

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Mariana Leite Simões e Silva

Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo metilprednisolona: influência
do contra-íon e de diferentes formas químicas do fármaco

Juiz de Fora
2025

Mariana Leite Simões e Silva

Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo metilprednisolona: influência do contra-íon e de diferentes formas químicas do fármaco

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Juiz de Fora
2025

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

Silva, Mariana Leite Simões e.

Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo metilprednisolona : influência do contra-íon e de diferentes formas químicas do fármaco / Mariana Leite Simões e Silva. -- 2025.

71 f. : il.

Orientador: Guilherme Diniz Tavares

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2025.

1. COVID-19. 2. SRAG. 3. metilprednisolona. 4. nanopartículas. 5. quitosana. I. Tavares, Guilherme Diniz, orient. II. Título.

Mariana Leite Simões e Silva

Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo metilprednisolona: influência do contra-íon e de diferentes formas químicas do fármaco

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Aprovado em 21 de agosto de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares
Universidade Federal de Juiz de Fora

MSc. Mirsiane Pascoal Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora

MSc. Dominique Mesquita e Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, Carmem e José Eduardo, e ao meu irmão, Eduardo. O apoio e o amor dados por vocês, diariamente, foram essenciais para mim. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carmem e José Eduardo, agradeço pela educação dada, pelo esforço em me dar as melhores condições de vida e estudo, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, pelas risadas diárias que sempre deixaram tudo mais leve, pelo amor e pelo carinho dados diariamente. Ao meu irmão, Eduardo, muito obrigada pelo apoio dado, de várias formas, desde o início da graduação, por ser fonte de inspiração para a minha jornada, por me dar forças para sempre seguir em frente, pelo amor e pelo carinho dados de perto ou de longe. Ao Bob, agradeço pelo amor imensurável dado todos os dias e por ser minha companhia inseparável nas horas de estudo, nos momentos difíceis e nas comemorações! Pai, mãe e Eduardo, vocês são minhas maiores inspirações da vida pessoal e profissional, sem a presença e o apoio de vocês, a caminhada não seria tão alegre, amável e engrandecedora. Muito obrigada por tudo, eu amo vocês infinitamente!

À UFJF, agradeço por todo o subsídio fornecido que me possibilitou uma formação de qualidade, pelas oportunidades oferecidas desde o início do curso e pelo espaço físico agradável que contribuiu com meu bem-estar durante os estudos. Aos professores, agradeço pelos conhecimentos compartilhados e por todos os ensinamentos que servirão para além da vida acadêmica.

Ao professor Rodrigo e a todos os amigos do QUIMTEC, especialmente, Álvaro, Caroline, Natália Alves e Natalia Casas, agradeço pela oportunidade de entrar no mundo científico de maneira prazerosa e agradável. À professora Magda, meu muito obrigada pelos aprendizados passados durante a monitoria, pelas palavras de incentivo, pelo carinho e por toda a atenção dada. Ao professor Guilherme e aos amigos do LDNano, em especial, Laís e Mirsiane, agradeço pela grande oportunidade dada no fim da graduação, pelo suporte durante a execução dos experimentos e por todas as risadas que deixavam a rotina mais leve!

Ao meu companheiro, Yuri, agradeço pelo carinho e apoio fornecidos durante o desenvolvimento deste trabalho e por ter me dado muita força para enfrentar os desafios que surgiram!

Aos meus melhores amigos, Ana Beatriz, Eduarda e Lucas, muito obrigada pelo companheirismo durante toda a graduação. Sem vocês, a caminhada não seria tão animada, feliz, contagiante e enriquecedora. Vou levar todos vocês no coração para sempre e nunca me esquecerei de todos os momentos especiais que tivemos dentro e fora da universidade!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas poliméricas à base de quitosana (NQ) contendo metilprednisolona, com foco em sua aplicação no tratamento da Síndrome Respiratória Aguda Grave associada à COVID-19. Três formulações distintas foram obtidas por gelificação iônica, variando-se a forma do fármaco utilizada — base (MPD, hidrofóbica) ou salina (MPS, hidrossolúvel) — bem como a presença do reticulante tripolifosfato de sódio (TPP): NQ-TPP-MPD, NQ-TPP-MPS e NQ-MPS (sem o uso do reticulante tradicional). Inicialmente, foi otimizada uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos fármacos, estabelecendo-se como condições ideais: coluna C18, eluição isocrática com fase móvel composta por tampão acetato de amônio 0,1 M (pH 5,7) e acetonitrila (75:25), fluxo de 1,5 mL/min, temperatura da coluna a 50 °C, detecção em 244 nm e volumes de injeção específicos para cada fármaco (40 µL para MPD e 10 µL para MPS). As formulações contendo MPS apresentaram eficiência de encapsulação (EE) superiores (~38%) em comparação à formulação com MPD (~23%), possivelmente em razão de sua maior solubilidade e de interações eletrostáticas com os grupamentos amino da quitosana. Entretanto, a elevada hidrossolubilidade do MPS pode ter favorecido sua difusão para a fase aquosa externa, resultando em uma EE inferior à desejável ($\geq 50\%$). Ainda, no caso das formulações contendo esse sal, o TPP não apresentou influência na EE. No entanto, a presença desse contra-íon promoveu significativa redução do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, que atingiram valores próximos a 106 nm (NQ-TPP-MPS), frente a ~480 nm para as NQ-MPS, além de contribuir para menor polidispersividade. Os valores de potencial Zeta observados para todas as formulações, entre +19 mV e +21 mV, sugerem estabilidade coloidal satisfatória, embora estudos adicionais sejam necessários para avaliação da estabilidade físico-química em longo prazo. Embora a EE não tenha alcançado valores ideais para sistemas nanoestruturados, os resultados obtidos, especialmente com a formulação contendo MPS e TPP, demonstram o potencial da estratégia proposta para futuras aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: COVID-19; SRAG; metilprednisolona; nanopartículas; quitosana; TPP.

