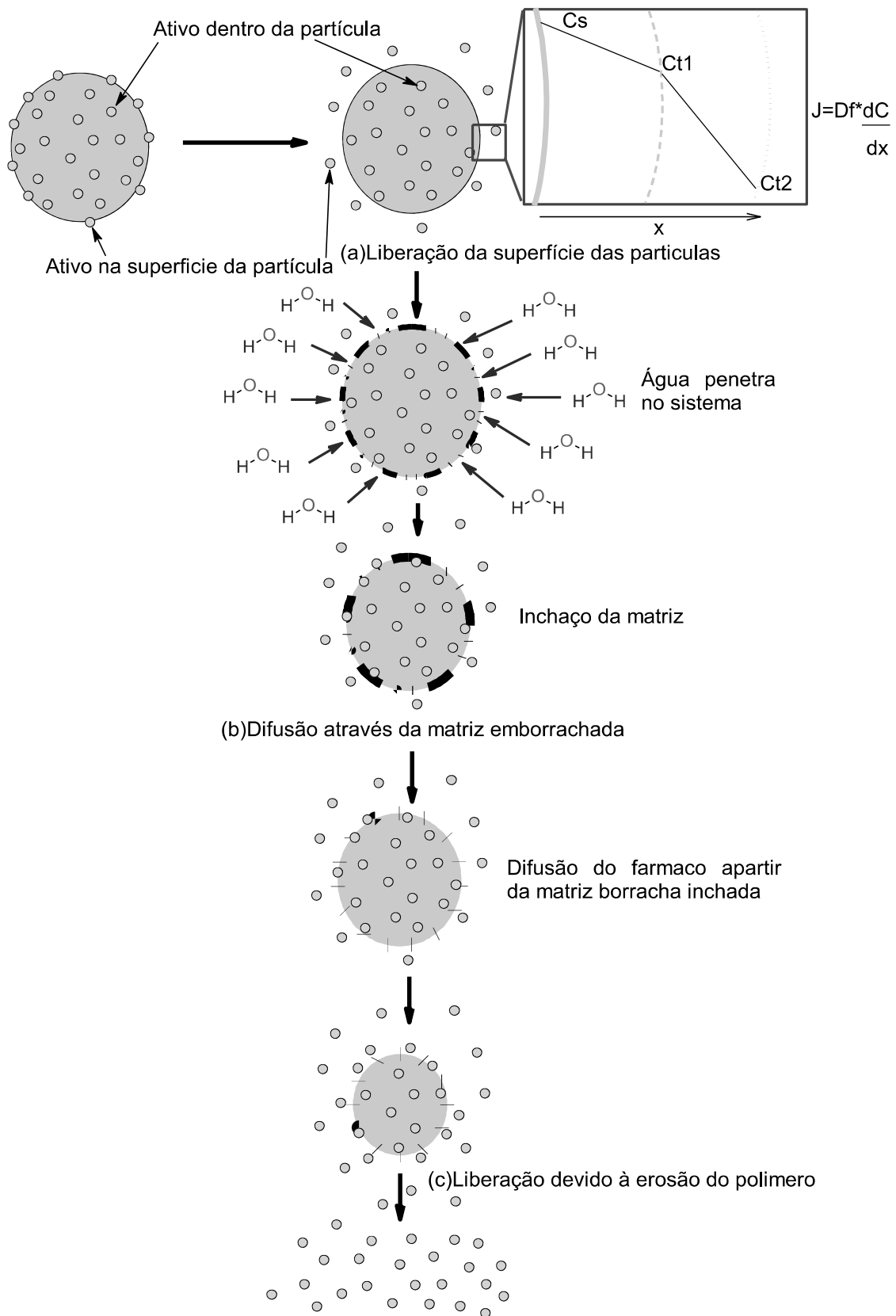


Figura 8 Etapas do mecanismo de liberação das micropartículas por difusão em meio aquoso
Fonte: Adaptado de (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004b), Software-Chemsketch

2.8.2 MODELOS CINÉTICOS

Os modelos matemáticos mais usados para analisar o mecanismo no qual acontece o processo de liberação são de Higuchi em 1963, Hixson-Crowell em 1931, Korsmeyer- Peppas e Ritger-Peppas em 1983-1987, Baker e Lonsdale em 1974 e Weibull em 1951, além de cinética de ordem zero e primeira ordem (FERNÁNDE et al., 2009, GOUDA; BAISHYA; QING, 2017, RAMTEKE et al., 2014). Para a maioria de casos a constante de velocidade de liberação K dos modelos, incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação.

Assim, a cinética de ordem zero define o processo de liberação constante do fármaco. Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução do fármaco de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada, como no caso de alguns sistemas transdérmicos, bem como comprimidos de matriz com drogas pouco solúveis, formas revestidas, sistemas osmóticos, etc (RAMTEKE et al., 2014).

O processo de primeira ordem é aquele cuja taxa é diretamente proporcional à concentração do fármaco a sofrer a reação, isto é, quanto maior a concentração mais rápida a reação (GOUDA; BAISHYA; QING, 2017). Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução do fármaco em formas de dosagem farmacêutica, tais como aquelas contendo película solúvel em água em matrizes porosas.

O modelo de Higuchi considerou que o solvente incha gradualmente a matriz, e o gradiente de concentração é linear, diminuindo da concentração de saturação (C_s) na interface com o núcleo que não foi atingido pelo solvente, até a concentração zero na interface do meio de dissolução da matriz (MIRCIU et al., 2019). Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução do fármaco a partir de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada, como no caso de alguns sistemas transdérmicos e comprimidos de matriz com fármacos solúveis em água. (RAMTEKE et al., 2014)

A liberação de um fármaco a partir de um sistema de entrega de drogas (SED) envolve dissolução e difusão. Diversos modelos de equações matemáticas descrevem a dissolução e/ou liberação do fármaco a partir do SED. Na era moderna das formulações orais de liberação controlada, a "equação de Higuchi" tornou-se uma importante equação cinética por si só, como evidenciado pelo emprego de estudos de dissolução de fármacos que são reconhecidos como um elemento importante no desenvolvimento da entrega de medicamentos (GOUDA; BAISHYA; QING, 2017).

Korsmeyer e Peppas apresentaram uma relação simples que descrevia a liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico, seguido de dissolução. A equação tem sido usada para a linearização de dados de liberação de várias formulações de microcápsulas ou microesferas. Aqui, M_t / M_l é a liberação fracionada do fármaco no tempo t , k é uma constante característica da interação fármaco-polímero e n é um parâmetro empírico que caracteriza o mecanismo de liberação, baseado no expoente difusional. O transporte de drogas é classificado como Fickiano ($n = 0,5$), Caso II transporte ($n = 1$), não-Fickiano ou anômalo ($0,5 < n < 1$) e super caso II ($n > 1$).

O Hixson-Crowell e a lei da raiz cúbica descreve a liberação de sistemas onde há uma mudança na área de superfície e no diâmetro de partículas ou comprimidos. Assim, partículas de área regular são proporcionais à raiz cúbica de seu volume. A partir do conceito acima, Hixson-Crowell estabeleceu uma relação entre a liberação do fármaco e o tempo que pode ser representado pela sua equação (GOUDA; BAISHYA; QING, 2017). Isto aplica-se a diferentes formas de dosagem farmacêutica tais como comprimidos, onde a dissolução ocorre em planos paralelos à superfície do fármaco se as dimensões do comprimido diminuïrem proporcionalmente, de tal forma que a forma geométrica inicial se mantenha constante o tempo todo. (RAMTEKE et al., 2014)

O modelo de Weibull é considerado mais útil para comparar os perfis de liberação de medicamentos dos sistemas matriciais. Não existe parâmetro para um fator de dissolução intrínseco de um medicamento e não permite a descrição de um tipo de correlação *in vitro* / *in vivo* (WALODDI WEIBULL, STOCKHOLM, 1951). A equação de Weibull pode ser aplicada a quase todos os tipos de curvas de dissolução. Esta equação expressa o acúmulo de fração do fármaco em solução, onde M é a quantidade de medicamento dissolvido em função do tempo t . M_0 é a quantidade total de medicamento liberado. T é responsável pelo tempo de atraso medido como resultado do processo de dissolução. O parâmetro 'a' indica um parâmetro de escala que descreve a dependência de tempo, enquanto 'b' descreve a forma da progressão da curva de dissolução (RAMTEKE et al., 2014)

O Baker e Lonsdale (1974) desenvolveram este modelo a partir do modelo de Higuchi e descreveu a liberação de drogas a partir de matrizes esféricas. O modelo tem sido usado para a linearização de dados de liberação de várias formulações de microcápsulas ou microesferas (RAMTEKE et al., 2014). Na tabela 4 se mostram cada

uma das equações dos modelos cinéticos, anteriormente descritos, com o significado de cada um dos termos.

Tabela 4 Modelos cinéticos mais amplamente usado, na avaliação de liberação de fármacos

MODELO	EQUAÇÃO	FONTE
ORDEM ZERO	$C_t = C_0 + K_0 t$	(GOUDA; BAISHYA; QING, 2017)(RAMTEKE et al., 2014) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)
PRIMEIRA ORDEM	$\text{Log}(C) = \text{Log}(C_0) - K_1 \cdot t / 2.303$	(GOUDA; BAISHYA; QING, 2017) (RAMTEKE et al., 2014) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)
HIGUCHI	$M_f / M_0 = F = K \cdot t^{1/2}$	(FERNÁNDEZ et al., 2009) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)
KORSMEYER-PEPPAS E RITGER-PEPPAS	$M_f / M_0 = F = K \cdot t^n$ $\text{Log}(M_t / M_0) = \text{Log}(K_{kp}) + n \cdot \text{Log}(t)$	(GOUDA; BAISHYA; QING, 2017) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)
HIXSON-CROWELL	$W_0^{1/3} - W_f^{1/3} = K_{HC} \cdot t$	(GOUDA; BAISHYA; QING, 2017) (RAMTEKE et al., 2014) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)
WEIBULL MODEL:	$\text{Ln}(-\text{Ln}(1-F)) = B \cdot \text{Ln}(t-T_i) - \text{Ln}(A)$	(RAMTEKE et al., 2014) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)
BAKER-LONSDALE MODEL:	$(2/3) \cdot (1 - (1 - (M_t/M_0))^{2/3}) - M_t/M_0 = k \cdot t$	(RAMTEKE et al., 2014) (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017)

Fonte: Adaptado de (AZADI; ASHRAFI; AZADI, 2017), (RAMTEKE et al., 2014). C_t : concentração no tempo t . C_0 : Concentração inicial, K_0 : Constante cinética. F : fração. M_f/M_0 : massa final / massa inicial. t : tempo. n : parâmetro empírico que caracteriza o mecanismo de liberação. B : parâmetro que descreve a forma da progressão da curva de dissolução. A : parâmetro de escala que descreve a dependência de tempo. T_i : parâmetro responsável pelo tempo de atraso medido como resultado do processo de dissolução.

A finalidade deste trabalho é desenvolver um sistema de micropartículas com liberação controlada, usando complexo de coordenação e a sua associação polimérica, e assim reduzir as reações adversas produzido pela NMS, além de encontrar um sinergismo entre seus constituintes no tratamento anti-inflamatório e antimicrobiano induzido por carreginina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Síntese, caracterização, cinética de liberação de NMS e atividade farmacológica *in vivo* e *in vitro* das micropartículas, do complexo Nimesulida-prata (NMS-Ag) e a sua associação polimérica com quitosana (NMS-Ag-Ch), como uma alternativa terapêutica

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar o complexo NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, por UV-vis em meio sólido, análise termogravimétrica (TG) e espectroscopia infravermelho (IV)
- Determinar a cinética de liberação de acordo a modelos matemáticos de difusão para o complexo NMS-Ag e associação com o quitosana NMS-Ag-Ch em Solução tampão fosfato pH 7,4
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*, com a obtenção da concentração mínima inibitória e concentração bactericida mínima da NMS, do complexo NMS-Ag e a associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch por técnica de microdiluição
- Avaliar o efeito anti-inflamatório e antioxidante *in vivo* das micropartículas do complexo NMS-Ag e NMS-Ag-Ch em modelo de edema de pata induzida por carragenina.
- Avaliar parâmetros do estresse oxidativo: avaliar a capacidade antioxidante total (TEAC), glutatona reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese e caracterização do complexo Nimesulida-Prata (NMS-Ag) e associação polimérica com o quitosana, Nimesulida-Prata-Quitosana (NMS-Ag-Ch)

4.1.1. REAGENTES EMPREGADOS NA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO E A SUA ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA

Todos os reagentes utilizados nos experimentos do presente trabalho apresentaram um grau de pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia. Os materiais utilizados foram: NMS ($C_{13}H_{12}N_2O_5S$ - >97%), nitrato de prata ($AgNO_3$ - 99,8%), hidróxido de potássio (KOH - 99,7%), hidróxido de sódio (NaOH - 99,7%), etanol (C_2H_5OH - 95%), metanol (CH_3OH - 96,5%), comprimidos de buffer fosfatos (pH 7,4), DMSO (C_2H_6OS - 99,95%), quitosana ($-[C_6H_9O_4N]_n-$ >75% deacetilado). Para realizar a síntese, utilizou-se água destilada, descarbonatada sob atmosfera de nitrogênio a 60 ° C.

4.1.2 SÍNTESE DO COMPLEXO NIMESULIDA - PRATA (NMS-AG)

Para a síntese do complexo NMS-Ag foi feita a adaptação do trabalho de DE PAIVA et al., (2012) realizando ajustes para obter o complexo puro. O complexo com a NMS foi obtido por reação de 100 mL de uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) $8,8 \times 10^{-3}$ mol (0,4937 g) e Nimesulida (NMS) $8,0 \times 10^{-3}$ mol (2,4664 g) com 20 mL de solução aquosa de nitrato de prata ($AgNO_3$) contendo $8,8 \times 10^{-3}$ mol (1,4948 g) como se observa na Figura 9. A síntese foi realizada com agitação constante à temperatura ambiente durante uma hora. O sólido amarelo foi recuperado por centrifugação a 5000 RPM por 5 min depois foi lavado com água destilada fria e realizada a filtração a vácuo. Finalmente, o sólido foi seco usando um dissecador e uma chapa de aquecimento a 40 °C. Todo o procedimento de síntese foi feito protegido da luz, para evitar a alteração da NMS.

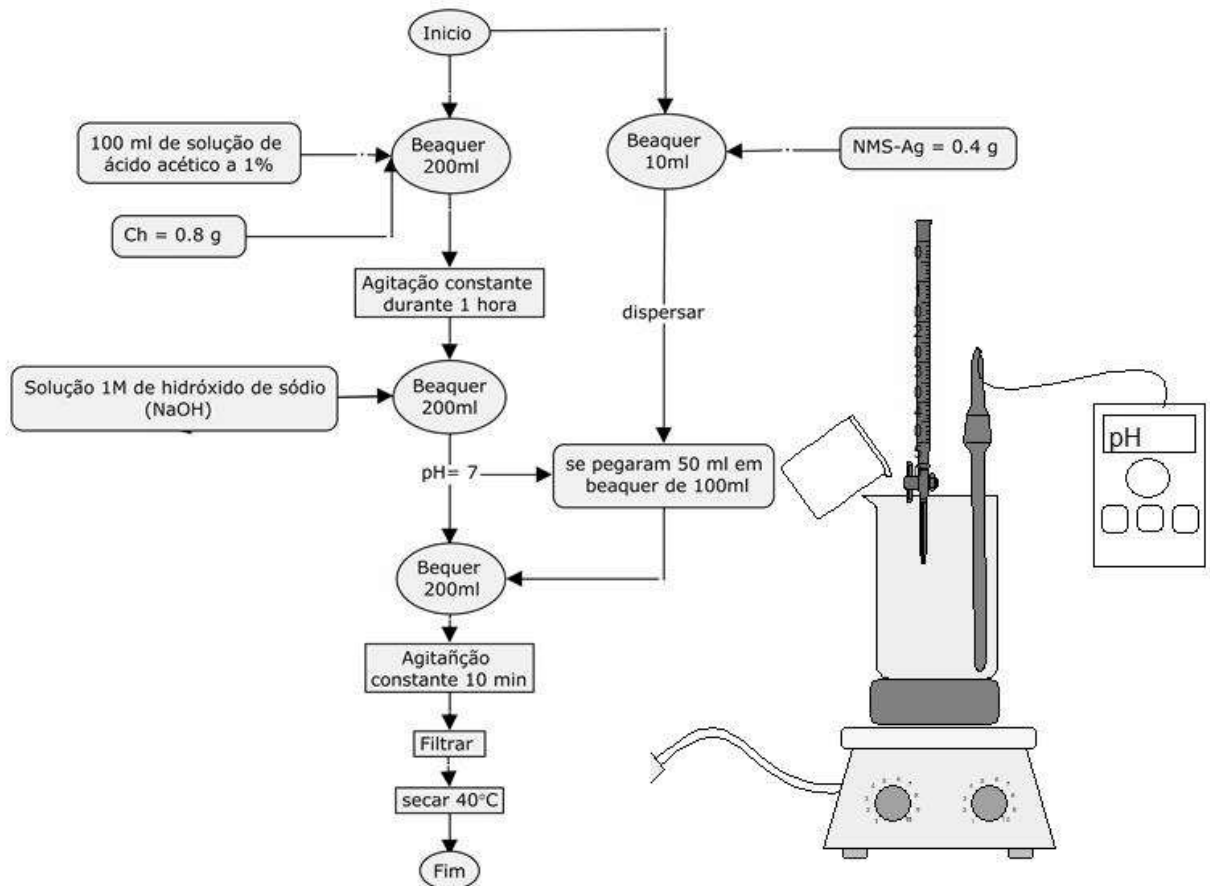


Figura 10 Procedimento da associação polimérica com a quitosana
Fonte: Autor, Software-Chemsketch

4.1.4 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE DO COMPLEXO (NMS-Ag) E ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA (NMS-Ag-Ch)

Para obter informações sobre cada uma das amostras sintetizadas foi avaliado o seu comportamento em vários solventes tais como DMSO (Dimetilsulfóxido), CH₃OH (Metanol), solução tampão (buffer fosfatos) pH = 7,4. Aproximadamente $1,3 \pm 0,0026$ mg de cada um dos complexos foi pesado e depositado em recipientes de vidro de 25 mL, adicionando 10 mL de cada um dos solventes como é mostrado na Tabela 5, e posteriormente foram deixados em agitação constante cerca de 300 rpm por 5 min.

Tabela 5 Avaliação da solubilidade dos complexos sintetizados NMS-Ag e NMS-Ag-Ch

Complexo	quantidade(mg)	Solvente1 (10 mL)	Solvente 2 (10 mL)	Solvente 3 (3 mL)
NMS-Ag	1,3 ± 0,002	Buffer pH=7,4	Metanol	Dimetilsulfoxido
NMS-Ag-Ch	1,3 ± 0,002			

Fonte: Autor

4.1.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO – CONTEÚDO DE NMS NAS MICROPARTÍCULAS

4.1.5.1 Solução padrão de NMS 0,05mg/mL

Em um béquer de 50mL pesou-se aproximadamente 5mg de NMS. Em seguida adicionou-se metanol puro, para dissolver o soluto e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100mL, completando-se o volume com metanol.

4.1.5.2 Construção da Curva Analítica

Foram preparadas diferentes soluções, de oito concentrações, a partir da solução padrão de NMS 0,05mg/mL. Para preparar estas soluções foram pipetados diferentes volumes com a solução padrão de NMS 0,05mg/mL (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 mL) e aos volumes dos balões foram adicionadas alíquotas de 10 ml de metanol. Foram tirados espectros de varredura no comprimento de onda na faixa de 200 a 800nm das soluções padrão, sendo o pico máximo em 295nm.

4.1.5.3 Determinação de NMS nas micropartículas

Para a determinação de NMS nas micropartículas, as amostras foram preparadas da seguinte forma: Uma massa aproximada a $1 \pm 0,002$ mg das micropartículas foi pesada em um béquer de 25mL e dissolvido em 10ml metanol. Depois a solução foi levada para agitação em lavadora ultrassônica por um período de 5 minutos. A solução foi filtrada em filtro de seringa de $0,45\mu\text{m}$, foram realizadas as leituras espectrofotométricas em comprimento de onda na faixa 200 a 800nm, utilizando metanol como branco.