ABSTRACT

This study aimed to develop and characterize chitosan-based polymeric nanoparticles (NQ) containing methylprednisolone, focusing on their application in the treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome associated with COVID-19. Three distinct formulations were obtained by ionic gelation, varying the form of the drug used — base (MPD, hydrophobic) or saline (MPS, water-soluble) — as well as the presence of the crosslinking agent sodium tripolyphosphate (TPP): NQ-TPP-MPD, NQ-TPP-MPS, and NQ-MPS (without the use of the traditional crosslinker). Initially, an analytical methodology was optimized by high-performance liquid chromatography for drug quantification, establishing the following ideal conditions: C18 column, isocratic elution with mobile phase composed of 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 5.7) and acetonitrile (75:25), flow rate of 1.5 mL/min, column temperature at 50 °C, detection at 244 nm, and specific injection volumes for each drug (40 μ L for MPD and 10 μ L for MPS). The formulations containing MPS showed higher encapsulation efficiency (EE) (~38%) compared to the formulation with MPD (~23%), possibly due to its higher solubility and electrostatic interactions with the amino groups of chitosan. However, the high-water solubility of MPS may have favored its diffusion into the external aqueous phase, resulting in an EE lower than desirable ($\geq 50\%$). Furthermore, in the case of formulations containing this salt, TPP had no influence on EE. However, the presence of this counterion promoted a significant reduction in the mean hydrodynamic diameter of the particles, which reached values close to 106 nm (NQ-TPP-MPS), compared to ~480 nm for NQ-MPS, in addition to contributing to lower polydispersity. The Zeta potential values observed for all formulations, between +19 mV and +21 mV, suggest satisfactory colloidal stability, although further studies are needed to evaluate long-term physicochemical stability. Although EE did not reach ideal values for nanostructured systems, the results obtained, especially with the formulation containing MPS and TPP, demonstrate the potential of the proposed strategy for future therapeutic applications.

Keywords: COVID-19; SARS; methylprednisolone; nanoparticles; chitosan; TPP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Síntese da MPD a partir da hidrocortisona. A partir da hidrocortisona (1), é feita a proteção das cetonas dos anéis A e D, por meio de 1,2-etanodiol (a). Essa reação tem o efeito secundário de deslocar a ligação dupla de C4–C5 para C5–C6, formando o composto dietilenocetal (2). Através de PhCO ₃ H (b), é realizada a metilação do anel B, originando o composto 3. Seguidamente, ocorre a abertura do anel epóxi pelo reagente de Grignard (c), o que gera a adição do grupo metil ao anel B. Sob condições ácidas, há a remoção do acetal e formação do composto 4. Finalmente, a MPD (5) é obtida após desidratação em meio alcalino (d) e catálise enzimática (e) para que haja a formação de ligações duplas no anel A.....	18
Figura 2	– Estruturas do MPS (1) e do MPAc (2)	20
Figura 3	– Representação esquemática de nanocarreadores orgânicos comumente utilizados para a administração de fármacos: lipossomo, nanopartícula lipídica sólida, nanopartícula polimérica, micelas e dendrímeros.....	22
Figura 4	– Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas.....	23
Figura 5	– Reação alcalina para formação de QT a partir da desacetilação da quitina.....	25
Figura 6	– Representação esquemática da interação entre a QT e o TPP no método de gelificação iônica.....	29
Figura 7	– Representação esquemática da produção das nanopartículas brancas (NQ-TPP).....	33
Figura 8	– Representação esquemática da produção das nanopartículas de QT-TPP com MPD (NQ-TPP-MPD).....	35
Figura 9	– Representação esquemática da produção das nanopartículas de QT-TPP com MPS (NQ-TPP-MPS).....	36
Figura 10	– Representação esquemática da produção das nanopartículas de QT com MPS (NQ-MPS).....	37
Figura 11	– Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (300 µg/mL) com diferentes proporções de fase móvel (ACN e H ₂ O). (A) fase móvel composta por 60:40 de ACN:H ₂ O; (B) fase móvel composta por 50:50 de ACN:H ₂ O; (C) fase móvel composta por 65:35 de ACN:H ₂ O; (D) fase móvel composta por 70:30 de ACN:H ₂ O. Análises realizadas com coluna C18.....	41