4.1.6 ANÁLISE ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV- Vis)

A espectroscopia UV-Vis foi feita para identificar as possíveis transições eletrônicas entre o complexo NMS-Ag, associação polimérica com a quitosana MNS-Ag-Ch e os seus precursores, para determinar interações representadas na mudança do comprimento de onda.

O análise ultravioleta visível (UV-Vis) foi adotada a partir do trabalho de COELHO; HENNOUS; LEROUX, (2012) O equipamento foi um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-2600. O pó de cada um dos compostos foi acondicionado e pressionado no recipiente de cristal para a sua leitura. O equipamento foi utilizado no comprimento de onda desde 200 nm até 800nm, usando como linha base sulfato de bário. Foi lida a absorbância de cada mostra.

4.1.7 ANALISE INFRA VERMELHO (IV)

A Análise IV foi feita aos complexos NMS-Ag, NMS-Ag-Ch e seus precursores com a finalidade de determinar mudanças nas vibrações moleculares em alguns grupos funcionais da NMS, principalmente no grupo amino e sulfonilo.

A IV foi adotada a partir do trabalho de DE PAIVA et al., (2012), usando um aparelho shimadzu lanza. As amostras sólidas devem ser pulverizadas até que o tamanho das suas partículas seja menor que o comprimento de onda da radiação para evitar os efeitos da dispersão da radiação. A formação de pílulas KBr é a técnica mais popular para lidar com amostras sólidas. Os sais halogênados têm a propriedade de fluxo a frio, desta forma quando o material finamente pulverizado é submetido a uma pressão suficiente, manifesta propriedades transparentes ou translúcidas, tais como o vidro. Com esta técnica, 1 mg ou menos da amostra finamente pulverizada é misturada com cerca de 100 mg de pó seco de brometo de potássio. A mistura é pressionada em uma matriz especial entre 10.000 e 15.000 libras por polegada quadrada até que um disco transparente seja obtido.

4.1.8. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A TGA foi feita para os complexos NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, com a finalidade de observar a velocidade de degradação térmica dos complexos e se existe um efeito térmico protetor do polímero sobre o ativo NMS-Ag. A TGA foi adaptada do trabalho

de BRAGA et al., (2003) realizando alguns ajustes para obter uma curva mais completa. A operação foi realizada em um aparelho TGA-50 Thermogravimetric analyzer Shimadzu em uma atmosfera de nitrogênio (50mL/min), uma taxa de aquecimento de 10°C/min, desde temperatura ambiente (27° C aproximadamente) até 1000°C.

4.1.9. MORFOLOGIA E TAMANHO DAS PARTÍCULAS

A caracterização das micropartículas é importante, já que tem uma influência na solubilidade ou liberação do ingrediente ativo ao interior da rede polimérica, o qual pode ser afetado por fatores, como a afinidade de ligação entre o polímero e o fármaco, velocidade de degradação do polímero, pH do meio (POBUDKOWSKA et al., 2018) morfologia e o tamanho das partículas, que a sua vez está relacionada diretamente com a área superficial. O fenômeno de difusão é afetado pelo tipo de micropartículas, que podem ser microcápsulas ou microesferas e se são regulares ou irregulares. Foi realizada uma caracterização do material quanto ao tamanho de partícula e morfologia pelo programa *image J* com imagens do microscópio a 40X. Foram coletadas 100 partículas de cada complexo e se analisaram quanto à forma usando como parâmetro 1 (círculo perfeito) e 0 (geometria irregular), também foi avaliado o tamanho da partícula. Estes dois parâmetros foram comparados para determinar se a associação polimérica com a quitosana tem uma influência estatisticamente significativa.

4.1.10 CURVA DE CALIBRAÇÃO - CINÉTICA DE LIBERAÇÃO pH 7,4

4.1.10.1 Solução padrão de NMS 0,02mg/mL

Em um béquer de 25mL pesou-se aproximadamente 1mg de NMS. Em seguida adicionou-se uma solução buffer fosfatos pH 7.4 a 38°C, para dissolver o soluto e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com a solução buffer fosfatos 7,4.

4.1.10. 2 Construção da Curva Analítica

Na construção da curva analítica, foram preparadas diferentes soluções, de oito concentrações, a partir da solução padrão de NMS 0,02mg/mL. Para preparar estas soluções foram pipetados diferentes volumes com a solução padrão de NMS 0,02mg/mL (2;1,5; 1; 0,7; 0,35; 0,25; 0,1; 0,05; mL) e aos volumes dos eppendorf foram adicionadas alíquotas de 2 mL da solução buffer sulfatos pH 7,4. Foram tirados espectros de varredura no comprimento de onda na faixa de 200 a 800nm das soluções padrão, sendo o pico máximo em 394nm.

4.1.11 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO

A cinética de liberação do complexo NMS-Ag e a associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch foi adaptada a partir do trabalho de XU et al., (2009). Foi pesado aproximadamente $4 \pm 0,02$ mg da amostra polimérica NMS-Ag-Ch, foram suspensas em 2 mL de solução de buffer fosfatos com pH 7,4. O tubo eppendorf foi incubado a 37 °C com agitação constante, em intervalos pré-determinados, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm durante 5 min, 1ml da camada de sobrenadante foi removida para quantificação no espectrofotômetro UV-Vis a comprimento de onda de 394nm, e foi adicionado um volume igual de solução buffer fosfatos com pH de 7,4 ao tubo (Figura 11).

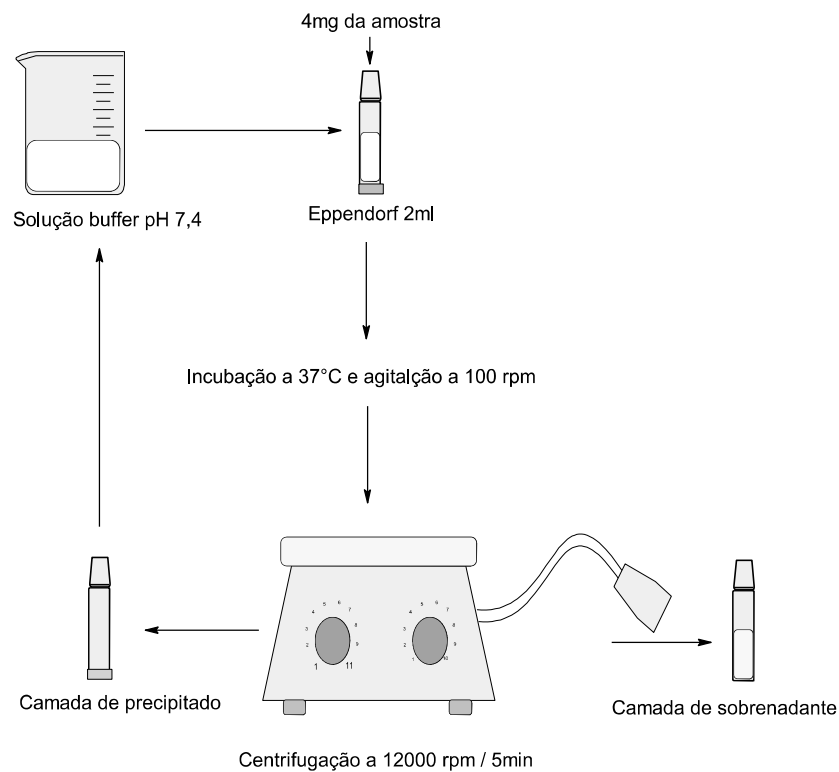


Figura 11 Esquema do procedimento da cinética de liberação

Fonte: Autor, Software-Chemsketch

4.2 Avaliação biológica das micropartículas

4.2.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.2.1.1 Reagentes empregados no análise microbiologica do complexo e a sua associação polimérica

4.2.1.1.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados na atividade antibacteriana foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Manitol (HIMEDIA, Índia), ágar Cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar Sangue (HIMEDIA, Índia) e ágar MacConkey. Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

4.2.1.1.2 Cepas dos micro-organismos testados

Os micro-organismos utilizados para a realização da pesquisa foram cepas de bactérias de referência ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 8789, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. As cepas ATCC foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro). As bactérias foram mantidas em tubo inclinado com ágar nutriente a temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

4.2.1.2 Preparação das concentrações das soluções de trabalho

A preparação das soluções seguiu os critérios adotados por Allegrini et al (1973) e Brazão et al (2014) com adaptações. Foram pesados em um tubo eppendorf estéril $1 \pm 0,002$ mg dos compostos, em seguida adicionou-se 100 μ l de DMSO para solubilizar e 900 μ l de solução salina 0,9%, obtendo-se uma solução mãe de 1mg/mL dos compostos. Para o ensaio antimicrobiano, os complexos e a associação polimérica foram utilizados nas seguintes concentrações: 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156; 0,0078; 0,0039; 0,0019 e 0,00095 mg.mL⁻¹. Figura 12

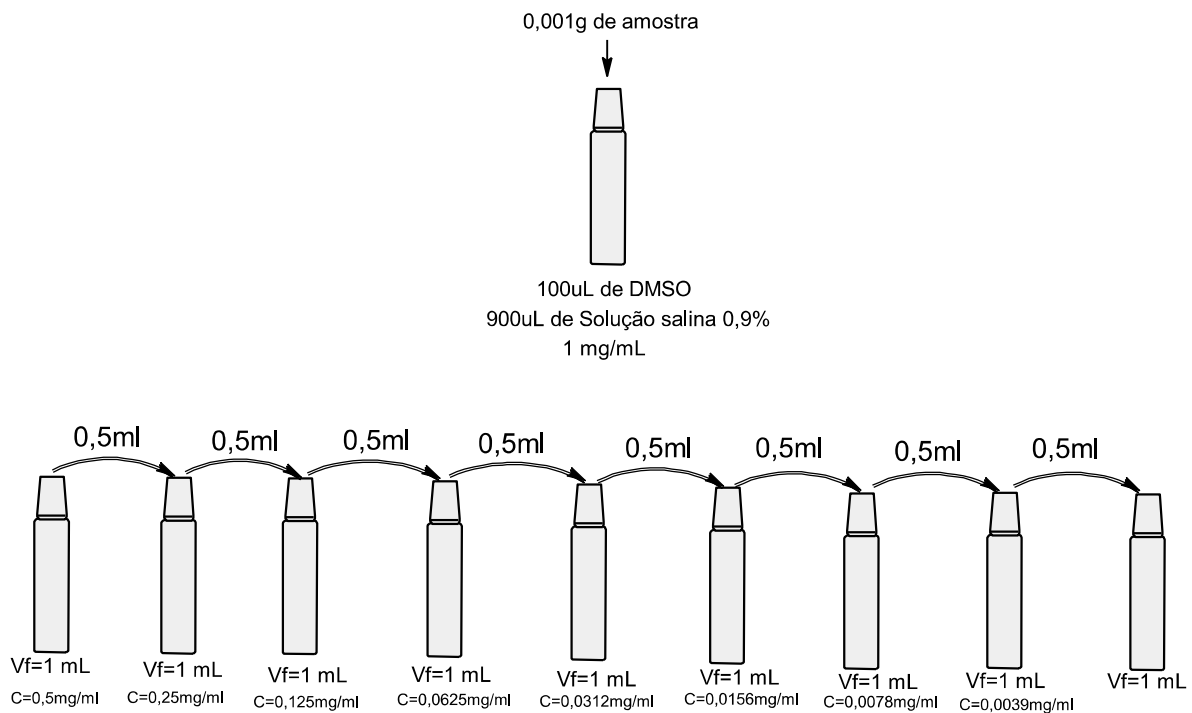


Figura 12 Procedimentos preparação das concentrações das soluções de trabalho, onde Vf é o volume final

Fuente: Autor, Software-Chemsketch

4.2.1.3 Preparo do inóculo bacteriano

As bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton, assim como em meio de cultura específico para cada bactéria. Em seguida, foram incubadas a 35°C em estufa por 24 horas para o crescimento e posterior preparação do inóculo. A obtenção do inóculo seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). O inóculo foi preparado a partir da retirada de três a quatro colônias da bactéria, as quais foram transferidas para um tubo contendo 5 mL do caldo Mueller-Hinton, realizando-se ajustes para o alcance da concentração desejada de 1×10^8 UFC.mL⁻¹, em aparelho espectrofotômetro (sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland (0,09 a 0,11)). Em seguida, a suspensão foi incubada por uma hora para alcançar o crescimento exponencial bacteriano. Logo após a incubação, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC.mL⁻¹ (Figura 13).

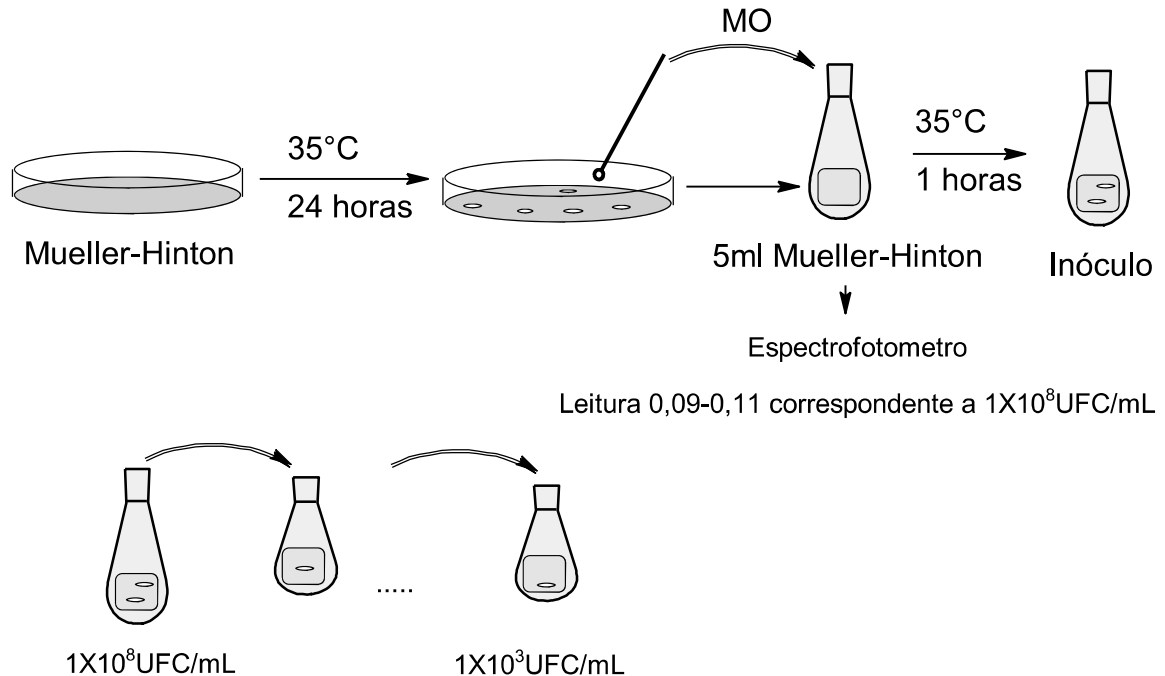


Figura 13 Procedimentos preparação do inoculo Bacteriano
Fuente: Autor, Software-Chemsketch

4.2.1.4. Concentração inibitória mínima (CIM)

O método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana foi a microdiluição em caldo, descrito conforme a norma M7-A9 (vol. 32 nº 2) da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As diluições da solução padrão do complexo e associação polimérica com a quitosana e dos sais foram preparadas conforme descrito anteriormente. Assim, na placa de microdiluição de 96 poços (Corning), adicionou-se 100µl do inóculo + 100µl de cada concentração dos compostos. O controle positivo recebeu 100µl do inóculo + 100µl do cloranfenicol (250 µg.ml⁻¹, Ariston) para bactérias gram-positivas ou Penicilina+estreptolisina (10000unit/10mg, Ariston) para bactérias gram-negativas. O controle negativo foi composto por 100µl do inóculo + 100 µl do DMSO a 10% (Interlab) e o controle do inóculo 100µl do inoculo + 100 µl do caldo M. Hinton, obtendo-se um volume final de 200µl em todos os poços. A incubação da placa ocorreu à temperatura de 35°C por 24 horas, sendo o experimento realizado em duplicata (Figura 14)

Após esse período foi adicionado a cada poço 30µl de resazurina 0,01% (Sigma Aldrich, Brasil), incubando-se novamente a placa por três horas. A resazurina é um corante de coloração azul, utilizado como indicador devido sua reação de óxido-redução passando de resazurina a resofurina, indicando a presença de células viáveis através da mudança de cor (cor azul para rosa) considerando-se a manutenção da coloração azul como ausência de crescimento (CLSI, M7-A9, 2012).

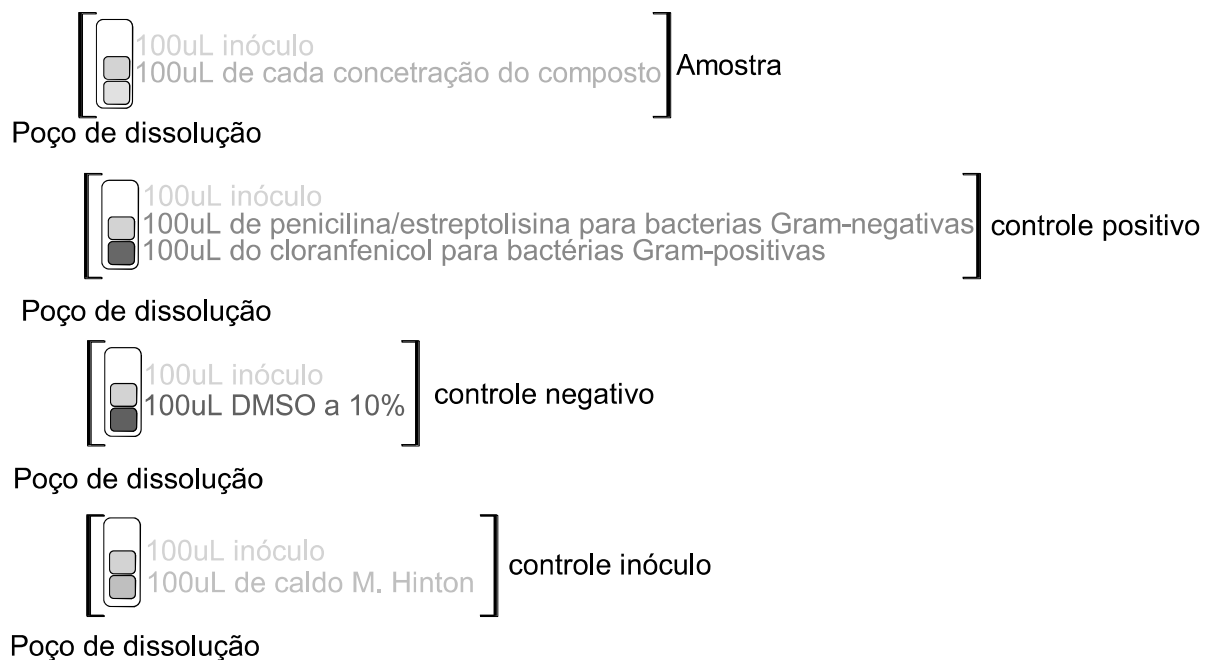


Figura 14 Quantidades usadas para cada um dos poços de dissolução, para a avaliação da amostra, controle positivo, controle negativo e controle de inoculo

Fuente: Autor, Software-Chemsketch

4.2.1.5 Concentração bactericida mínima (CBM)

Representa a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo sob condições conhecidas (QUADROS et al, 2011). Dessa forma, a CBM foi obtida pelo método de semeadura, retirando-se uma alíquota de 10 µL do conteúdo dos poços, seguidas de espalhamento em placas de Petri previamente preparadas com ágar M. Hinton e incubadas em estufa a 35°C por 24 h.

Posteriormente as UFC's (unidades formadoras de colônias) foram contadas, na qual a CBM foi considerada a menor concentração dos compostos que resultou em

ausência de crescimento ou o aparecimento de menos de três colônias, eliminando 99,9% dos micro-organismos (QUADROS et al, 2011).