Figura 12	– Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (300 µg/mL) com diferentes proporções de fase móvel (ACN e H ₂ O) e diferentes temperaturas do forno de aquecimento da coluna (T °C). (A) fase móvel composta por 60:40 de ACN:H ₂ O sem emprego de temperatura; (B) fase móvel composta por 60:40 de ACN:H ₂ O e T 40°C; (C) fase móvel composta por 60:40 de ACN:H ₂ O e T 45°C; (D) fase móvel composta por 50:50 de ACN:H ₂ O e T 30°C; (E) fase móvel composta por 50:50 de ACN:H ₂ O e T 50°C. Análises realizadas com coluna de fenil.....	42
Figura 13	– Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (300 µg/mL) com diferentes proporções de fase móvel (tampão acetato de amônio pH 5,7 a 0,1M e ACN). (A) fase móvel composta por 60:40 de tampão:ACN; (B) fase móvel composta por 70:30 de tampão:ACN; (C) fase móvel composta por 75:25 de tampão:ACN. Análises realizadas com coluna C18.....	43
Figura 14	– Cromatograma referente ao padrão de MPD com volume de injeção igual a 20 µL, fase móvel tampão acetato de amônio:ACN (75:25), fluxo da fase móvel de 1,5 mL/min e temperatura do forno de aquecimento da coluna igual a 50 °C. Análise realizada com coluna C18.....	45
Figura 15	– Cromatogramas referentes aos padrões de MPD e MPS (300 µg/mL) analisados nas condições finais determinadas, sendo (A) MPD e (B) MPS...	46
Figura 16	– Curva analítica utilizada para calcular a EE das nanopartículas de QT com MPD (concentrações de 21,875 µg/mL; 43,750 µg/mL; 87,500 µg/mL; 175 µg/mL; 350 µg/mL).....	51
Figura 17	– Curva analítica utilizada para calcular a EE das nanopartículas de QT com MPS (concentrações de 31,250 µg/mL; 62,500 µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL).....	51
Figura 18	– Cromatogramas referentes ao padrão de MPD (A) no ponto central da curva analítica (87,5 µg/mL) e (B) sobrenadante das NP-QT-MPD.....	52
Figura 19	– Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (A) no ponto central da curva analítica (125 µg/mL); (B) sobrenadante das NP-QT-MPS e (C) sobrenadante das NP-MPS.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Resultados* das análises de DHm, PDI e PZ para as nanopartículas de QT brancas e para as nanopartículas de QT contendo MPS e MPD.....	47
Tabela 2	– Resultados* das análises de EE para as nanopartículas de QT contendo MPS e MPD.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
AFM	Microscopia de Força Atômica
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroides
AMP	Aminometilpropanol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COVID-19	Doença causada pelo SARS-CoV-2
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DEX	Dexametasona
DHm	Diâmetro Hidrodinâmico Médio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EE	Eficiência de Encapsulação
FDA	Food and Drug Administration
GCs	Glicocorticoides
GD	Grau de Desacetilação
GA	Grau de Acetilação
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IFN	Interferon
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
JAK	Janus Quinase
MPAc	Acetato de Metilprednisolona
MPD	Metilprednisolona
MPS	Succinato Sódico de Metilprednisolona
NQ-MPS	Nanopartículas de Quitosana com MPS (sem TPP)
NQ-TPP	Nanopartículas de Quitosana com TPP (sem fármaco)
NQ-TPP-MPD	Nanopartículas de Quitosana com TPP e MPD
NQ-TPP-MPS	Nanopartículas de Quitosana com TPP e MPS
NPs	Nanopartículas

PCL	Policaprolactona
PdI	Índice de Polidispersividade
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Ácido Polilático
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PM	Peso Molecular
PZ	Potencial Zeta
QT	Quitosana
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2</i>
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
STM	Microscopia de Tunelamento com Varredura
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPP	Tripolifosfato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 COVID-19	15
2.2 UTILIZAÇÃO DE GLICOCORTICOIDES NO TRATAMENTO DA COVID-19.....	16
2.3 METILPREDNISOLONA	17
2.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA A ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS	21
2.5 QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA	24
2.5.1 Quitosana.....	24
2.5.2 Nanopartículas de quitosana	26
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAIS	32
4.2 MÉTODOS.....	32
4.2.1 Adequação e otimização de metodologia analítica para a quantificação dos fármacos	32
4.2.2 Desenvolvimento das nanopartículas.....	33
4.2.2.1 Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) (Nanopartículas brancas; NQ-TPP).....	33
4.2.2.2 Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) carregadas com MPD (NQ-TPP-MPD)	34
4.2.2.3 Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) carregadas com MPS (NQ-TPP-MPS)	35
4.2.2.4 Nanopartículas de quitosana carregadas com MPS (NQ-MPS).....	37
4.2.3 Caracterização das nanopartículas	38
4.2.3.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHm), Índice de Polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ)	38
4.2.3.2 Eficiência de Encapsulação (EE)	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 ADEQUAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS	40

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	46
5.2.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHm), Índice de Polidispersividade (PdI) e Potencial Zeta (PZ).....	47
5.2.2 Eficiência de Encapsulação (EE).....	50
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19, causada pelo vírus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2* (SARS-CoV-2), desencadeou uma pandemia global em março de 2020. Embora a patogênese dessa doença ainda não seja completamente compreendida, sabe-se que suas manifestações clínicas são bastante variadas, abrangendo desde casos assintomáticos até quadros graves com comprometimento respiratório, inflamação sistêmica e falência de múltiplos órgãos (Chaudhary; Kujur; Singh, 2023). Nesse contexto, a severidade da COVID-19 está frequentemente associada à chamada “tempestade de citocinas” (*Cytokine Storm*), um fenômeno que pode desencadear a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e está intimamente relacionada ao aumento da mortalidade. A “tempestade de citocinas” envolve a geração de uma resposta de estresse excessivo por células imunes, as quais liberam citocinas pró-inflamatórias que agravam, ainda mais, a inflamação tecidual e a falência de órgãos (Zoulikha et al., 2022).

Com o objetivo de atenuar a hiperinflamação causada pela COVID-19, os glicocorticoides têm sido amplamente empregados na prática clínica por possuírem efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Dentre esses, a metilprednisolona (MPD) vem sendo bastante empregada (Hong et al., 2023). O mecanismo de ação da MPD envolve a inibição da formação do ácido araquidônico, o que reduz processos de cicatrização, inflamação, resposta imune e vasodilatação. Em geral, as ações anti-inflamatórias dos corticoides se relacionam com as proteínas inibidoras fosfolipase A2 e lipocortinas, as quais são responsáveis por controlar a biossíntese de mediadores da inflamação, como as prostaglandinas e os leucotrienos (Dastenae et al., 2022).

Apesar de possuírem efeitos terapêuticos desejáveis em variadas condições clínicas, a administração frequente e crônica de altas doses de glicocorticoides pode levar à dependência hormonal e efeitos colaterais graves (Dastenae et al., 2022; El-Saber Batiha et al., 2022). Em vista disso, a encapsulação dos glicocorticoides em sistemas nanoestruturados pode promover uma administração direcionada do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), além de contribuir para a redução da toxicidade, para o aumento da estabilidade do agente encapsulado, bem como para o controle de sua liberação (Kole et al., 2023). Nesse contexto, a quitosana (QT), que consiste em um aminopolissacarídeo de ocorrência natural, tem sido extensamente utilizada para produzir nanopartículas poliméricas devido às suas propriedades, que incluem biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, mucoadesividade e atividades biológicas relevantes, tal como ação anti-inflamatória (Alghareeb et al., 2025).

O método mais comumente empregado para o preparo de nanopartículas de quitosana é a gelificação iônica, que utiliza contra-íons de carga oposta à da quitosana para promover o entrecruzamento das cadeias poliméricas. O sucesso desse processo de crosslinking depende diretamente do tipo de contra-íon utilizado, influenciando propriedades fundamentais das nanopartículas, especialmente o diâmetro (Lawall Werneck Cerqueira et al., 2020; Zacaron et al., 2023). Nesse contexto, alguns fármacos, ao se ionizarem negativamente em meio aquoso, podem atuar como contra-íons, o que potencializa sua interação com a quitosana e pode resultar em um aumento da eficiência de encapsulação (Cho et al., 2024).

Pelo exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas constituídas por QT para a encapsulação da MPD, visando aplicação no tratamento da SRAG decorrente da COVID-19. Para tanto, avaliou-se o efeito do tipo de contra-íon e de diferentes formas do fármaco com o intuito de obter nanopartículas com características físico-químicas satisfatórias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COVID-19

Os coronavírus, pertencentes à família Coronaviridae, causam infecções respiratórias em mamíferos (como, por exemplo, morcegos e camelos) e em espécies aviárias, sendo que os sintomas e o tropismo tecidual da infecção variam de acordo com a espécie hospedeira (Sharma; Ahmad Farouk; Lal, 2021). Em seres humanos, as infecções causadas por coronavírus podem ser assintomáticas ou acompanhadas de febre, tosse, falta de ar e irritação gastrointestinal. Em casos mais graves, a infecção pode causar pneumonia grave e óbito (Chen et al., 2020).

Nos últimos 20 anos, os coronavírus provocaram grandes pandemias por três vezes: a epidemia de Síndrome Respiratória Aguda Grave (entre 2002 e 2003), a epidemia da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (2012) e a epidemia da COVID-19 (Yuan et al., 2023). A COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, foi relatada pela primeira vez em Wuhan, na China, em dezembro de 2019 (Umakanthan et al., 2020). Rapidamente, o vírus se disseminou e infectou milhões de pessoas, o que fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarasse, em 30 de janeiro de 2020, uma emergência global. Posteriormente, em março de 2020, a OMS declarou a COVID-19 como uma pandemia global (Majumder; Minko, 2021).

Os efeitos da COVID-19 nos humanos variam desde infecções assintomáticas e sintomas leves até pneumonia grave, síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e falência fatal de múltiplos órgãos (Bruscoli et al., 2022). A SRAG é uma síndrome inflamatória aguda dos alvéolos e capilares, caracterizada por lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar com subsequente exsudação inflamatória dos capilares alveolares. Para ocorrer o desenvolvimento da SRAG, danos à barreira endotelial-epitelial são essenciais, pois é o aumento da permeabilidade capilar que promove a formação dos edemas intra-alveolar e intersticial (Zhao et al., 2024).

Estudos demonstraram que, no organismo humano, a interação entre a glicoproteína *spike* viral e os receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) gera uma resposta inflamatória em muitos tecidos e órgãos que, subsequentemente, estimula a imunidade humoral e a imunidade celular do corpo (Li et al., 2020b; Yang; Du, 2021). Com isso, pode haver a liberação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por células efectoras imunológicas, o que culmina em uma inflamação sistêmica descontrolada que pode induzir a SRAG, falência múltipla de órgãos e morte em casos mais graves (Xu et al., 2020). Portanto, além da terapia antiviral ativa, a inibição da resposta hiperinflamatória e a prevenção de danos teciduais também são o foco do tratamento da COVID-19 (Mehta et al., 2020).

2.2 UTILIZAÇÃO DE GLICOCORTICOIDES NO TRATAMENTO DA COVID-19

Inicialmente, os fármacos utilizados no tratamento da COVID-19 incluíram, dentre outros, antibióticos, heparina para controlar eventos tromboembólicos, agentes antivirais anteriormente utilizados para outras doenças infecciosas, antivirais novos (como, por exemplo, o remdesivir, molnupiravir e a combinação de nirmatrelvir e ritonavir), anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), interferon (IFN)- α , - β e - λ , inibidores de citocinas ou de seus receptores, inibidores de Janus quinase (JAK) e glicocorticoides (GCs) (Zeng; Liao; Yu, 2024; Zhao et al., 2025). Os glicocorticoides, que são foco de estudo neste trabalho, são fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores amplamente utilizados em doenças inflamatórias autoimunes e imunomediadas. A maior parte de seus efeitos terapêuticos se deve à sua interação com diferentes receptores que, por sua vez, gera alterações de mecanismos moleculares complexos, envolvendo, principalmente, a expressão gênica e a regulação da sinalização intracelular (Hiti et al., 2025). Esses efeitos resultam, finalmente, na modulação da ativação e da ação das células imunes e na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Zhao et al., 2024).