4.2.2 AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

4.2.2.1 Reagentes empregados no análise anti-inflamatório do complexo e a sua associação polimérica

Neste estudo serão utilizados Azul de trypan 0,4% (SIGMA), ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA) 5% (BIOLAB), Ágar Muller Hinton(X), tampão fosfato salina (PBS) 10x (800 g de NaCl, 20 g de KCl, 144 g de Na₂HPO₄ e 24 g de KH₂PO₄ em 8 L de água destilada), reagente de griess (Sulfanilamida 1% (w/v) em H₃PO₄ 10% e o segundo reagente que é formado por alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% em água.

4.2.2.2 Animais em experimentação

Os animais foram obtidos após apreciação e aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFGPA) com número de protocolo 9782270619. Os animais utilizados na presente investigação foram manipulados segundo a legislação nacional em vigor de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (CONCEA, 2013).

4.2.2.2.1 Obtenção dos animais e eutanásia

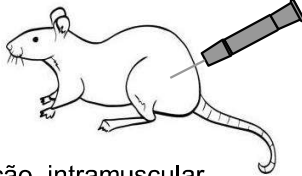

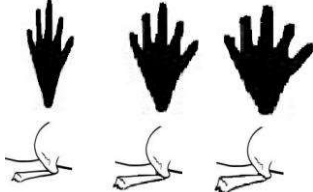
Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas (n=40), pesando em torno de 150 e 200 gramas, oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFGPA). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25 ± 1°C) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. O número de animais que foram utilizados se restringiu ao mínimo necessário para os ensaios pré-clínicos. Para os experimentos *in vivo* foram

utilizados no projeto aproximadamente 40 animais distribuídos em 5 grupos para avaliação anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina (5 animais por grupo)

Todos os animais experimentais foram mortos pelo método recomendado para a Ordem Rodentia - Roedores e pequenos mamíferos - que é o da exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais após a realização do modelo experimental de edema de pata e todos os procedimentos foram anestesiados para a eutanásia com cetamina (40-100mg/kg) e xilazina (5-13 mg/kg) intraperitoneal por meio do aprofundamento da anestesia (dobro do valor) seguido de exsanguinação por punção cardíaca. Todos os animais experimentais eutanasiados foram mantidos em freezer até o momento do descarte pela empresa responsável, seguindo normas internacionais.

4.2.2.2.2 Delineamento experimental e esquema terapêutico

Tabela 6 Delineamento experimental dos procedimentos *in vivo*.

Tempo	Atividade	Objeto e avaliação
t ₀	 Administração intramuscular	Grupo Salina Grupo NMS Grupo NMS-Ag Grupo NMS-Ag-Ch Grupo AgNO ₃
t ₁ = 60 min	 Administração subcutânea	Carregenina 1%
dt= 30 min, até 4 horas	 Medição do edema do animal cada 30 min, usando um paquímetro	Evolução do edema
tf= 4 h	Animales submetidos a eutanásia e coleta de pata e celulas peritoneais para a realização dos testes	

Legenda: Ch. Quitosana Ag. Prata, NMS. Nimesulida.

Fuente: Autor

Se manteve a mesma quantidade de NMS administrada para os animais. Os cálculos das doses para os ratos foram feitos com a extrapolação alométrica, de acordo a equação 1, onde se toma como referência a doses para o humano de 100 mg, o valor da constante de proporcionalidade para os mamíferos placentários é de 70 (PACHALY, 2006). O Valor da massa media para o humano é de 70kg e o valor médio dos ratos foi de 0,25 kg.

$$TMB = K * M^{0,75} \quad (1)$$

TMB = Taxa metabólica basal

K = Constante teórica de proporcionalidade

M = Massa corporal kg

Para calcular a dose a administrar, iniciamos pelo cálculo da taxa metabólica basal do animal modelo (humano) e do animal alvo (rato). Depois se divide a dose total indicada pela literatura para o animal modelo, por sua taxa metabólica basal, esse valor é multiplicado pela taxa metabólica basal do animal alvo, obtendo-se a dose total para o rato de 0,25 kg, a cada administração (Equação 2)

$$\text{Rata} \quad TMBr = 70 * (0,250 \text{ Kg})^{0,75} = 24,748 \text{ Kcal}$$

$$\text{Humano} \quad TMBh = 70 * (70 \text{ Kg})^{0,75} = 1694,031 \text{ Kcal}$$

$$\frac{Dth}{TMBh} = \frac{Dtr}{TMBr}$$

(2)

$$\frac{100mg}{1694,031 \text{ kcal}} = \frac{Dtr}{24,748 \text{ kcal}}$$

$$Dtr = \frac{100mg}{1694,031 \text{ kcal}} * 24,748kcal = 1,459 \text{ mg}$$

$$\frac{1,459 \text{ mg}}{0,25kg} = 5,836 \frac{mgNMS}{kg \text{ animal}}$$

4.2.2.2.3 Esquema para o tratamento de ação anti-inflamatória da NMS, o complexo NMS-Ag e a associação polimérica NMS-Ag-Ch.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas, 5 animais por grupo, divididos em 5 grupos, totalizando 25 animais:

➤ **Grupo 1 – Controle salina (n=5)**

- Carragenina + Salina:

Pata direita: Tratado com salina em coxa direita *administração intramuscular* + Carragenina (100µL/pata) - *administração subcutânea*

Pata esquerda: Salina 0,9% (100µL/pata): *administração subcutânea*

➤ **Grupo 2 – NSM (n=5)**

- **Carragenina + NSM:**

Pata direita: Tratado com NSM em coxa direita *administração intramuscular* + Carragenina (100µL/pata) *administração subcutânea*

Pata esquerda: Salina 0,9% (100µL/pata) *administração subcutânea*

➤ **Grupo 3 – Ag (n=5):**

- **Carragenina + AgNO₃:**

Pata direita: Tratado com AgNO₃ em coxa direita *administração intramuscular* + Carragenina (100µL/pata) *administração subcutânea*

Pata esquerda: Salina 0,9% (100µL/pata) *administração subcutânea*

➤ **Grupo 4 – NMS-Ag (n=5):**

- **Carragenina + NMS-Ag:**

Pata direita: Tratado com NMS-Ag em coxa direita *administração intramuscular* + Carragenina (100µL/pata) *administração subcutânea*

Pata esquerda: Salina 0,9% (100µL/pata) *administração subcutânea*

➤ **Grupo 5 – NMS-Ag-Ch (n=5):**

- **Carragenina + NMS-Ag-Ch (n=5):**

Pata direita: Tratado com NMS-Ag-Ch em coxa direita *administração intramuscular* + Carragenina (100µL/pata) *administração subcutânea*

Pata esquerda: Salina 0,9% (100µL/pata) *administração subcutânea*

4.2.3 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Para a realização do edema de pata induzido por carragenina no rato, foi realizado de acordo com o método de Winter et al. (1962), inicialmente, foram determinadas as espessuras das patas esquerda e direita (direção dorso-ventral) de todos os animais, antes de qualquer injeção. As espessuras (em mm) foram obtidas com o uso de um paquímetro digital (Absolute- Série 500 da Mitutoyo, Japan). Em

seguida, foi administrado intramuscular na coxa direita do animal o tratamento com salina, NMS, AgNO₃, NMS-Ag e NMS-Ag-Ch em suas respectivas massas mantendo o volume constante de 250µL. O edema foi induzido por carragenina (1mg/mL, 1%) com administração subcutânea, 100µL (lambda tipo IV, Sigma ChemicalCo., USA) injetada na região intraplantar da pata posterior direita, enquanto na pata esquerda foi injetada solução salina estéril 0,9%, sempre em total de 100 µL. Após a injeção de carragenina, as espessuras das patas foram medidas cada 30 min até completar 4 horas. Os resultados foram expressos pela média da diferença (pata direita - pata esquerda) da espessura \pm erro padrão da média. A porcentagem inibição no experimento edema foi calculada com base na área sob as curvas de tempo-curso (AUC0-4h) usando regra trapezoidal.

4.2.3.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, método para avaliar a peroxidação lipídica, foi realizada pelo método de Khonn e Livesedge (1944) e adaptado por Percário *et al.* (1994). Trata-se de uma técnica baseada na reação do malondialdeído (MDA) e outras substâncias com o ácido tiobarbitúrico (TBA; Sigma-Aldrich T5500), em pH 2,5 a 94°C, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535nm. Como a reação não é específica para o MDA, uma vez que o TBA pode reagir com açúcares, aminoácidos, proteínas e bilirrubina, utiliza-se o termo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MAYNE, 2003). A concentração elevada de TBARS tem sido utilizada como um indicador do estresse oxidativo.

O procedimento técnico do método consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄ 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 100 µl de amostra (tecido coletado e sangue) à 500 µl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (94°C por 60 minutos); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente por 10 minutos; adiciona-se 2,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se vigorosamente em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos; coleta-se 1,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. O padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano - Sigma-Aldrich, T9889), sendo os resultados foram expressos em µM/L (Figura 15).

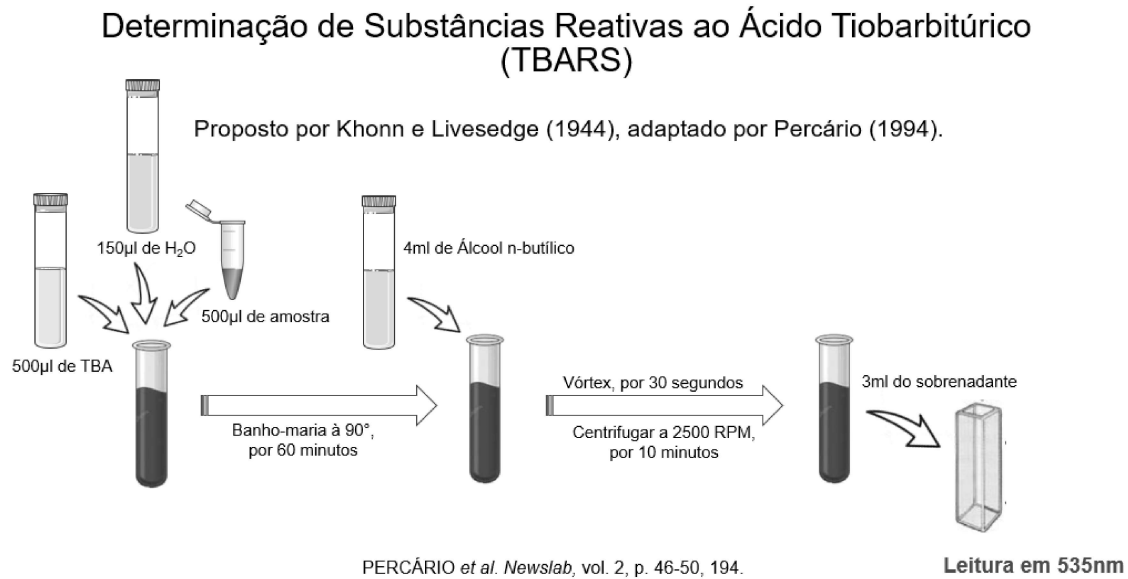


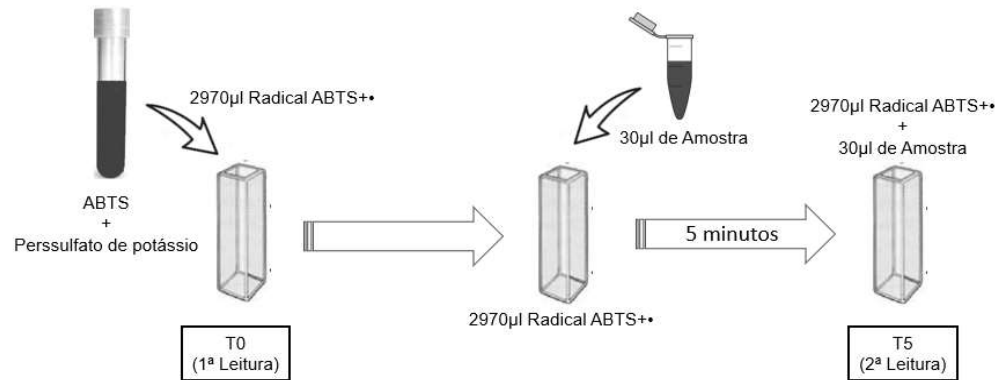
Figura 15 Representação Esquemática da Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Fuente: Adaptado por Paulo de Percário *et al.*, *Newslab*, Vol 2, p. 46-50 194

4.2.3.2 Determinação da capacidade antioxidante total equivalente ao trolox (teac)

A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada através da técnica da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; SigmaAldrich 23881-3) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E. Seguiu-se o método proposto por Miller *et al.* (1993) modificado por RE *et al.* (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (SigmaAldrich A1888) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o cátion radical $ABTS^{+\bullet}$ (radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes presentes na amostra (tecido coletado e sangue) a este cátion radical pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em $\mu M/mL$. (Figura 16)

Proposto por Miller *et al.* (1993), modificado por Re *et al.* (1999).



RE *et al.* Free Rad Biol Med., v. 26, n. 9, p.1231-1237, 1999.

Leitura em 734nm

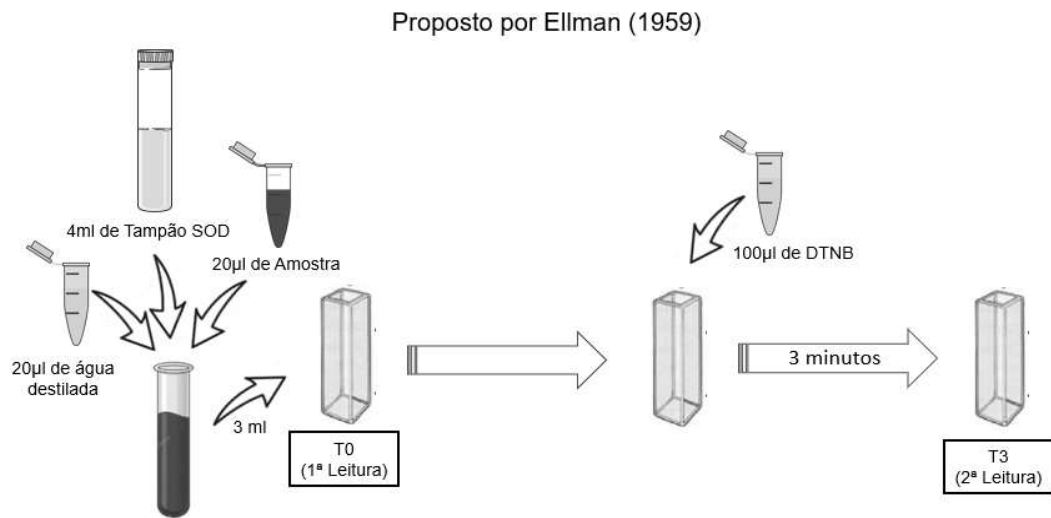
Figura 16 Representação esquemática da determinação da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

Fuente: Adaptado por Paulo de RE. Et al. Free Rad Biol Med, v 26n 9

4.2.3.3 Determinação da glutatona reduzida

A determinação das concentrações da glutatona reduzida (GSH) foi realizada de acordo com o método de Ellman (1959). Esta técnica baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich) para ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), o qual foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm.

As amostras (tecido coletado e sangue) foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante coletado para análise após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Inicialmente, foi retirada uma alíquota de 20µl de cada amostra e colocada em tubo de ensaio contendo 3ml tampão SOD e 20µl de água destilada para a realização da 1ª leitura da amostra (T0), em seguida foi adicionado 100µl de DTNB e após 3 minutos realizou a 2ª leitura da amostra (T3). A diferença nas absorvâncias (T3 - T0) é proporcional à concentração de GSH, expressa em µM/ml (Figura 17).



ELLMAN, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 82, p. 70-77, 1959.

Leitura em 412nm

Figura 17 Representação esquemática de determinação da atividade da glutatona reduzida (GSH).
Fuente: Adaptado por Paulo de Ellman. G L Ach Biophys

4.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística, onde cada parâmetro foi analisado inicialmente em relação aos possíveis pontos discrepantes (outliers), sendo utilizado o cálculo do intervalo interquartil. O teste t de Student foi utilizado para verificar a existência de diferenças significativas para cada parâmetro analisado em cada grupo do início ao final do estudo. Para cada parâmetro analisado foi realizada Análise Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Para verificação de possível correlação entre parâmetros, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do Complexo Nimesulida - Prata (NMS-Ag)

A solubilização da NMS foi realizada em pH alcalino de 12,63, garantindo que a molécula seja altamente desprotonada (99.99%) (GONSALVES et al., 2013). A Figura 18 mostra a estrutura eletroquímica da molécula NMS, representando um mecanismo versátil, cujas ligações coordenadas mostram ligação dos átomos de N, O ou S (NUNES et al., 2016), ao íon de prata presente no meio.

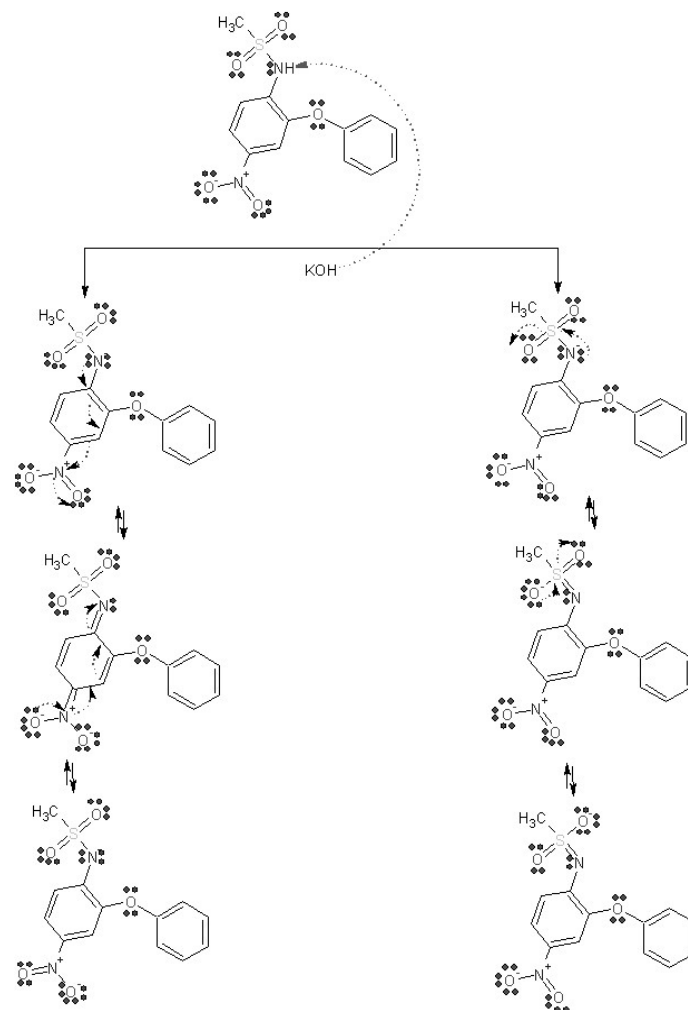


Figura 18 Ionização da estrutura da nimesulida e ressonância
Fonte: Autor, Software-Chemsketch

O sólido obtido após a reação de complexação entre o íon de Ag e a NMS em uma atmosfera de nitrogênio é mostrado na Figura 19 A. Os ligantes ou moléculas de NMS são atraídos para o centro do íon metálico, podendo haver repulsão entre os

elétrons externos da Ag e a carga negativa da NMS, no momento da formação das ligações coordenadas. O complexo formado gera uma série de glóbulos ou acoplamentos moleculares que são normais para este tipo de ligantes bidentados que tendem a precipitar na presença do íon metálico Figura 19B.