Anteriormente à pandemia de COVID-19, os glicocorticoides eram comumente utilizados em doenças respiratórias como, por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), pneumonia bacteriana grave e SRAG. Apesar disso, no início da pandemia, a OMS desaconselhou o uso sistemático de corticosteroides em pacientes com COVID-19 (Rajan et al., 2025). Mais tarde, após a publicação do ensaio RECOVERY, a OMS alterou sua indicação inicial e recomendou o uso de corticosteroides em pacientes com COVID-19 grave. No estudo RECOVERY (The RECOVERY Collaborative Group, 2021), foi demonstrado que o uso de dexametasona (DEX), um fármaco pertencente à classe dos glicocorticoides, diminuiu significativamente a mortalidade de pacientes hospitalizados com COVID-19 grave, especialmente em pacientes que receberam ventilação mecânica, em comparação com o tratamento padrão sem corticosteroides. Além disso, evidências relacionadas ao uso de glicocorticoides no tratamento da COVID-19 provenientes de ensaios clínicos randomizados, revisões sistemáticas e meta-análises indicam sua eficácia em pacientes que necessitam de suporte de oxigênio (Li et al., 2020a; Zhou et al., 2020).

Além da DEX, a metilprednisolona (MPD), que também consiste em um esteroide anti-inflamatório pertencente à classe dos glicocorticoides, foi avaliada no tratamento de pacientes com COVID-19. O METCOVID, um estudo que incluiu 393 participantes hospitalizados com COVID-19, concluiu que a administração de MPD, durante 5 dias, não foi suficiente para

melhorar o prognóstico dos pacientes. No entanto, observou-se uma redução da mortalidade no subgrupo de pacientes hospitalizados com mais de 60 anos, os quais apresentavam um estado inflamatório sistêmico mais acentuado. Além disso, a função respiratória de 160 participantes foi avaliada após 120 dias, o que indicou um efeito positivo, a longo prazo, no grupo tratado com MPD, em comparação ao grupo tratado com placebo (Abbasian et al., 2022; Corral-Gudino et al., 2021; Jeronimo et al., 2021).

Em um estudo realizado com 89 pacientes hospitalizados com COVID-19, avaliou-se a administração de MPD e DEX em dois grupos de pacientes, os quais foram alocados aleatoriamente. Como resultados, não foram observadas diferenças significativas entre ambos os grupos, porém, os pacientes que receberam MPD (2 mg/kg/dia) apresentaram um estado clínico significativamente melhor em comparação aos pacientes que receberam DEX (6 mg/dia) no dia 5 e no dia 10. Além disso, a necessidade de ventilação mecânica foi significativamente menor no grupo tratado com MPD, o que sugere que a MPD se mostra mais eficaz do que a DEX em pacientes com hipóxia decorrente da COVID-19 (Ranjbar et al., 2021).

Já em outro estudo, 68 pacientes graves, hospitalizados com COVID-19, foram submetidos à randomização e um subgrupo recebeu apenas tratamento padrão, enquanto o outro recebeu tratamento padrão com pulso de MPD (injeção intravenosa de 250 mg/dia, durante 3 dias). A porcentagem de pacientes com melhor prognóstico foi maior no grupo que recebeu MPD em comparação ao grupo que recebeu apenas tratamento padrão (94,1% *versus* 57,1%), além da taxa de mortalidade ter sido significativamente menor no grupo que recebeu MPD. Com isso, concluiu-se que o pulso de MPD em pacientes graves, hospitalizados com COVID-19, pode ser uma alternativa terapêutica eficaz (Edalatifard et al., 2020).

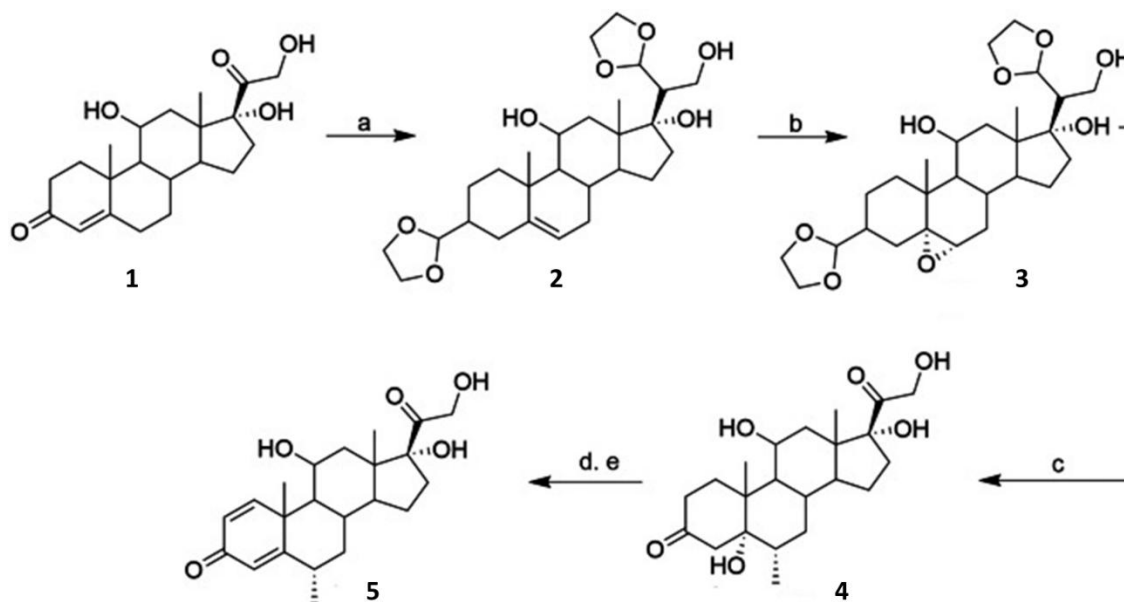
Além das pesquisas supracitadas, um estudo buscou comparar as diferenças nos resultados clínicos e laboratoriais de pacientes hospitalizados com pneumonia grave decorrente da COVID-19. Nesse estudo, os pacientes foram tratados com 6 mg de DEX ou com doses altas de MPD (250 a 500 mg). Como resultados, os pesquisadores constaram que a administração de altas doses de MPD por 3 dias, seguido de 50 mg de prednisona oral por 14 dias, reduziu o tempo de recuperação dos pacientes, a necessidade de transferência para a terapia intensiva e os marcadores de gravidade relacionados à proteína C reativa (PCR) (Pinzón et al., 2021).

2.3 METILPREDNISOLONA

A MPD (6 S, 8 S, 9 S, 10 R, 11 S, 13 S, 14 S, 17 R)-11,17-di-hidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-6,10,13-trimetil-7,8,9,11,12,14,15,16-octa-hidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-

ona) (Figura 1) é um esteroide anti-inflamatório sintético de ação intermediária, da classe dos glicocorticoides, comumente utilizado no tratamento de doenças inflamatórias como, por exemplo, asma, dermatite, lúpus, artrite reumatoide, colite e doença de Chron (Feuerstein et al., 2025; Levy; Reilly, 2024). Em 1959, o Instituto Merck publicou a primeira síntese da MPD, que consistiu em uma derivatização da prednisolona e teve a hidrocortisona como material de partida. Como um anti-inflamatório, a MPD é cinco vezes mais potente que a hidrocortisona (cortisol), enquanto demonstra atividade mineralocorticoide mínima (Fried; Arth; Sarett, 1959; Vaz et al., 2023).

Figura 1 – Síntese da MPD a partir da hidrocortisona. A partir da hidrocortisona (1), é feita a proteção das cetonas dos anéis A e D, por meio de 1,2-etanodiol (a). Essa reação tem o efeito secundário de deslocar a ligação dupla de C4–C5 para C5–C6, formando o composto dietilenocetal (2). Através de PhCO_3H (b), é realizada a metilação do anel B, originando o composto 3. Seguidamente, ocorre a abertura do anel epóxi pelo reagente de Grignard (c), o que gera a adição do grupo metil ao anel B. Sob condições ácidas, há a remoção do acetal e formação do composto 4. Finalmente, a MPD (5) é obtida após desidratação em meio alcalino (d) e catálise enzimática (e) para que haja a formação de ligações duplas no anel A



Fonte: Adaptado de Vaz et al. (2023).

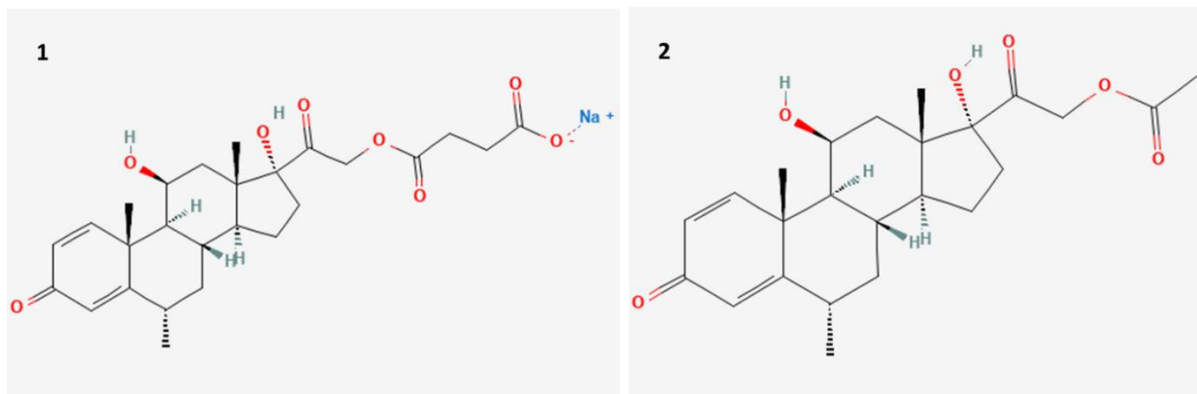
No organismo humano, a MPD se difunde passivamente através da membrana celular e se liga ao receptor glicocorticoide intracelular. Esse complexo se transloca para o núcleo, onde interage com sequências específicas de DNA e resulta no aumento ou na supressão da

transcrição de genes específicos (Yuan et al., 2024). Comumente, a MPD desencadeia a produção de proteínas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), além de bloquear a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e moléculas de adesão celular (Lv et al., 2022). Além disso, assim como os demais corticosteroides, a MPD suprime a síntese da ciclo-oxigenase (COX-2), responsável pela produção de prostaglandinas em tecidos danificados, o que leva à cascata de inflamação (Schurr et al., 2001).

Juntamente aos efeitos mencionados anteriormente, a MPD modula o número e a funcionalidade das células do sistema imunológico (Yuan et al., 2024). Nesse âmbito, já se constatou que altas doses de MPD e outros glicocorticoides diminuem acentuadamente o número e a atividade de células dendríticas e plasmáticas, as quais atuam na identificação de patógenos e na apresentação de estruturas de antígenos para células do sistema imunológico específico (Längericht; Krämer; Kahaly, 2020).

No panorama mundial, a MPD está disponível em formulações de comprimidos de 2 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg e 32 mg, formulações de suspensões injetáveis em concentrações de 20 mg/mL, 40 mg/mL e 80 mg/mL, e como pó para injeção em doses de 40 mg, 125 mg, 500 mg, 1000 mg e 2000 mg. No Brasil, há registros vigentes na ANVISA de medicamentos que contêm a MPD nas formas de succinato sódico (administração intravenosa ou intramuscular) e acetato (administração intramuscular). O succinato sódico e o acetato de MPD (Figura 2) se convertem em prednisolona ativa no organismo humano, o que ativa os mecanismos supracitados e resulta em uma redução geral da inflamação crônica e das reações autoimunes (Rang et al., 2016). Em relação às características físico-químicas, o succinato sódico de MPD (MPS) consiste em um sólido branco, com peso molecular de 496,5 g/mol e alta solubilidade em água. O acetato de MPD (MPAc), por sua vez, trata-se de um sólido branco, com peso molecular de 416,5 g/mol e praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em acetona e em etanol (Papich, 2016).