No processo de secagem, o material apresentou mudança da cor (Figura 19 C), possivelmente devido à perda de moléculas de água dos locais de ligações coordenadas entre a Ag e a NMS, obtendo um material mais escuro. O rendimento da síntese foi de 83,29% w/w

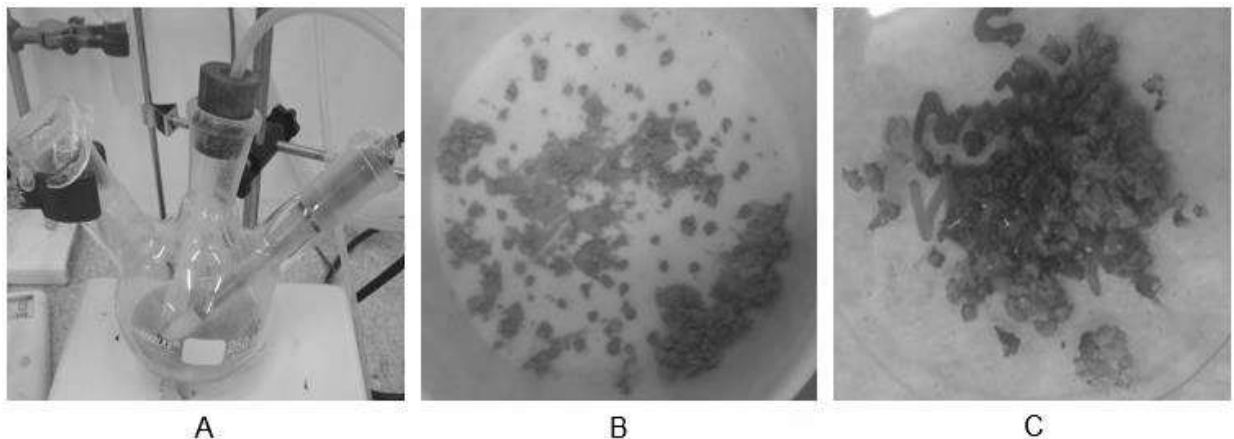


Figura 19 Processo de obtenção do complexo NMS-Ag. A-) Produto final da síntese do complexo NMS-Ag. B-) Material obtido após filtração a frio. C-) Mudança de cor do material após o processo de secagem a 40 ° C

Fonte: Autor

5.2. Associação polimérica com a Quitosana

A solubilização do biopolímero foi realizada a pH 4.28, obtendo uma solução protonada e solúvel no meio aquoso ácido. O acoplamento ou associação polimérica com o complexo NMS-Ag foi realizado a um pH próximo a 7, nas quais as unidades de glucosamina e N-acetil glucosamina são desprotonadas e junto com o hidroxil C3 e C6 podem estabelecer ligações de hidrogênio, com as porções carregadas do complexo, como mostradas na figura 20 A. O material recuperado foi lavado com água destilada fria e recuperado por centrifugação (Figura 20 B) para a sua secagem subsequente a 40°C, obtendo um sólido amarelo claro. O rendimento do processo foi de 91,20% w/w

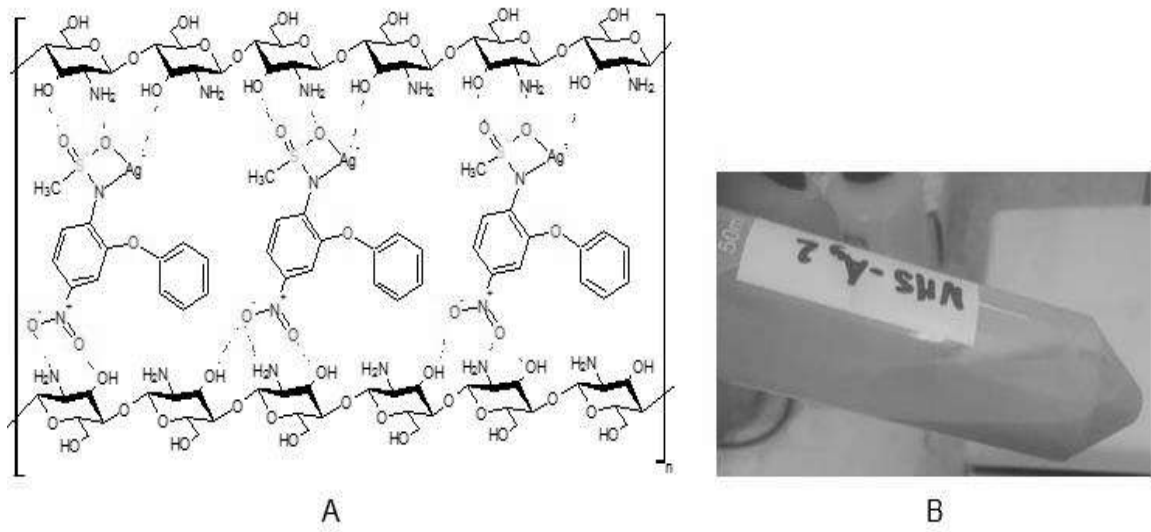


Figura 20 Associação polimérica entre Ch e o complexo NMS-Ag. A-) Diagrama da possível interação do complexo NMS-Ag-Ch. B-). Sólido obtido por centrifugação.

Fonte: Autor, Software-Chemsketch

5.3 Ensaios de solubilidade dos complexos NMS-Ag e NMS-Ag-Ch e Quantificação da NMS nas amostras

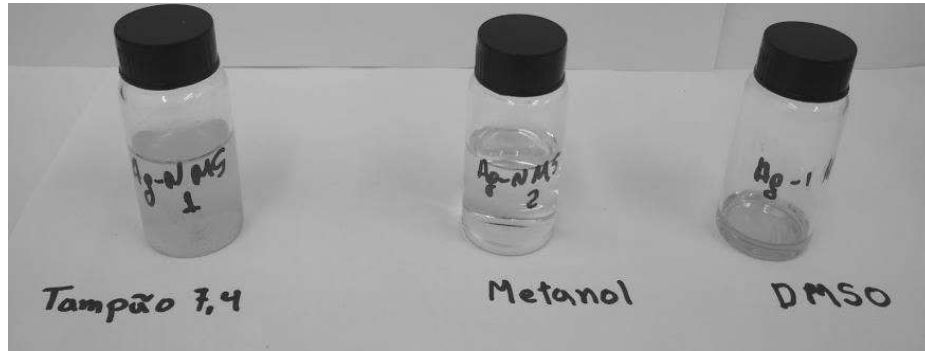
Após a formação do complexo e a associação polimérica com a quitosana, ensaios qualitativos de solubilidade foram realizados com três solventes, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 Testes de solubilidade qualitativa, com três solventes diferentes à temperatura ambiente

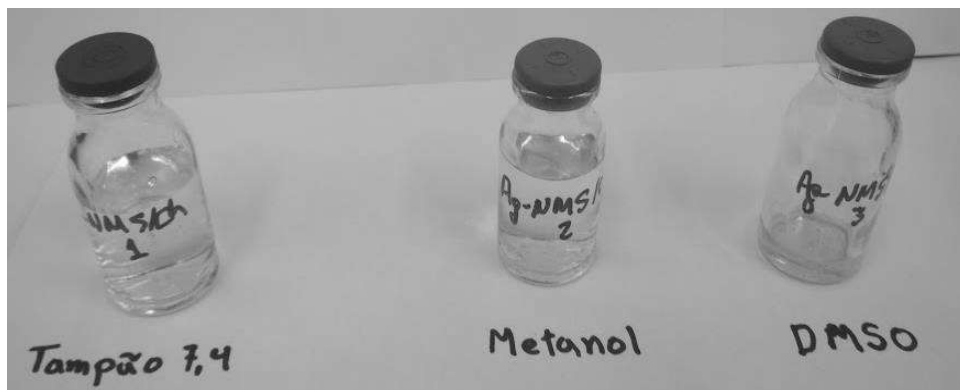
Complexo	Média da massa (mg)	Buffer 7,4 (10 mL)	pH	Metanol (10 mL)	pH	DMSO(3 mL)	pH
NMS-Ag	1,3 ± 0,002	Parcialmente solúvel	7,41	Totalmente solúvel	7,38	Totalmente solúvel	6,80
NMS-Ag-Ch	1,3 ± 0,002	Parcialmente solúvel	7,74	Parcialmente solúvel	6,76	Parcialmente solúvel	6,54

Fonte: Autor

O complexo NMS-Ag (Figura 21A) apresentou maior solubilidade em relação a associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch, (Figura 21B), já que a presença da quitosana impede a liberação do material que se encontra no interior do polímero.



A



B

Figura 21 Testes de solubilidade qualitativa dos complexos sintetizados em três solventes A-) complexo NMS-Ag B) complexo NMS-Ag-Ch
Fonte: Autor

Para a quantificação da NMS, utilizou-se o metanol como solvente, a partir de uma solução mãe usando oito pontos, avaliando a um comprimento de onda de 295 nm, que apresentou a máxima absorvância, obtendo assim o seguinte gráfico, com coeficiente de correlação de 0,99863 para a equação $Y = 25,01335 \cdot X - 0,00432$, os dados foram analisados no programa Origin Pro 9 (Figura 22)

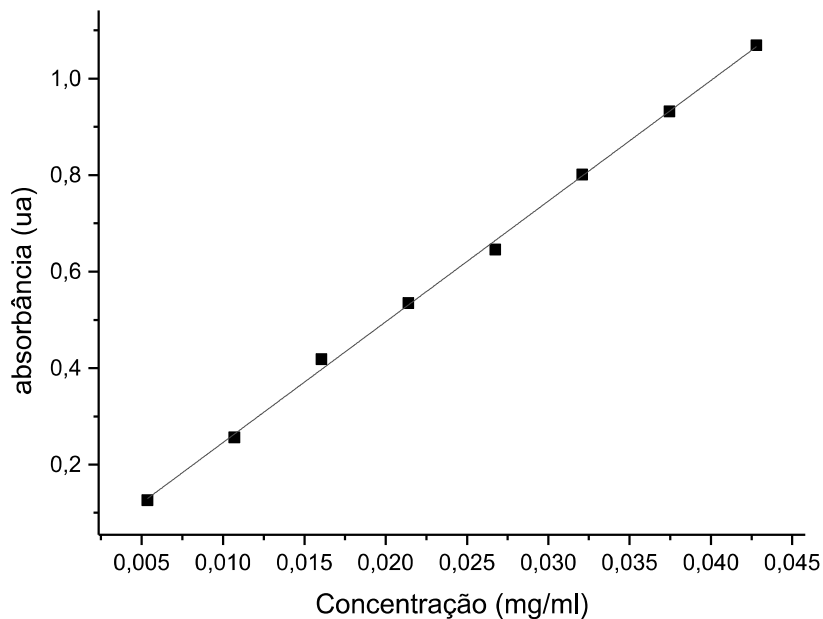


Figura 22 Curva de calibração da NMS em metanol avaliada ao comprimento de onda de 295 nm
Fuente: Autor, Origin Pro 9

A quantificação da NMS no Complexo de NMS-Ag mostrou **52,20% W/W NMS/NMS-Ag**, entretanto a associação polimérica com a quitosana (NMS-Ag-Ch) apresenta **8,54%W/W NMS/NMS-Ag-Ch**. A diminuição acentuada de NMS pode estar associada ao método de síntese que é tradicional, tanto para o complexo como para a associação polimérica, além disso que há uma perda significativa na quantidade de material devido à instabilidade química do complexo.

5.4 Caracterização do complexo NMS-Ag e NMS-Ag-Ch

A caracterização do material sintetizado foi realizada principalmente por técnicas analíticas, para saber se o complexo foi devidamente formado. A técnica UV-Vis foi usada para identificar transferências eletrônicas dentro dos componentes comparados com seus precursores, enquanto a técnica de infravermelho (IV) foi usada para determinar se algumas das vibrações presentes no ligante sofrem qualquer modificação na presença do íon metálico. A Análise termogravimétrica foi realizada com a finalidade de observar a velocidade de degradação do complexo livre comparado com o complexo associado com a quitosana

5.4.1 ANÁLISE DA ABSORBÂNCIA NO ESPECTRO UV-VIS

Os espectros de UV-Vis do sólido NMS e NMS-Ag (Figura 23) mostraram deslocamento no comprimento de onda, devido as interações entre os locais de ligações coordenadas da prata e alguns grupos funcionais da NMS, especialmente nos átomos de N e O do grupo sulfonamidas (DE PAIVA et al., 2012, NUNES et al., 2016). Desta forma, os espectros UV-Vis foram afetados de maneira consistente pela interação molecular que existe entre a NMS e a prata.

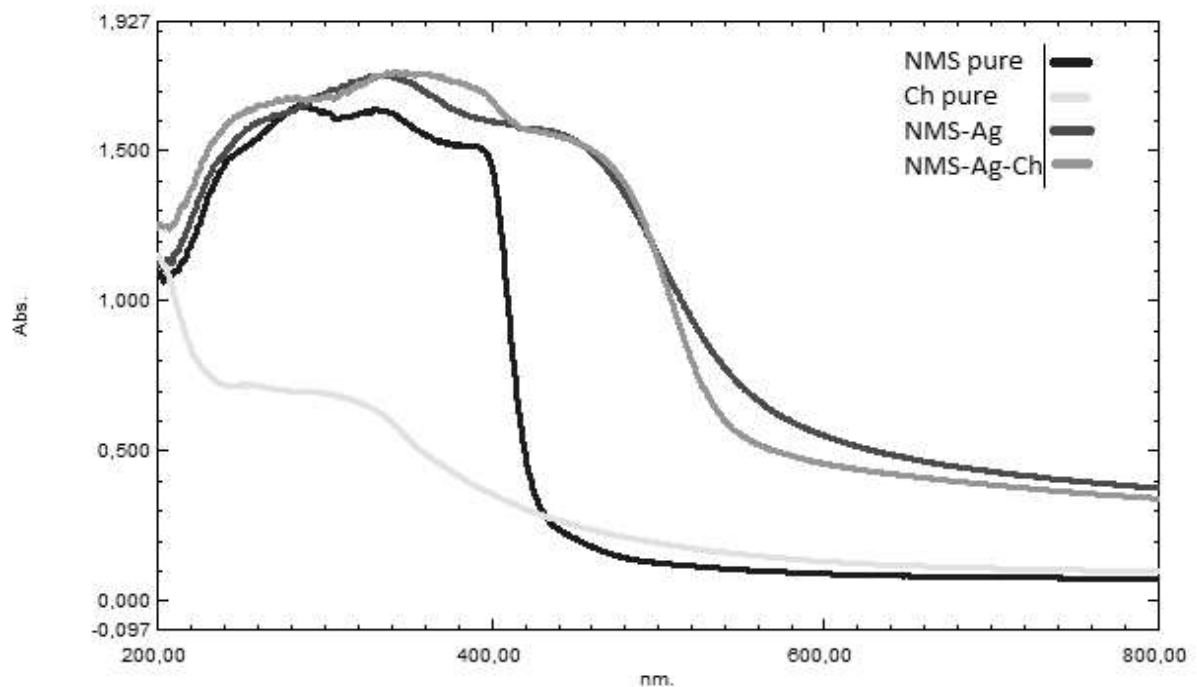


Figura 23 Espectro de absorção ultravioleta para NMS puro (azul), para complexo NMS-Ag (vermelho), quitosana pura (amarelo) e complexo NMS-Ag-Ch (verde)

Fonte: Autor, Origin Pro 9

O espectro de NMS (Curva azul) mostrou transições π e π^* dominantes, exibindo um pico máximo de 394 nm relacionado ao grupo nitro-arilo, que é visto nas soluções e no estado sólido. O espectro do complexo NMS-Ag (Curva vermelho) manteve o mesmo perfil da NMS, no entanto apresentou deslocamento no comprimento de onda mais longo (450nm), indicando mudança vibracional nas ligações moleculares que foram modificadas pela interação com o metal.

Além disso, observou-se que a Ch puro (Curva amarela) demonstrou absorção máxima em aproximadamente 247 nm, corroborando aos achados de Kumirska (et al., 2010). Este fato está associado aos dois grupos cromóforos UV distintos, - N-acetilglucosamina (GlcNAc) e glucosamina (GlcN) - contribuírem de forma simples e aditiva para a absorbância total destes polímeros a um comprimento de onda particular (entre 150 nm - 250 nm), que é característico de compostos saturados com átomos de pares de elétrons livres de natureza $n-\sigma^*$

O complexo NMS-Ag-Ch (Curva verde) mostrou duas alterações em relação à absorbância a NMS-Ag, a primeira alteração é o deslocamento e alargamento do pico próximo a 424 nm que está associado à absorção da Ag (CABRERA; LÓPEZ; SANTIAGO, 2008; KUMAR-KRISHNAN et al., 2015). Este fato pode ser devido às interações presentes do complexo com a matriz polimérica de quitosana que contém grupos hidroxila e amino, que podem favorecer a formação de quelatos (USMAN et al., 2012, KUMAR-KRISHNAN et al., 2015), por transferência de elétrons de quitosana para íon metálico. A segunda alteração foi observada na absorbância 250 nm que está relacionada aos grupos N-acetilglucosamina e glucosamina, e a sua possível interação.

5.4.2 ANALISE DO ESPECTRO INFRAVERMELHO (IV)

O espectro infravermelho da NMS é destacado por ter comprimentos de onda com alongamento de (NH) que aparece como um pico fino a 3282 cm^{-1} , o alongamento assimétrico do grupo sulfonil ($\text{O} = \text{S} = \text{O}$. vas) está em 1330 cm^{-1} , enquanto o alongamento simétrico ($\text{O} = \text{S} = \text{O}$ vs) está em 1163 cm^{-1} . Por outro lado, o alongamento assimétrico do grupo nitro ($\text{O} = \text{N} = \text{O}$ vas) é de 1523 cm^{-1} e o alongamento simétrico ($\text{O} = \text{N} = \text{O}$ vs) é de 1384 cm^{-1} . O alongamento (C-S) foi encontrado em 756 cm^{-1} .(Figura 24)(tabela 8)

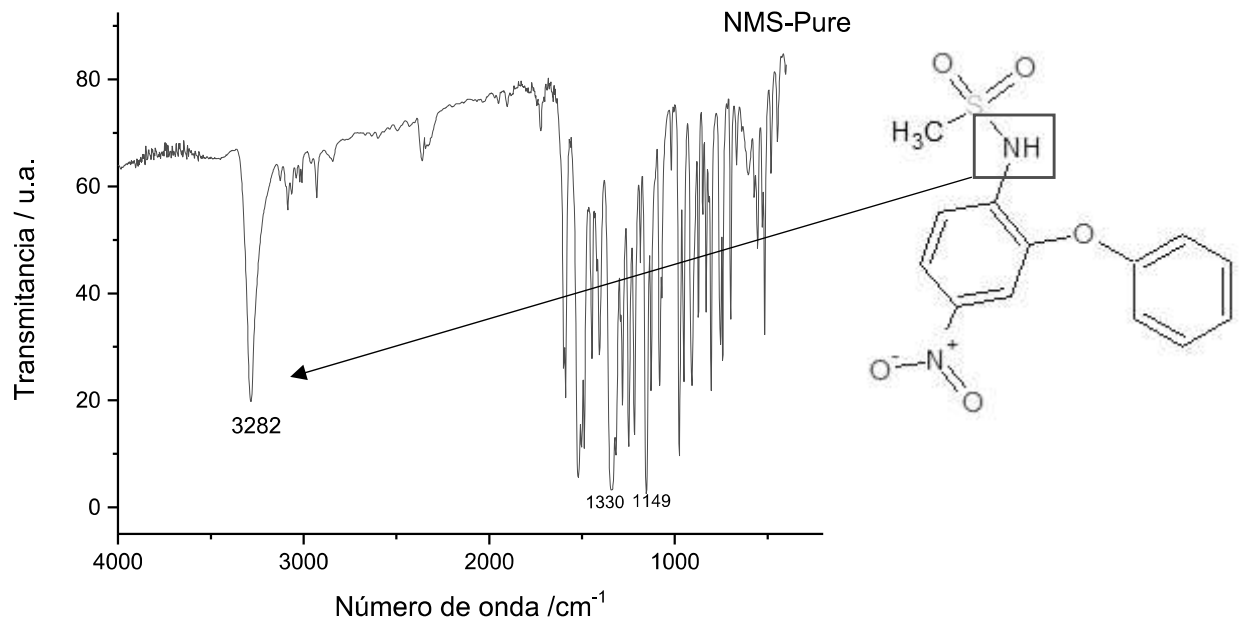


Figura 24 Espectro infravermelho da NMS
Fonte: Autor, Origin Pro 9

Tabela 8 Resumo dos dados faixa de comprimento de onda teórica e experimental para o grupo das sulfonamidas

Grupo	Faixa de comprimento de onda teórico	Comprimento de onda experimental
N-H	3250 cm ⁻¹ - 3320 cm ⁻¹	3282 cm ⁻¹
(O=S=O. v_{as})	1325 cm ⁻¹ - 1350 cm ⁻¹	1330 cm ⁻¹
(O=S=O. v_s)	1160 cm ⁻¹ - 1175 cm ⁻¹	1163 cm ⁻¹
(C-S)	754 cm ⁻¹ - 773cm ⁻¹	756 cm ⁻¹
(O=N=O. v_{as})	1522 cm ⁻¹ - 1550 cm ⁻¹	1523cm ⁻¹
(O=N=O. v_s)	1300 cm ⁻¹ - 1390 cm ⁻¹	1384cm ⁻¹

Fonte: PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001)

Entretanto, o espectro do complexo NMS-Ag revelou evidências que comprovam a formação de ligações coordenadas entre o ligante e o metal. Primeiro, o desaparecimento do pico de (N-H) mostrado na Figura 25, devido à perda do hidrogênio que estava ligado ao N do grupo sulfonamida, e que posteriormente se liga ao íon de prata (Ag⁺).