Figura 2 – Estruturas do MPS (1) e do MPAC (2)



Fonte: PubChem, CID 23680530; PubChem, CID 5877.

Apesar de possuírem efeitos terapêuticos desejáveis em variadas condições clínicas, a administração frequente e crônica (> 2 semanas) de altas doses de glicocorticoides pode levar à dependência hormonal e efeitos colaterais significativos (Minnetti et al., 2020). Dentre os principais efeitos adversos causados pelos glicocorticoides, incluindo a MPD, podem ser citados efeitos metabólicos (hiperglicemia, diabetes mellitus e dislipidemia), distúrbios musculoesqueléticos (osteoporose, osteonecrose, miopatia, sarcopenia), hipertensão, supressão adrenal e um risco aumentado de contrair infecções (Borresen et al., 2022; Chastain et al., 2024; Urquiaga; Saag, 2022). Além disso, o uso prolongado de glicocorticoides pode resultar na síndrome de Cushing iatrogênica. Os sintomas dessa síndrome incluem arredondamento facial, inchaço, deposição de gordura, pletora (face de lua) e crescimento acelerado de cabelos finos no rosto, nas coxas e no tronco (De Alcubierre et al., 2023; Pofi et al., 2023).

Em vista disso, a administração de MPD baseada na nanomedicina pode se mostrar uma abordagem promissora no tratamento da SRAG causada pela COVID-19 (Prasanna et al., 2021). A utilização de sistemas nanoestruturados para o tratamento de patologias apresenta diversas vantagens em comparação às formas farmacêuticas tradicionais, que incluem a promoção de uma administração direcionada do IFA, toxicidade reduzida, aumento da estabilidade do agente encapsulado (no caso da MPD, a nanoestruturação é vantajosa para aumentar a fotoestabilidade do fármaco, visto que ele é fotossensível), liberação controlada do IFA e minimização dos efeitos colaterais sistêmicos, o que pode resultar em maior benefício clínico e melhor adesão dos pacientes (Fei et al., 2023; Iyer; Hsia; Nguyen, 2015).

2.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA A ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

A concepção inicial da nanotecnologia teve origem em 1959, quando Richard Feynman introduziu pela primeira vez o conceito de manipulação direta de átomos e moléculas em sua famosa palestra “*There's Plenty of Room at the Bottom*” (Bisla; Honparkhe; Srivastava, 2022). Na década de 1980, os cientistas foram capazes de observar e manipular a matéria na nanoescala, graças à invenção da microscopia de tunelamento com varredura (STM) e da microscopia de força atômica (AFM). Na década de 1990, a ciência dos nanomateriais começou a se desenvolver rapidamente, e os pesquisadores descobriram propriedades únicas das nanoestruturas, como as propriedades ópticas dos pontos quânticos e a resistência mecânica dos nanotubos de carbono (Awasthi; Bhushan; Kulkarni, 2020; Gutiérrez et al., 2017). Com isso, o interesse pela nanotecnologia em eletrônica, medicina, energia e outros campos aumentou significativamente. Ao entrar no século 21, o desenvolvimento de estudos com nanoestruturas cresceu ainda mais, o que demonstrou o grande potencial da nanotecnologia na administração de medicamentos, no desenvolvimento de biossensores, imagens e diagnósticos (Xue et al., 2024).