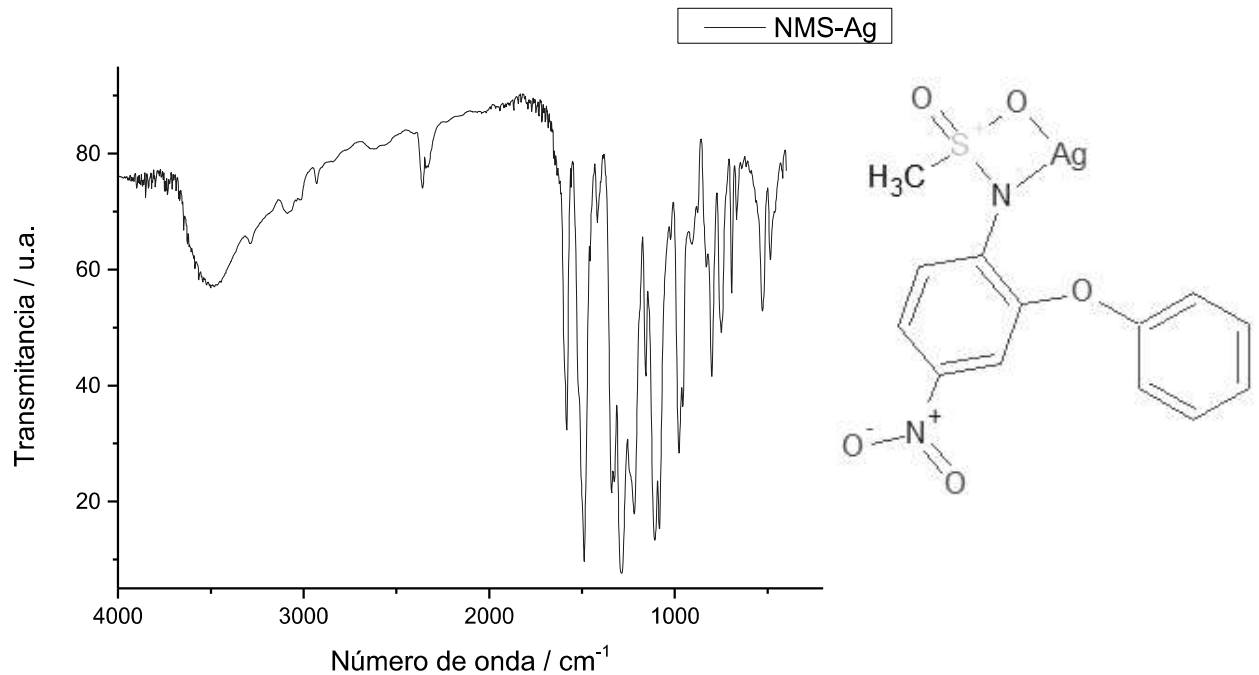


Figura 25 Espectro infravermelho do complexo Nimesulide-Prata (NMS-Ag)

Fonte: Autor, Origin Pro 9

Por outro lado, o deslocamento dos alongamentos simétricos e assimétricos ($O = S = O$. vas) e ($O = S = O$. vs) para energias mais baixas, mostra um enfraquecimento da ligação ($S = O$), especialmente do átomo de O, visto que a interação de S, leva ao deslocamento deste íon em energias maiores (figura 26) (NAKAMOTO, 2009). Em relação ao grupo nitro ($O = N = O$), pode-se observar que há uma mudança no pico assimétrico de 1523 cm^{-1} para 1495 cm^{-1} , enquanto o pico simétrico permaneceu no mesmo local a 1384 cm^{-1} , indicando possível interação.

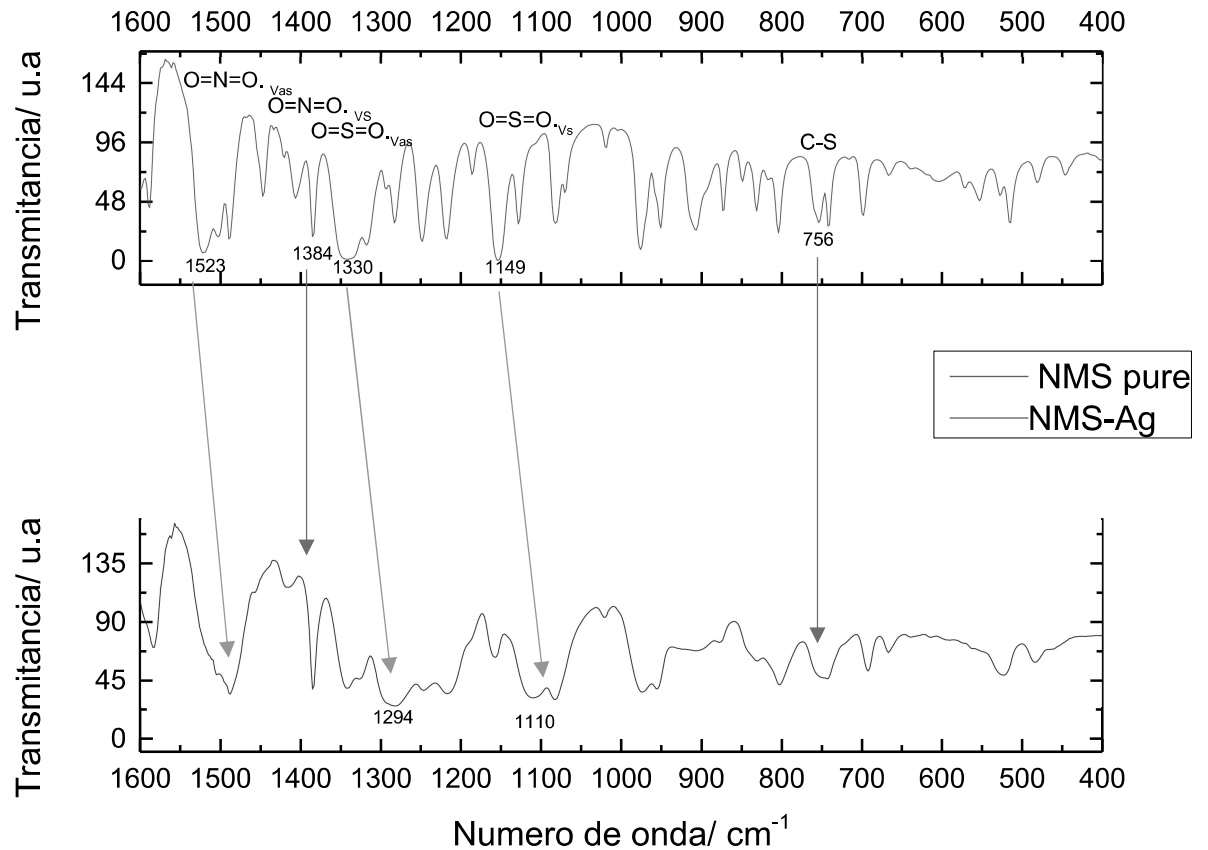


Figura 26 Espectro infravermelho de NMS pura (vermelho) e NMS-Ag (azul) na área da impressão digital

Fonte: Autor, Origin Pro 9

Finalmente, na Figura 27 mostra os espectros da quitosana pura (Ch) e a associação polimérica NMS-Ag com a quitosana (NMS-Ag-ch). A quitosana e os grupos presentes na sua estrutura observam-se nas bandas características de 3431 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações OH; 2872 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C-H; 1657 cm^{-1} atribuída à absorção da carbonila do grupo —N—C=O; 1427 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação —CN de amida e 1322 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação —CN de grupos amino. Entanto no espectro da quitosana associadas com o complexo NMS-Ag, observam-se as bandas características dos grupos presentes na estrutura da quitosana, com mudanças de intensidade e deslocamentos de algumas bandas. A banda em 3431 cm^{-1} referente aos estiramentos das ligações OH não apresenta deslocamento, mas é mais estreita, sugerindo uma possível interação entre os grupos OH da quitosana e o cátion (Ag^+) do complexo. A banda em 1657 cm^{-1} atribuída à absorção da carbonila do grupo —N—C=O tem um pequeno deslocamento e apresenta uma mudança na intensidade do pico e nas formas

subsequentes, e a banda em 1344 cm^{-1} referente à deformação do grupo NH_2 tem um grande aumento de intensidade e um deslocamento para um menor comprimento de onda, sugerindo uma possível interação entre os grupos NH_2 presentes na estrutura da quitosana e os grupos $\text{O}=\text{N}-\text{O}^-$ e $\text{O}=\text{S}=\text{O}$, presentes na estrutura do Complexo NMS-Ag. Os deslocamentos e mudança de intensidade de picos característicos de grupamentos da quitosana sugerem uma possível interação com o complexo NMS-Ag.

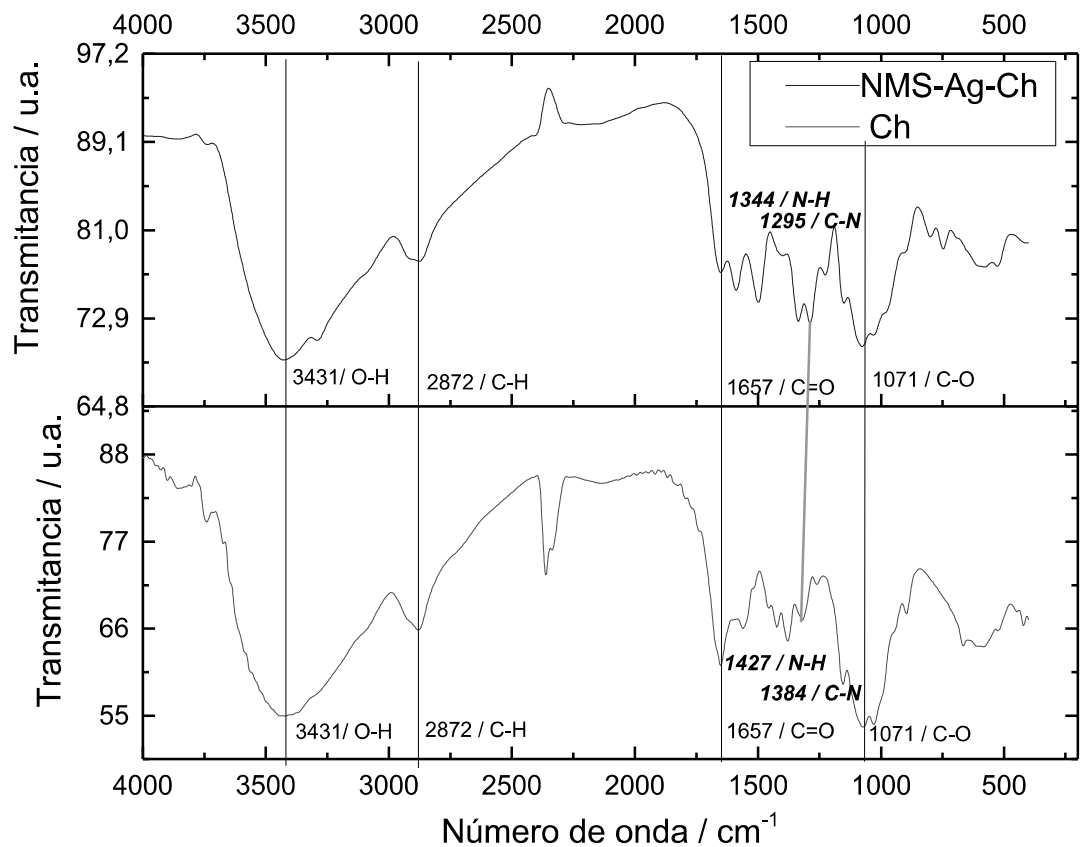


Figura 27 Espectro infravermelho do complexo NMS-Ag-Ch

Fonte: Autor, Origin Pro 9

5.4.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICO TGA

O complexo NMS-Ag (Figura 28), apresenta a primeira leve perda de massa em aproximadamente 80 °C a 206 °C indicando apenas 0,184% que poderia ser da pouca água presente nas ligações de coordenação, mais tarde ocorreu a perda de componentes de baixo peso molecular juntamente com os primeiros produtos de decomposição desde 206 °C até 375 °C. Como a atmosfera é composta de nitrogênio, é inerte para reações de oxidação, porém, existem outros mecanismos de degradação térmica, neste caso o ligante (NMS), que contém o valor de aproximadamente 45,36% da massa inicial. Após 400 °C há uma diminuição gradual da massa até 1000 °C, correspondendo às cinzas de óxidos metálicos ou sais não oxidáveis (18,79%), sendo o material residual do processo termogravimétrico 35,64%. No gráfico termogravimétrico diferencial, se pode ver a temperatura na qual a perda máxima de material que está a 315 °C corresponde à NMS.

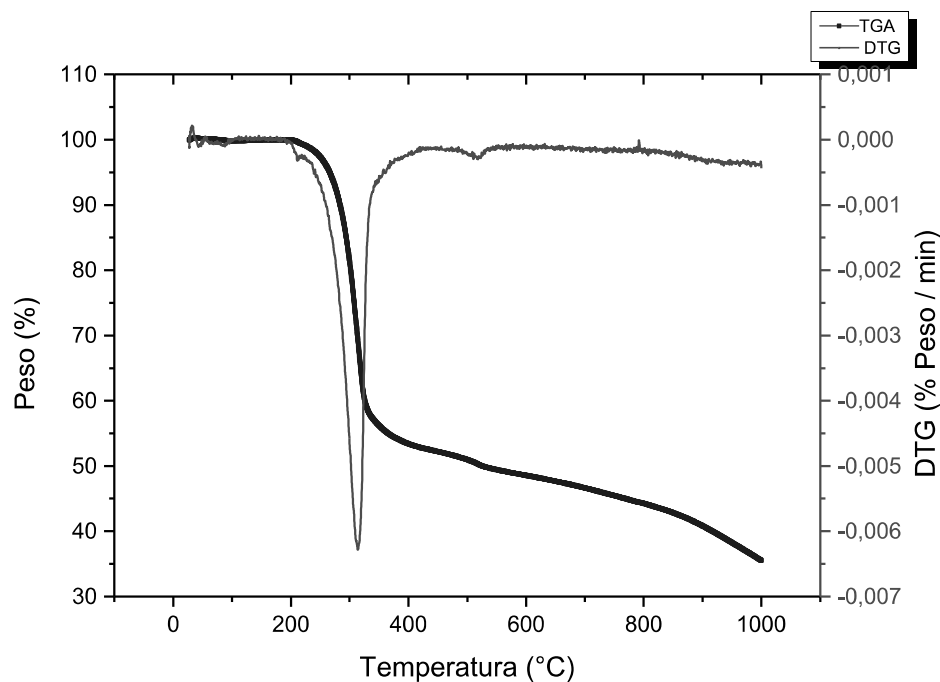


Figura 28 Análise termogravimétrica realizada no complexo NMS-Ag, em modo dinâmico a uma taxa de aquecimento de 10 °C / min e atmosfera de nitrogênio
Fonte: Autor, Origin Pro 9

Por outro lado, a associação polimérica, NMS-Ag-Ch (Figura 29) apresenta a primeira perda de 40 ° C até 117 ° C correspondente a 4,753% que é devida à água e outros elementos voláteis presentes nas redes poliméricas da quitosana, permanecendo quase constante até 200 ° C, onde apresenta uma perda de componentes de baixo peso molecular juntamente com a despolimerização de quitosana e decomposição da NMS até 393 ° C esse valor é aproximadamente 43,37% da massa inicial. Após 400 ° C há uma diminuição gradual da massa para 1000 ° C, correspondendo às cinzas dos óxidos metálicos (22,65%). O gráfico termogravimétrico diferencial mostra a temperatura na qual a perda máxima de material ocorre, no entanto, para este gráfico existem dois picos de perda máxima um a 252,20 ° C correspondendo a quitosana como se mostra no trabalho de (BARBOSA et al., 2019) e outro a 312,62 ° C correspondente à NMS-Ag. Indicando que não há uma proteção do polímero ao complexo pela degradação térmica.

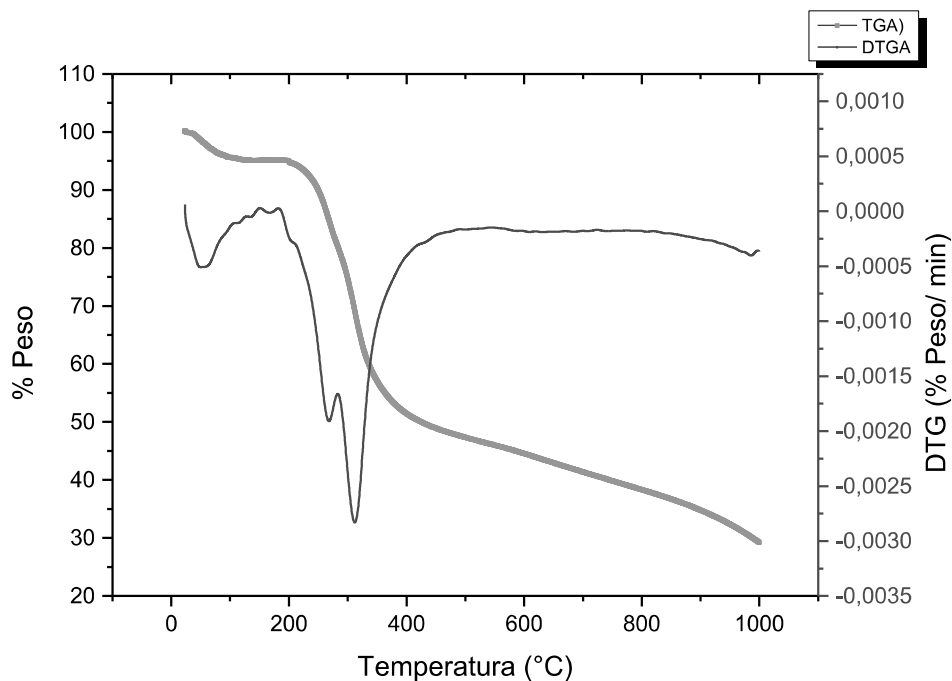


Figura 29 Análise termogravimétrica realizada no complexo NMS-Ag-Ch, em modo dinâmico a uma taxa de aquecimento de 10 ° C / min e atmosfera de nitrogênio

Fonte: Autor, Origin Pro 9

5.5 Morfologia e tamanho das partículas

Os dados estatísticos da Morfologia obtidos das partículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, mostram que não tem uma diferença significativa em quanto à forma da partícula, a qual não é uniforme nem simétrica. O teste foi feito para achar se a diferença entre as duas meias é igual a zero ou diferente de zero. Como o valor-P calculado não é menor que 0,05, não se pode rejeitar a hipótese nula. Então se achou que a associação polimérica com a quitosana não tem relação com a forma das micropartículas. Pelo tanto, se pode achar a semelhança entre as duas populações. (Figura 30)

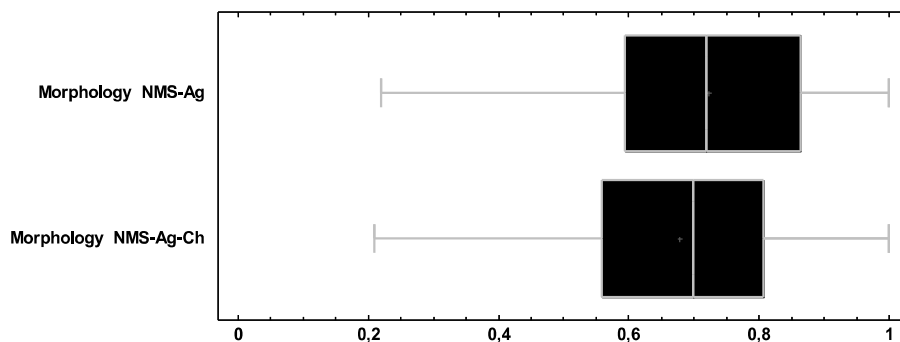


Figura 30 Diagrama de caixas da Morfologia das micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch
Fuente: Autor. Software statgraphics centurion XVI

Não entanto, os dados estatísticos do tamanho de partícula obtidos das populações das amostras de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, mostram que a amostra NMS-Ag não tem uma distribuição normal, pelo valor de curtosis e sesgo estandardizado, pelo qual é necessário trabalhar com uma estatística não paramétrica. Por este motivo se trabalharam com o test W de Mann Whitney para comparar as medianas das amostras (Figura 31). Devido a que o valor P é menor que 0,05 existe uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas com um nível de confiança de 95%. Pelo qual se concluiu que a quitosana tem uma influência forte no tamanho da partícula ao momento de se apresentar a associação polimérica com o complexo (Tabela 9)

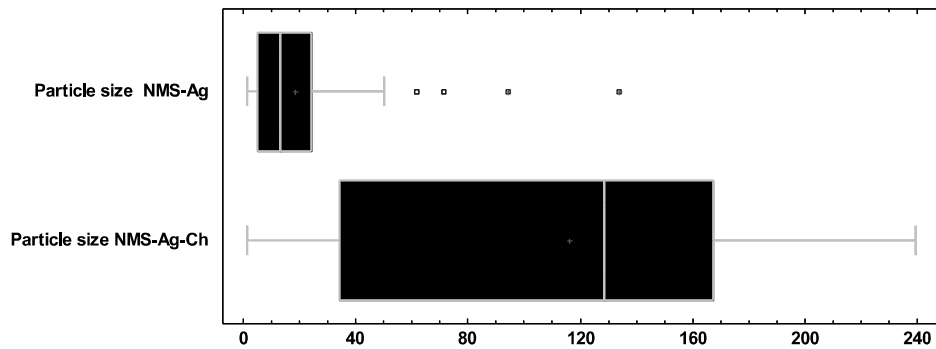

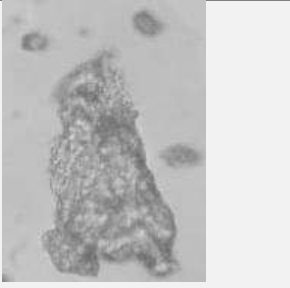


Figura 31 Diagrama de caixas do tamanho das micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch

Fuente: Autor. Software statgraphics centurion XVI

Tabela 9 Morfologia, tamanho e dados estatísticos das amostras das micropartículas sintetizadas

Partícula	NMS-Ag	NMS-Ag-Ch
Morfologia 40 X		
Tamanho médio da partícula (um)	18,70	124,17
Desvio padrão	20,34	77,46
Valor mínimo(um) –máximo (um)	1,41 -133,8	1,41-384,31

Fuente: Autor

5.6 Cinética de liberação a pH 7,4

A quantificação da NMS foi feita utilizando como solvente buffer fosfatos pH 7.4, a partir de uma solução mãe, usando oito pontos, avaliando a um comprimento de onda de 394 nm, obtendo assim o seguinte gráfico, com coeficiente de correlação de 0,99978 para a equação $Y = 23,31237 * X - 0,004233$, os dados foram analisados no Origin Pro 9.(Figura 32)

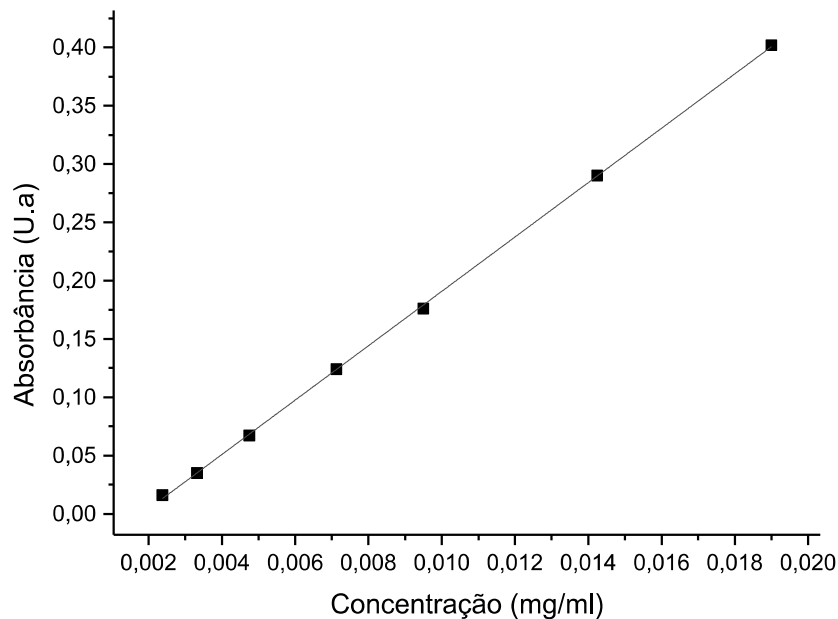


Figura 32 Curva de calibração da NMS em buffer Fosfatos 7,4 com absorbância a 394 nm
Fuente: Autor, Origin Pro 9

A liberação da NMS ao meio aquoso a pH=7,4 e temperatura de 37°C do complexo NMS-Ag e a associação polimérica NMS-Ag-Ch ocorre por um processo de difusão por um lado pelo rompimento do complexo (NMS-Ag) liberando a NMS, já que a estabilidade do complexo é dependente do meio solvente, o pH e a temperatura da cinética de liberação (37°C). Por outro lado, a liberação da NMS da associação polimérica NMS-Ag-Ch é feita através dos poros, rachaduras ou cavidades presentes no material polimérico, o *buffer* de fosfatos se incorpora ao interior do biopolímero fazendo a formação de uma fase misturada da NMS-solução, depois de uma determinada concentração de dissolução dentro do biopolímero, esta fase fica instável e separa-se em duas novas fases uma rica em NMS e outra rica na dissolução que penetra. Esta última fase, continua a sua difusão para o interior do material, repetindo-se inúmeras vezes a separação das fases misturadas NMS-dissolução (FERNÁNDEZ et al., 2009), é importante lembrar que a solubilidade da quitosana depende do peso molecular, caso seja alto peso molecular fica insolúvel no meio pelo qual o mecanismo é pela penetração do solvente.

Para o caso da NMS-Ag, o 35,09% da NMS foi liberado nos primeiros 30 min o que demonstra uma estabilidade alta do complexo de acordo as condições de liberação, além disso o seu tempo de liberação foi mais prolongado de 60 horas em comparação com a associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch no qual, 41,97% da droga foi liberada nos primeiros 30 min, chegando a um valor final de NMS de 70,64% em aproximadamente 30 horas (Figura 33).

Além do material das partículas, a influência do tamanho e morfologia, também tem um papel fundamental na cinética de dissolução. Por um lado, as partículas de NMS-Ag têm um tamanho médio de partícula de 20,34 μm , e as partículas de NMS-Ag-Ch tem um tamanho médio de partícula de 77,46 μm , por conseguinte a área superficial é maior para o complexo NMS-Ag e teria maior contato com o solvente, não obstante a sua morfologia e superfície de carga faz que as partículas se agreguem, além da sua natureza de ser um polímero de coordenação, que não é outra coisa que um cristal. Por outro lado, as partículas de NMS-Ag-Ch tem uma estrutura também amorfa, sem embargo, não se apresenta a mesma agregação das partículas, pela natureza polimérica e as condições de sínteses.

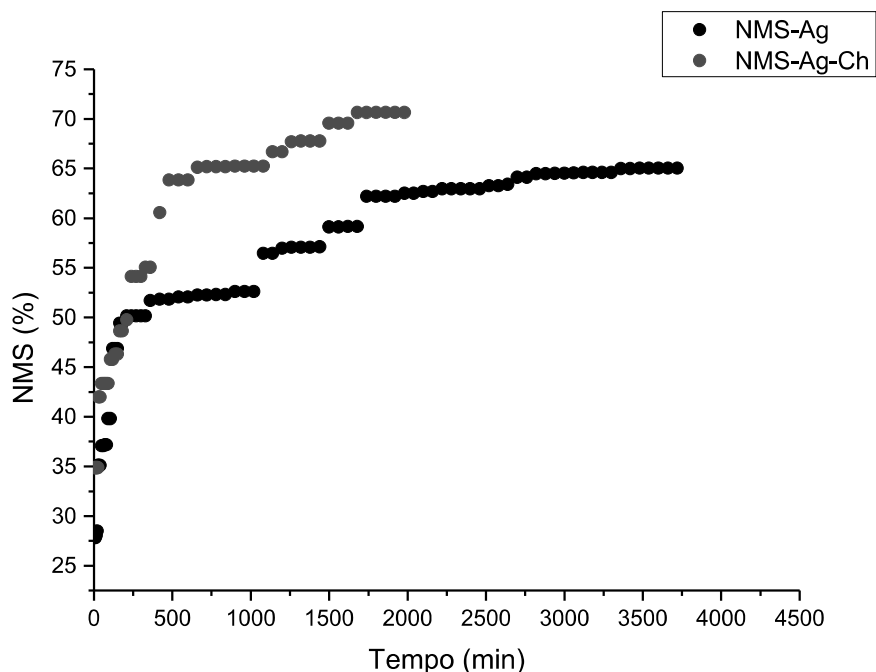


Figura 33 Cinética de liberação para as micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, de acordo a NMS% liberado em função do tempo.

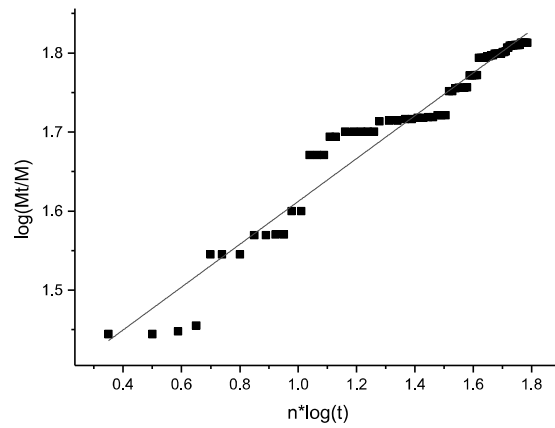
Fuente: Autor, Origin Pro 9

A taxa de libertação da NMS das micropartículas do complexo NMS-Ag, apresenta dois modelos cinéticos, de acordo com o coeficiente de correlação R^2 (tabela 10) é uma medida estatística que indica o que tão bem se ajusta os dados a um modelo estatístico. De acordo com o modelo cinético de Weibull (figura 34), avaliado pelo perfil de libertação do fármaco, o fenômeno de libertação acontece a partir de micropartículas poliméricas intumescíveis, não entanto, este modelo não tem concordância com o fenômeno que está acontecendo nas micropartículas, já que se trata de um polímero de coordenação, e não se trata de um polímero convencional. Outro modelo cinético que se ajusta ao perfil de libertação é o modelo de Korsmeyer e Peppas que tem um comportamento como se se encontrasse em um sistema polimérico seguido de erosão e/ou dissolução da matriz(FERNÁNDEZ et al., 2009), estabelecendo uma libertação fraccionada do fármaco, o sistema polimérico não deve apresentar inchaço ou contração. O complexo NMS-Ag formo durante a sua síntese monômeros, dímeros e até trimericos (DE PAIVA et al., 2012), além disso a constante cinética é descrita como a interação fármaco – polímero, poderia ser apresentada pela constante de estabilidade do polímero de coordenação (Figura 35)

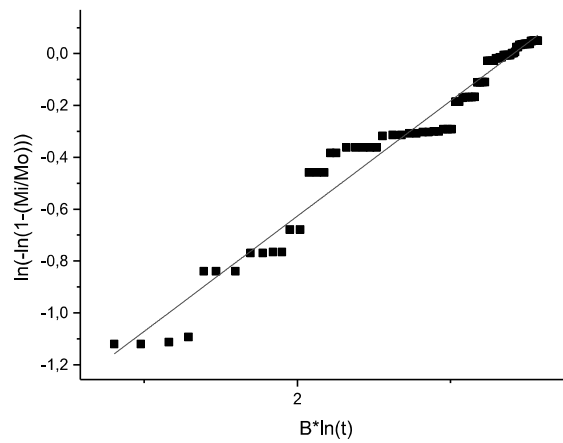
Tabela 10 coeficientes de correlação avaliados para os diferentes modelos cinéticos de libertação de fármaco do complexo NMS-Ag

Modelo cinético	R^2	Equação
Baker-lonsdate	0,8606	$y = 2^{-05}x + 0,0405$
Korsmeyer	0,9606	$y = 0,3013x + 1,3411$
Weibull	0,9695	$y = 0,4443x - 1,5158$
Hixon ceowell	0,6805	$y = 0,0002x + 3,4983$
Higuchi	0,8983	$y = 0,5426x + 36,181$

Fuente: Autor



A.



B.

Figura 34 Modelos cinéticos com melhores coeficientes de correlação, para o complexo NMS-Ag A-) Modelo de Korsmeyer B-) Modelo de Weibull
Fuente: Autor, Origin Pro 9

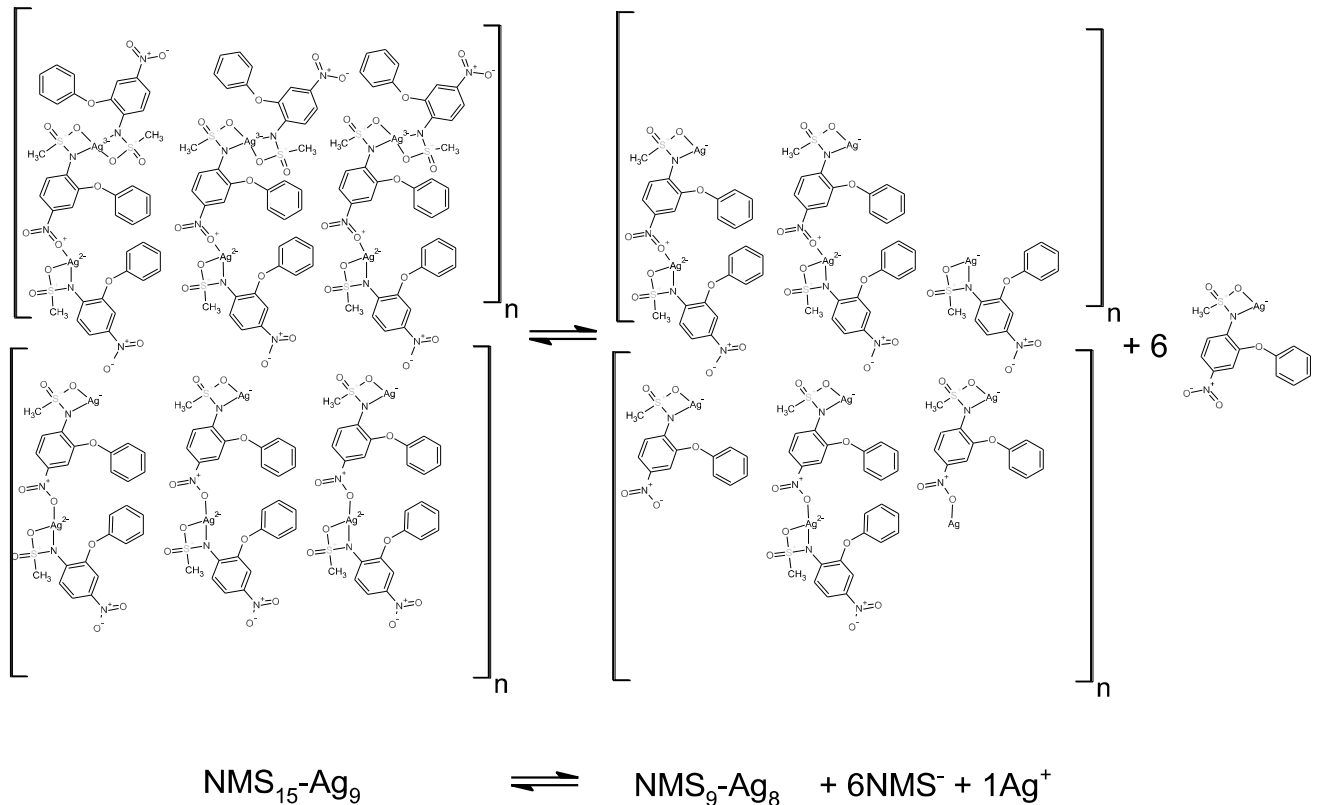


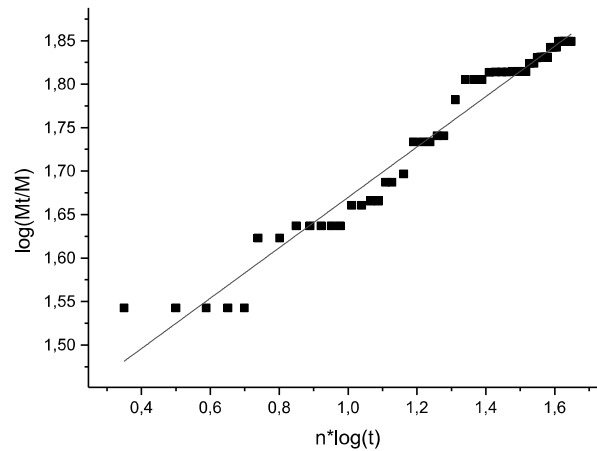
Figura 35 Representação gráfica do processo de difusão da NMS do complexo NMS-Ag
Fuente: Autor, Software-Chemsketch

Para o caso da associação polimérica com a quitosana, NMS-Ag-Ch, apresenta igualmente os mesmos modelos cinéticos (Tabela 11) (Figura 36), Neste caso o modelo de Weibull, oferece uma relação simples entre os parâmetros e as características geométricas do sistema, tem uma dependência de parâmetros na superfície específica (KOSMIDIS; ARGYRAKIS; MACHERAS, 2003). Assim como parâmetros que podem estar ligados a efeitos fisiológicos. (VAN BOEKEL, 2002). No caso da associação polimérica o complexo fica na parte superficial do polímero, aí o solvente tem um acesso mais rápido ao fármaco, também algumas partes ficam no interior do polímero, como se descreve na figura 37 e na figura 38 onde se podem ver as partículas antes da liberação do fármaco e como ficam as partículas depois da liberação do fármaco.

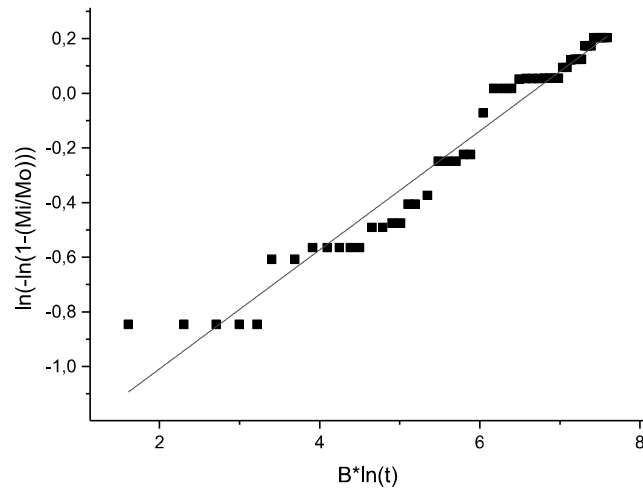
Tabela 11 Coeficientes de correlação avaliados para os diferentes modelos cinéticos de liberação de fármaco da associação polimérica NMS-Ag-Ch

Modelo cinético	R ²	Equação
Baker-Ionsdate	0,8729	$y = 5E-05x + 0,0436$
Korsmeyer	0,9676	$y = 0,2898x + 1,38$
Weibull	0,963	$y = 0,2177x - 1,4444$
Hixon ceowell	0,7515	$y = 0,2177x - 1,4444$
Higuchi	0,9267	$y = 0,873x + 36,797$

Fuente: Autor



A



B

Figura 36 Modelos cinéticos com melhores coeficientes de correlação, para a associação polimérica NMS-Ag-Ch A-) Modelo de Korsmeyer B-) Modelo de Weibull

Fuente: Autor, Origin Pro 9

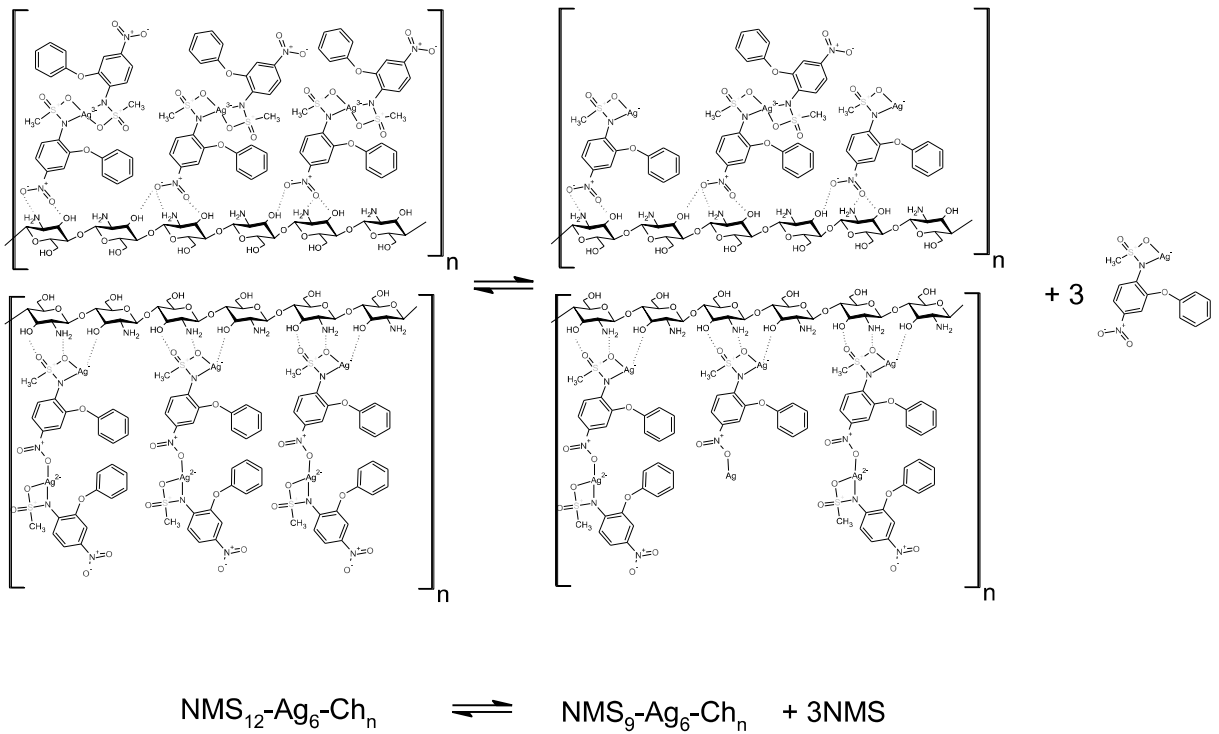


Figura 37 Representação gráfica do processo de difusão da NMS da associação polimérica NMS-Ag-Ch

Fuente: Autor, Software-Chemsketch

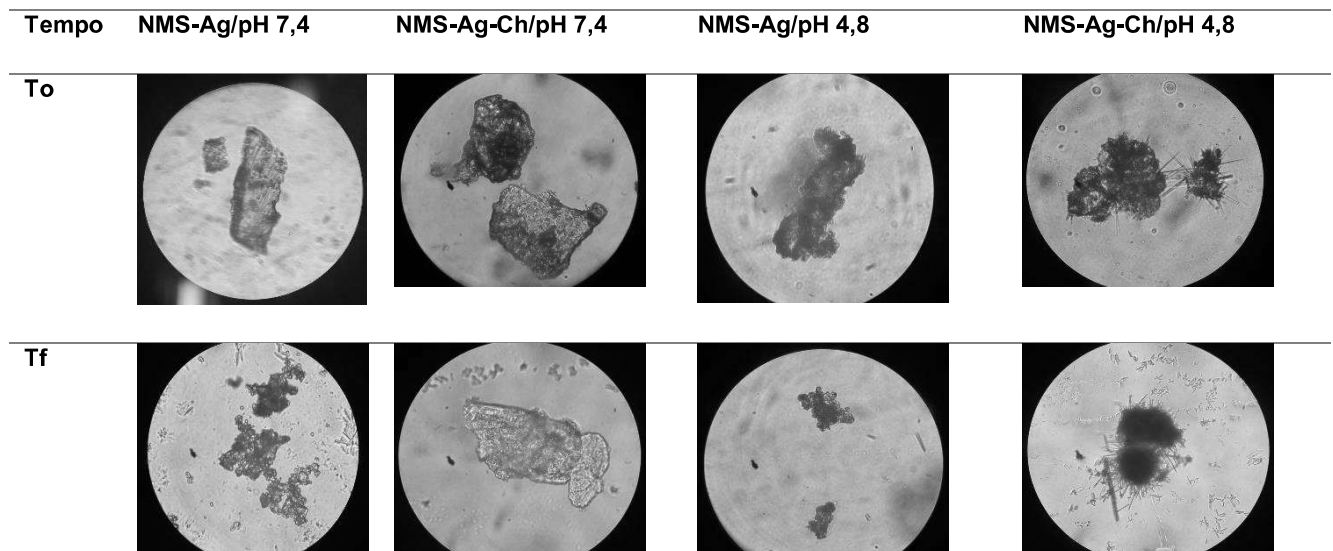


Figura 38 Aspecto das micropartículas de NMS-Ag e NMS-Ag-Ch antes da cinética de liberação (T0) e aspecto das micropartículas ao final da cinética de liberação (Tf)

Fuente: Autor

5.7 Atividade biológica

5.7.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação antimicrobiana (Tabela 12), se observa que NMS não mostrou ação antimicrobiana *in vitro* frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas avaliadas. Entretanto, os compostos NMS-Ag e NMS-Ag-Ch, a CIM variou entre 0,016 e 0,063 mg/mL para as bactérias gram-positivas, enquanto que a CIM para as bactérias gram-negativas variou entre 0,007 e 0,063 mg/mL, indicando que os compostos mostraram melhor atividade antimicrobiana frente as bactérias gram-negativas como se menciona no trabalho de (WHITEHOUSE, 2015). Este fato pode estar associado a morfologia das bactérias gram-negativas que apresentam uma parede celular complexa, cuja membrana externa pode interagir aos íons prata pela presença de lipopolisacarídeos e lipoproteínas, levando a inibição da força motriz de prótons e o transporte de elétrons da cadeia respiratória bacteriana, assim como pode afetar a permeabilidade de membrana, gerando a morte bacteriana. Entretanto, as bactérias gram-positivas estão protegidas pelo peptidoglicano, que é um dos principais componentes da parede deste grupo de bactéria. No entanto muitos autores sugerem um mecanismo que atende tanto bactérias gram positivas como gram negativas, onde a prata quebra as ligações glucosídicos $\beta - 1 \rightarrow 4$, que conectam os blocos de construção da peptidoglicano N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurânico. O que finalmente levaria à liberação dos blocos (ECKHARDT et al., 2013). Dentre as bactérias, o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* foram as mais suscetíveis a associação polimérica NMS-Ag-Ch, que pode ser devido à fatores extrínsecos como natureza da quitosana, solubilidade, grau de desacetilação e densidade de carga eletrostática, assim como a liberação da prata e NMS no meio, constituição de parede do microrganismo, pH e a temperatura do meio.

Tabela 12 CIM e CBM dos Compostos de NMS frente as cepas bacterianas ATCCATIVIDADE ANTIMICROBIANA CEPAS ATCC CIM E CBM MG.ML⁻¹

COMPOSTOS	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
NMS	>0,500	>0,500	>0,500	>0,500	>0,500	>0,500	>0,500	>0,500
NMS-AG	0,031	0,031	0,063	0,125	0,007	0,015	0,007	0,015
NMS-AG-CH	0,016	0,125	0,063	0,250	0,063	> 0,500	0,007	0,031
AgNO₃	0,031	0,031	0,031	0,062	0,003	0,007	0,003	0,007

Fonte: Autor

5.7.2 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO COMPLEXO E SUA ASSOCIAÇÃO POLIMÉRICA COM A QUITOSANA

Depois de ter o valor da NMS para os animais (numeral 4.2.2.2.2) de 5,836 mgNMS/Kg animal, se fez a extrapolação da mesma quantidade de NMS para o complexo e a associação polimérica, de acordo com o conteúdo já calculado no numeral 5.3. Equação 3 e Equação 4

NMS-Ag

$$\frac{52,20 \text{ mgNMS}}{100 \text{ mg NMS} - \text{Ag}} = 0,522 \frac{\text{mgNMS}}{\text{mgNMS} - \text{Ag}}$$

$$\frac{5,84 \text{ mgNMS}}{\text{Kg animal}} * \frac{1 \text{ mg NMS} - \text{Ag}}{0,522 \text{ mg NMS}} = 11,18 \frac{\text{mg NMS} - \text{Ag}}{\text{Kg animal}}$$

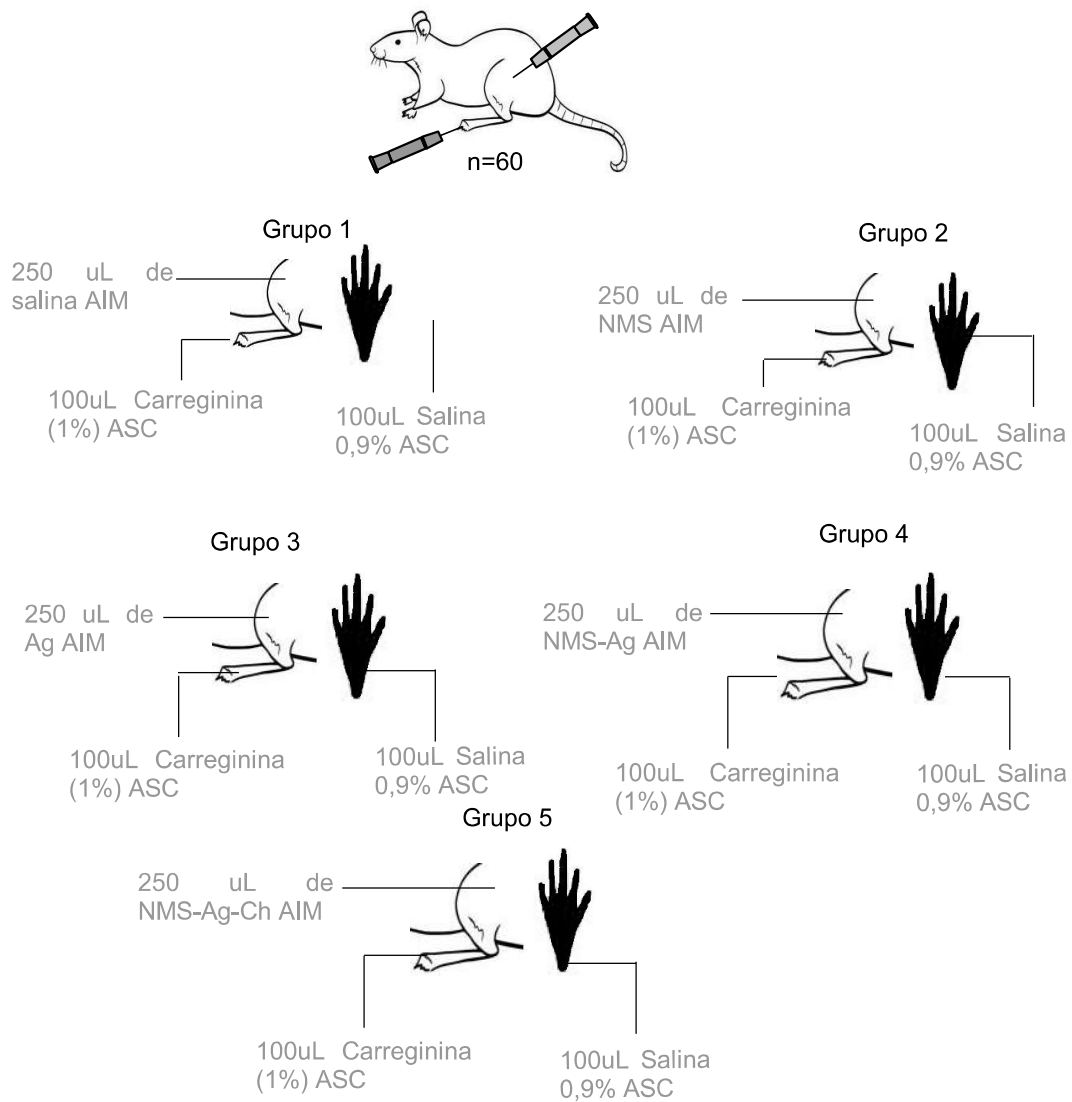
(3)

NMS-Ag-Ch

$$\frac{8,54 \text{ mgNMS}}{100 \text{ mg NMS} - \text{Ag}} = 0,0854 \frac{\text{mgNMS}}{\text{mgNMS} - \text{Ag}}$$

$$\frac{5,84 \text{ mgNMS}}{\text{Kg animal}} * \frac{1 \text{ mg NMS} - \text{Ag} - \text{Ch}}{0,0854 \text{ mg NMS}} = 68,38 \frac{\text{mg NMS} - \text{Ag} - \text{Ch}}{\text{Kg animal}}$$

(4)



Grupo	X	Y
1	Salina	0,9 %
2	NMS	5,843 mg/Kg
3	AgNO ₃	19,253 mg/kg
4	NMS-Ag	11,194 mg/Kg
5	NMS-Ag-Ch	68,373 mg/kg

AIM: Administração Intramuscular

ASC: Administração Subcutânea

Figura 39 Procedimento para a avaliação anti-inflamatório de cada um dos compostos no processo induzido por carragenina

Fuente: Autor

Os grupos NMS (5,84 mg/kg), NMS-Ag (11,194 mg/kg) e NMS-Ag-Ch (68,37mg/kg) não alteraram o edema induzido por carragenina até 30 min (Figura 40. A), mostrando que estes compostos não atuam na primeira fase da inflamação por carragenina que é dependente de histamina e serotonina (COURA et al., 2015). No entanto, nos tempos 60, 90 e 120 min foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos NMS, NMS-Ag e NMS-Ag-Ch (Figura 40 B,C). Nos primeiros 60 minutos após a indução, o grupo NMS e NMS-Ag reduziram o edema a aproximadamente 30,5 e 30,3%, respectivamente comparado ao grupo salina. Por outro lado, o grupo tratado com o complexo polimérico NMS-Ag-Ch levou a uma redução de 52,6% do edema induzido por carragenina neste tempo avaliado. Com 120 minutos, o grupo NMS reduziu 33,8%, NMS-Ag 29,3%, enquanto que o complexo NMS-Ag-Ch reduziu 69,1% comparado ao grupo salina. Estes dados mostram que a associação polimérica teve uma maior ação anti-inflamatória (anti-edematogênica) na segunda fase inflamatória da carragenina (60 -120 min), que é dependente principalmente da liberação de mediadores lipídicos como prostaglandina E2 (PGE2) (MA et al., 2013; SINGH; KUMAR, 2014) . Este efeito pode estar justificado, por um lado, associado a potencialização da ação anti-inflamatória ocasionada pela quitosana, conforme já descrito por outros autores a inibição de PGE-2 e COX-2 (PANGESTUTI; BAK; KIM, 2011; AZUMA et al., 2015; XIONG et al., 2018). Por outro lado, esses dados corroboram aos resultados anteriores de liberação da NMS *in vitro*, onde a associação polimérica NMS-Ag-Ch (Figura 33) teve maiores valores de liberação de NMS nos primeiros 60 min em comparação com o complexo NMS-Ag.

No entanto, após 150 min da indução do edema, o grupo tratado com a associação polimérica (NMS-Ag-Ch) retornou aos níveis de edema similar ao grupo NMS e NMS-Ag, fato que pode estar associado a elevada cinética de liberação da NMS no tecido nos primeiros minutos, junto com NMS que ainda fica presa na micropartícula. Além disso, outro aspecto importante a ser ressaltado é que a associação polimérica (NMS-Ag-Ch) atue principalmente na inibição de COX e conseqüentemente PGE2, mas não em mediadores proteicos, tais como citocinas e quimiocinas que estão presentes em grande quantidade no sítio inflamatório após 3 horas da estimulação por carragenina (LORAM et al., 2007). Sugere-se ainda que os efeitos fisiopatológicos da PGE2 como febre e dor poderiam ser então melhor controlados após o tratamento com NMS-Ag-Ch, que se correlaciona com uma

possível atividade antipiréticas e antinociceptiva do composto (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2014b).

O processo inflamatório desencadeado pela carragenina aumenta a produção de mediadores pró-inflamatórios tais como NO, TNF- α , IL-1 e IL-6 além de espécies reativas na pata, o que acarreta dano tecidual como mostrado na figura 40D. Nesse sentido, os dados mostraram que os tratamentos NMS, NMS-Ag e NMS-Ag-Ch inibiram os níveis de MDA e GSH induzidos pela carragenina na pata, provavelmente devido a um maior consumo de GSH no tecido para a geração das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidases, que levam a menor produção de ROS e danos oxidativos em macromoléculas, como lipídios (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). Em relação a capacidade antioxidante total, não foi possível observar diferença significativa 240 minutos após a indução do edema em nenhum dos grupos avaliados, no entanto, ressalta-se que o método de TEAC avalia antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de forma geral.

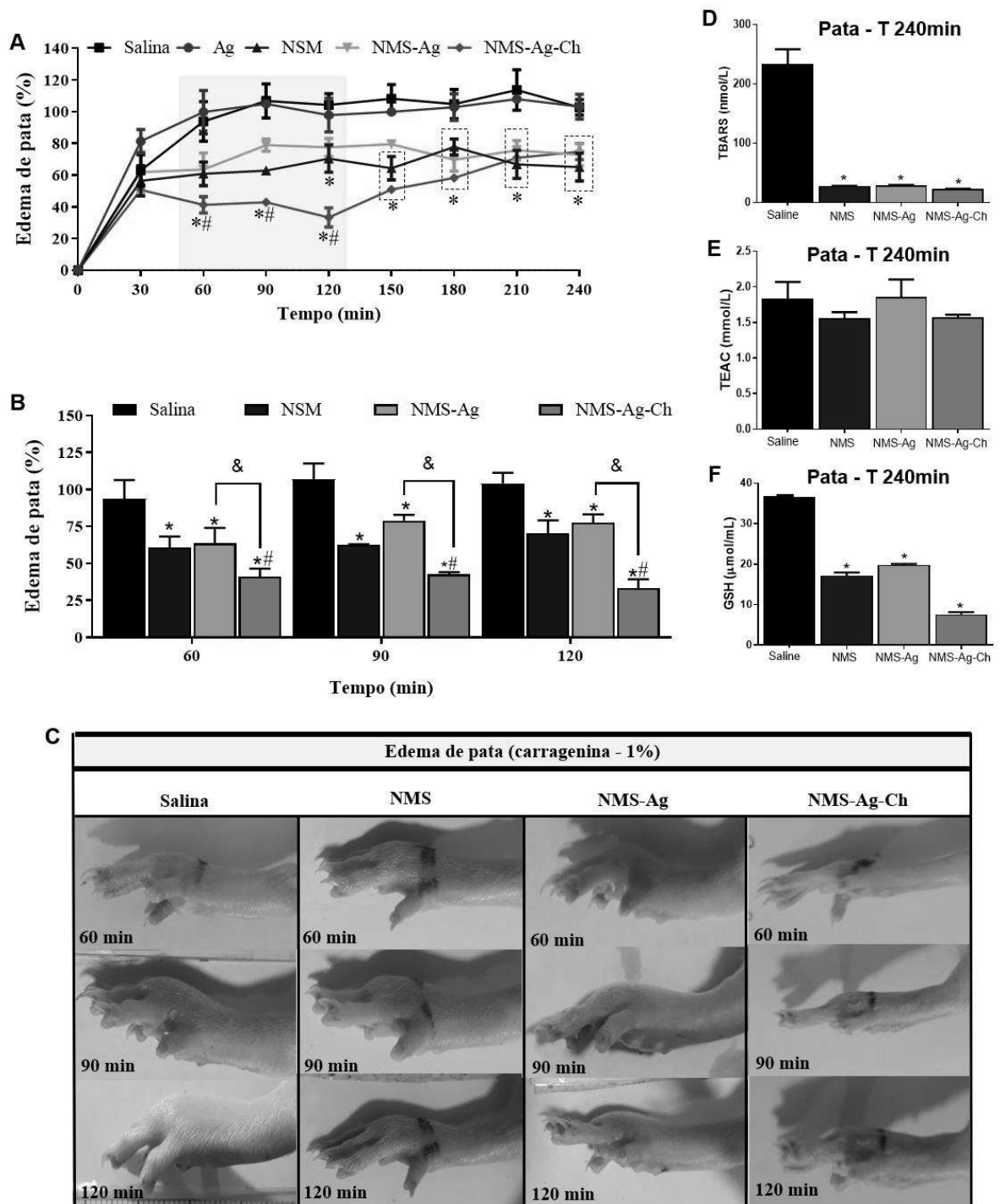


Figura 40 Avaliação da NMS, o complexo NMS-Ag, e associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch em modelo de edema de pata induzido por carragenina e avaliação dos parâmetros do estresse oxidativo. A) Evolução do edema no tempo. B) Avaliação do edema nos tempos de 60, 90 e 120 min. C) Fotografias da evolução do edema nos tempos de 60, 90 e 120 min. D) Avaliação de TBARS aos 240 min na pata do animal. E) Avaliação de TEAC aos 240 min na pata do animal. F) Avaliação de GSH aos 240 min na pata do animal

Fuente: Autor

6. CONCLUSÕES

O complexo NMS-Ag e associação polimérica NMS-Ag-Ch foram sintetizados, caracterizadas e avaliadas, por um amplo conjunto de análises químicas espectroscópicas e biológicas. As análises químicas permitiram concluir que o complexo de coordenação NMS-Ag foi sintetizado com um rendimento de 83,29%W/W, apresentando uma solubilidade total em metanol e DMSO, e parcial em buffer pH 7.4, a quantidade da NMS no complexo foi de 52,20% W/W NMS/NMS-Ag, entanto a sua associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch foi sintetizado com um rendimento 91,20 %W/W, é parcialmente solúvel nos solventes avaliados, este apresenta, uma quantidade de NMS de 8,54%W/W NMS/NMS-Ag-Ch.

Os estudos no UV em estado sólido indicam uma clara transferência eletrônica dentro dos componentes comparados com seus precursores. Uma deslocação no comprimento de onda do complexo mostra uma interação entre os locais de coordenação da prata e alguns grupos funcionais de Nimesulida. Os estudos de espectroscopia no infravermelho permitiram determinar as modificações vibrações presentes entre a NMS e o íon metálico, pelo qual se fornece a evidencia teórica dos modelos estruturais propostos, onde interage de maneira bidentada os átomos de N y O do grupo sulfonamina com o íon metálico. Por outro lado, a associação polimérica com a quitosana mostrou uma possível interação entre os grupos glucosamina e n-acetil glucosamina com as cargas netas do complexo NMS-Ag.

A análise termogravimétrica não demonstrou uma proteção da NMS à degradação térmica, afirmando a presença deste fármaco na superfície do polímero. As micropartículas de complexo e associação polimérica mostraram uma cinética de liberação inicial tipo explosão, pela presença das moléculas de NMS na superfície, no entanto as micropartículas com a associação polimérica a liberação ainda foi maior, possivelmente pela força fraca de ligação entre o polímero e o complexo, em tanto A liberação de NMS do complexo de coordenação está em função da constante de equilíbrio, a qual depende da temperatura, pH e tipo de meio solvente. O complexo (NMS-Ag) apresentou um Modelo cinético de korsmeyer Pepas que está de acordo com a natureza de polímero de coordenação, enquanto a associação polimérica com a quitosana (NMS-Ag-Ch) apresentou uma cinética de Weibull que descreve o fenômeno de liberação da NMS pelo uso de um material polimérico como a quitosana

As avaliações de atividade biológica mostram que as micropartículas avaliadas têm ação antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas (0,016 - 0,063 mg/ml), mas principalmente contra gram-negativas (0,007 - 0,063 mg/ml), estes efeitos são principalmente pela ação da prata liberada do complexo. De outro lado a ação anti-inflamatória pelas micropartículas avaliadas mostram semelhante a NMS, sendo que a associação polimérica com a quitosana NMS-Ag-Ch apresentou maior eficácia na redução edematogênica, principalmente na primeira fase da inflamação (60-120 min) induzida por carragenina, que corresponde com a cinética de liberação que apresentou a maior liberação de NMS na mesma faixa de tempo.

7. REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004a.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery B. v. 100, p. 5–28, 2004b.
- ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1–2, p. 215–220, 2007.
- ARORA, S. et al. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. **Toxicology Letters**, v. 179, n. 2, p. 93–100, 2008.
- AZADI, S.; ASHRAFI, H.; AZADI, A. Mathematical modeling of drug release from swellable polymeric nanoparticles. v. 7, n. 04, p. 125–133, 2017.
- AZUMA, K. et al. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 33–49, 2015.
- BANTI, C. N. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(I) compounds. 2013.
- BARBOSA, H. F. G. et al. A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, n. June, p. 115232, 2019.
- BATLOUNI, M. Artículo de Revisión Antiinflamatorios No Esteroides : Efectos Cardiovasculares , Cerebrovasculares y Renales Artículo de Revisión. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, p. 538–546, 2009.
- BENDTSEN, L. et al. Reference programme : Diagnosis and treatment of headache disorders and facial pain . Danish Headache Society , 2nd Edition , 2012. v. 13, 2012.
- BERSON, A.; CAZANAVE, S.; DESCATOIRE, V. The anti-inflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2-phenoxy methane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human. ... **of Pharmacology and ...**, v. 318, n. 1, p. 444–454, 2006.
- BHATTACHARYA, A. et al. A nimesulide derivative with potential anti-inflammatory activity : Synthesis , X-ray powder structure analysis and DFT study. **Journal of Molecular Structure**, v. 975, n. 1–3, p. 40–46, 2010.

- BINI, M. et al. Hybrid compounds for improving drugs solubility: Synthesis, physico-chemical and pharmaceutical characterization of Nimesulide-LDH. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 272, n. December 2018, p. 131–137, 2019.
- BIRKH, R.; BASEL, V. **Nimesulide – Actions and Uses**. [s.l: s.n.].
- BJARNASON, I.; B, T. Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: the effect of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. **Rheumatology**, v. 38, n. 90001, p. 24–32, 1999.
- BOELSTERLI, U. A. Mechanisms of NSAID-Induced Hepatotoxicity. **Drug Safety**, v. 25, n. 9, p. 633–648, 2006.
- BRAGA, S. S. et al. Encapsulation of sodium nimesulide and precursors in -cyclodextrin. v. 1, p. 873–878, 2003.
- BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K. **The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS**. [s.l: s.n.]. v. 12
- CABRERA, J.; LÓPEZ, A.; SANTIAGO, J. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MATRICES POLIMÉRICAS MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA. v. 11, p. 16–20, 2008.
- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 8, p. 885–897, 2008.
- CARDOSO, P. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. **Rev. Hosp. Niños (B. Aires)**, v. 58, n. 260, p. 19–28, 2016.
- CHALLENGES, F.; BENEFITS, P. **Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs**. [s.l: s.n.].
- COELHO, C.; HENNOUS, M.; LEROUX, F. RSC Advances Functionalisation of polybutylene succinate nanocomposites : from structure to reinforcement of UV-absorbing and mechanical properties { . p. 5430–5438, 2012.
- COURA, C. O. et al. Mechanisms Involved in the Anti- Inflammatory Action of a Polysulfated Fraction from Gracilaria cornea in Rats. p. 1–18, 2015.
- DALGLEISH, T. et al. **APPLIED PHARMACOLOGY**. [s.l: s.n.]. v. 136
- DE PAIVA, R. E. F. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and antibacterial assays of a novel silver(I) complex with the anti-inflammatory nimesulide. **Polyhedron**, v. 36, n. 1, p. 112–119, 2012.
- DE PAIVA, R. E. F. et al. Investigating the inclusion of the Ag(I)-nimesulide complex

- into b-cyclodextrin: Studies in solution and in the solid state. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 79, n. 1–2, p. 225–235, 2014.
- DEMETRIS, D.; COSTAS, G.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Physicochemical profile of nimesulide. Exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 57–62, 2007.
- DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063–73, 1998.
- DUPONT, L. et al. Nimesulide. **Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications**, v. 51, n. 3, p. 507–509, 1995.
- DURÁN, N. et al. NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: TOXICIDADE EM ANIMAIS E HUMANOS. v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.
- EDWARDS, D. A. et al. Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery. **Spring**, v. 1868, n. 1997, p. 1868–1871, 2011.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–7, maio 1959.
- EMERY, P. Cyclooxygenase-2: a major therapeutic advance? **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1, p. S42–S45, 2002.
- FASANO, A.; SEQUEIRA, A. **Hemomath**. [s.l: s.n.]. v. 18
- FELT, O. et al. Chitosan : A Unique Polysaccharide for Drug Delivery Chitosan : A Unique Polysaccharide for Drug Delivery. v. 9045, n. November, 2016.
- FERNÁNDEZ, J. A. et al. Estudio Cinético De Liberación in Vitro En Un Biomaterial. **Rev. Iberoamer Polim**, v. 10, n. 2, p. 119–130, 2009.
- FLORENCE, A. T. Modern Pharmaceutics, Volume 2. **Modern Pharmaceutics, Volume 2**, 2018.
- FLORENTINO, I. F. et al. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 69, p. 35–44, 2017.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.
- GILMAN'S; GOODMAN. **The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS**. [s.l.] Mc Graw Hill Medical, 2008.

- GONSALVES, A. DE A. et al. CONTEXTUALIZANDO REAÇÕES ÁCIDO-BASE DE ACORDO COM A TEORIA PROTÔNICA DE BRÖNSTED- LOWRY USANDO COMPRIMIDOS DE PROPRANOLOL E NIMESULIDA. v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.
- GOUDA, R.; BAISHYA, H.; QING, Z. Journal of Developing Drugs Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. v. 6, n. 2, p. 1–8, 2017.
- HOWIE, P. W. et al. function, coagulation, and fibrinolysis Effect of intravenous prostaglandin E2 on platelet. p. 354–358, 1973.
- HUERTA, C.; ABERTURAS, M. DEL R.; MOLPECERES, J. Nimesulide-loaded nanoparticles for the potential adjuvant treatment of prostate cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1–2, p. 152–160, 2015.
- JAMES R; O'DELL, M. D. Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. p. 2591–2602, 2004.
- JOUZEAU, J.-Y. et al. Cyclo-Oxygenase Isoenzymes Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. v. 53, n. 4, p. 563–564, 1997.
- KALINSKI, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. **NIH Public Access institute national of health**, v. 188, n. 1, p. 93, 2013.
- KAUR, H.; PURI, J. K.; SINGLA, A. Metal ion interactions with drugs: Electrochemical study of complexation of various bivalent metal ions with nimesulide and ibuprofen. **Journal of Molecular Liquids**, v. 182, p. 39–42, 2013.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation , biodistribution and toxicity of chitosan ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.
- KOSMIDIS, K.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. A reappraisal of drug release laws using Monte Carlo simulations: The prevalence of the Weibull function. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 7, p. 988–995, 2003.
- KOVA, P.; MOKRY, M.; KLIMES, J. Photochemical stability of nimesulide. v. 31, p. 827–832, 2003.
- KHONN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a New Aerobic Metabolite Whose Production by Brain Is Inhibited by Apomorphine, Methine, Ergotamine, Epinephrine and Menadione. **J Pharm Exp Therap.**, v. 83, n. 3, p. 292–300, 1944.
- KUMAR-KRISHNAN, S. et al. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **EUROPEAN POLYMER JOURNAL**, 2015.

- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: Current issues | Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498–512, 2002.
- LOPRETTI, M. et al. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. n. 2, p. 19–23, 2007.
- LORAM, L. C. et al. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. v. 8, n. 2, p. 127–136, 2007.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease : v. 15, n. 7, 2011.
- MA, Y. et al. Anti-Inflammatory Effects of 4-Methylcyclopentadecanone on Edema Models in Mice. p. 23980–23992, 2013.
- MARJORIBANKS, J. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea (Review). n. 4, 2009.
- MAYNE, S. T. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 933S-940S, 2003.
- MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407–412, 1993.
- MILLER, R. J.; MALFAIT, A. M.; MILLER, R. E. The innate immune response as a mediator of osteoarthritis pain. **Osteoarthritis and Cartilage**, n. xxxx, 2020.
- MINGATTO, F. E. The Critical Role of Mitochondrial Energetic Impairment in the Toxicity of Nimesulide to Hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 601–607, 2003.
- MIRCIOIU, C. et al. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 140, 2019.
- MORITA, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 68–69, p. 165–175, 2002.
- NÆSDAL, J.; BROWN, K. NSAID-Associated Adverse Effects and Acid Control Aids to Prevent Them A Review of Current Treatment Options. v. 29, n. 2, p. 119–132, 2006.
- NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. [s.l: s.n.].

- NOROIAN, G.; CLIVE, D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors and the kidney: A case for caution. **Drug Safety**, v. 25, n. 3, p. 165–172, 2002.
- NUNES, J. H. B. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, crystallographic studies and antibacterial assays of new copper(II) complexes with sulfathiazole and nimesulide. **Journal of Molecular Structure**, v. 1112, p. 14–20, 2016.
- OOSTINGA, D. et al. An understanding of bone pain: A narrative review. **Bone**, v. 134, n. February, 2020.
- PACHALY, J. R. Terapêutica Por Extrapolação Alométrica. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**, p. 1215–1223, 2006.
- PANGESTUTI, R.; BAK, S. S.; KIM, S. K. Attenuation of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglia by chitooligosaccharides via the MAPK signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 599–606, 2011.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. [s.l.: s.n.].
- PEREIRA, C. S. K. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Herissantia crispa* (L .) Brizicky ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Herissantia crispa* (L .) Brizicky. 2013.
- PERICHERLA, S. et al. Chemical modifications of nimesulide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 384–390, 2007.
- PERPETUO, G. et al. Thermoanalytical study of nimesulide and their recrystallization products obtained from solutions of several alcohols. n. May 2014, 2013.
- PERCÁRIO, S.; VITAL, A.; JABLONKA, F. Dosagem do malondialdeído. **NewsLab.**, v. 2, n. 6, p. 46-50, 1994.
- PETER E. LIPSKY, M. et al. Unresolved Issues in the Role of Cyclooxygenase-2 in Normal Physiologic Processes and Disease. v. 160, p. 913–920, 2015.
- PETRUCCI, R. H. et al. **Química general**. [s.l.: s.n.].
- PIEL, G. P. X. et al. Study of the Influence of Both Cyclodextrins and L -Lysine on the Aqueous Solubility of Nimesulide ; Isolation and Characterization of Nimesulide – L - Lysine – Cyclodextrin Complexes. v. 86, n. 4, p. 475–480, 1997.
- PILBEAM, C. C. et al. Prostaglandins and Bone Metabolism. p. 1235–1271, 2008.
- PINAZO-DURAN, M. D.; BOSCA-GOMAR, L. Anti-inflammatory properties of polyunsaturated fatty acid omega 3. Indications in ophthalmology. **Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia**, v. 87, n. 7, p. 203–205, 2012.

POBUDKOWSKA, A. et al. Formulation of nimesulide-loaded polylactide/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and the evaluation of release kinetics.

Polimery/Polymers, v. 63, n. 9, p. 586–593, 2018.

POYSER, N. O. R. M. A. N. L. The Physiology of Prostaglandins. v. 2, n. 3, 1973.

PUGLIA, C. et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 295–304, 2008.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAMTEKE, K. H. et al. Review Article Mathematical Models of Drug Dissolution : A Review. v. 3, n. 5, p. 388–396, 2014.

RANNOU, F.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J. Efficacy and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 4, p. S18–S21, 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REGAL, M. L. L. et al. Inflammatory Acute Response. Biochemical and Cellular Considerations. **New Cell Adhesion Research**, p. 39–52, 2016.

REZVANI, Z.; MALIHE, S. Bionanocomposites Based on Alginate and Chitosan/ Layered Double Hydroxide With Ciprofloxacin Drug: Investigation of Structure and Controlled Release Properties. **Periodicum Biologorum**, v. 116, n. 1, p. 37–43, 2014.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2014a.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2014b.

ROBERTO, P. pKa determination of nimesulide in methanol by potentiometric titrations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 109–112, 1997.

RUFER, C. et al. MODE OF ACTION OF ANTI-INFLAMMATORY METHANE SULFONANILIDES. v. 31, n. 43, p. 3591–3596, 1984.

SÁEZ, V.; HERNÁEZ, E.; ANGULO, L. Mecanismos de liberación de fármacos desde

- materiales polímeros. **Revista Iberoamericana Polímeros**, v. 5, n. 1, p. 55–70, 2004.
- SINGH, A.; KUMAR, B. Pharmacological Evaluation of Anti-Inflammatory and Anti-Ulcer Potential of Heartwood of Santalum Album in Rats. n. April, 2014.
- SINGH, B. K. et al. Nimesulide aggravates redox imbalance and calcium dependent mitochondrial permeability transition leading to dysfunction in vitro. **Toxicology**, v. 275, n. 1–3, p. 1–9, 2010.
- SINGLA, A K.; CHAWLA, M.; SINGH, A. Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects - an update. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 52, p. 467–486, 2000.
- SKAUGRUD, Ø.; HAGEN, A. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews Biomedical and Pharmaceutical Applications of Alginate and Chitosan. n. June 2014, p. 37–41, 1999.
- STATHOPOULOU, M. E. K. et al. Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 181, n. January, p. 41–55, 2018.
- SULEYMAN, H. et al. Nimesulide is a Selective COX-2 Inhibitory, Atypical Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 278–283, 2008.
- TAKAHASHI, T.; HAGIWARA, A.; OGIWARA, K. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 236–247, 2018.
- THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. v. 52, p. 117–126, 2001.
- TILO, G.; SUSANNE, F.; GARRET, A. F. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 4–15, 2006.
- TRAN, V. T.; BENOÎT, J. P.; VENIER-JULIENNE, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1–2, p. 1–11, 2011.
- TSAFRIRI, A. et al. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. **Prostaglandins**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 1972.
- USMAN, M. S. et al. Copper Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods. p. 14928–14936, 2012.

- VAN BOEKEL, M. A. J. S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 139–159, 2002.
- VILLALBA, E. Inflamación I. **Revista de Actualización Clínica**, v. 43, n. 1, p. 2261–2265, 2014.
- WALODDI WEIBULL, STOCKHOLM, S. A Statistical Distribution Function of Wide Applicability. **Journal Of Applied Mechanics**, p. 293–297, 1951.
- WEDMORE, I. et al. A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic Dressing : Experience in Current Combat Operations. v. 60, n. 3, p. 10–13, 2006.
- WHITEHOUSE, M. W. **Silver Pharmacology : Past , Present and Questions for the Future**. [s.l: s.n.].
- WOLFE, L. S.; COCEANI, F. The Role of Prostaglandins in the Central Nervous System. **Annual Review of Physiology**, v. 41, n. 1, p. 669–684, 1979.
- WU, D. et al. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 285–290, 2014.
- XIONG, H. et al. Chitosan inhibits inflammation and adipogenesis of orbital fibroblasts in Graves ophthalmopathy. v. 2, n. July, p. 509–517, 2018.
- XU, Q. et al. Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1575–1581, 2009.
- ZHONG, B. et al. From COX-2 inhibitor nimesulide to potent anti-cancer agent: Synthesis, in vitro, in vivo and pharmacokinetic evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 432–444, 2012.
- ZIDAR, N. et al. Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 9 B, p. 3753–3763, 2009.