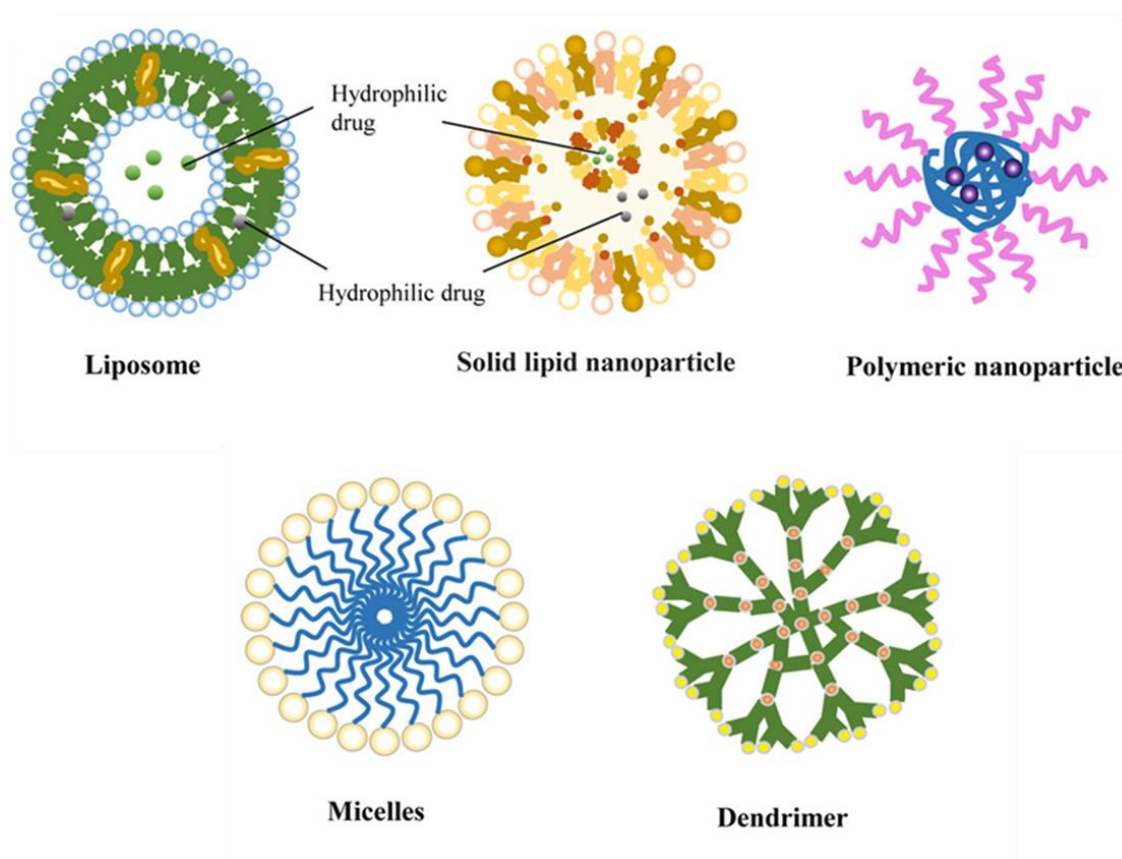
Recentemente, muitas pesquisas estão concentradas na utilização de nanopartículas em sistemas de administração de fármacos. Ao regular o tamanho, a forma e as propriedades de superfície das nanopartículas, é possível promover a liberação direcionada do ativo encapsulado, o aumento da eficácia do tratamento medicamentoso e a diminuição de efeitos colaterais tóxicos (Raheem et al., 2023). Para a administração de IFAs, as nanopartículas oferecem várias vantagens, como variabilidade de tamanho e forma, formação de interações estáveis com ligantes, alta capacidade de transporte e possibilidade de encapsular moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (Gupta; Quadros; Momin, 2023).

As nanopartículas utilizadas para a administração de fármacos incluem uma variedade de estruturas, com diferentes tamanhos, formas e materiais, cada uma com diferentes capacidades de carga, liberação, direcionamento celular e estabilidade (Paramasivam et al., 2021). As propriedades biofísicas e químicas das nanopartículas como, por exemplo, tamanho, geometria/forma, carga superficial, hidrofobicidade, rugosidade e dureza podem afetar significativamente a administração do IFA alvo por meio dessas estruturas. Dessa forma, a obtenção de nanopartículas com diferentes características permite que elas cumpram requisitos adequados e específicos para a administração de diferentes tipos de IFAs (Habeeb et al., 2023).

Há variados tipos de nanoestruturas utilizadas para administrar IFAs, os quais incluem lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, micelas e

dendrimeros, apresentados na Figura 3 (Amoabediny et al., 2018; Feng; Jia; Zhang, 2024). Desde a década de 1980, as nanopartículas poliméricas têm sido amplamente pesquisadas como transportadoras de IFAs e se destacam por melhorar a biodisponibilidade do IFA, prolongar a liberação, reduzir a citotoxicidade, melhorar a farmacocinética e fornecer maior quantidade de IFA à célula ou tecido alvo, proteger o(s) IFA(s) encapsulados da degradação enzimática e, comumente, aumentar a eficiência e a eficácia terapêutica (Cheng et al., 2021). Além disso, as nanopartículas poliméricas são altamente utilizadas devido à sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, o que é de extrema importância em aplicações biomédicas (Ahmad et al., 2022; Bhardwaj; Jangde, 2023).

Figura 3 – Representação esquemática de nanocarreadores orgânicos comumente utilizados para a administração de fármacos: lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, micelas e dendrímeros

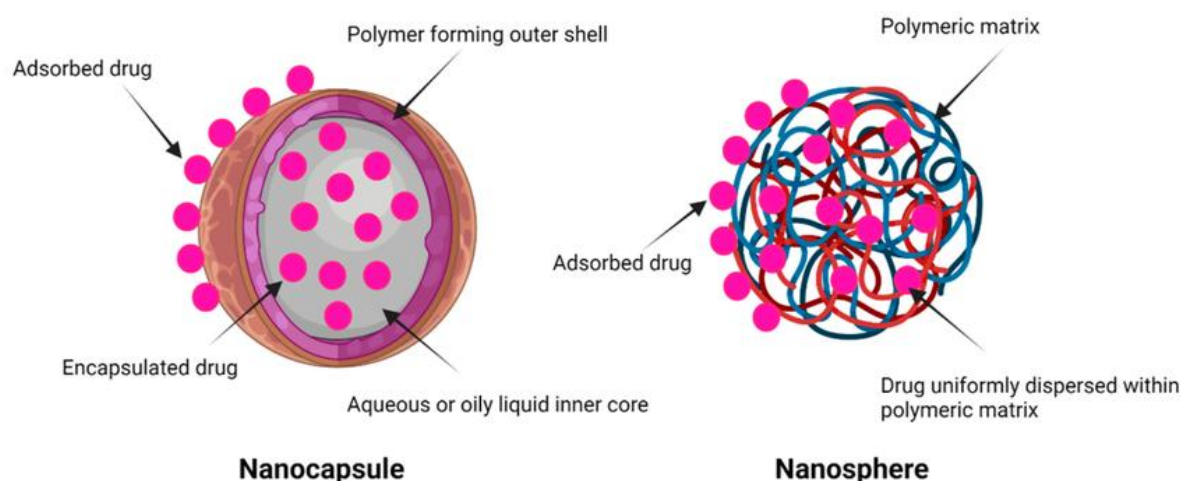


Fonte: Adaptado de Feng; Jia; Zhang (2024).

Em relação à categorização das nanopartículas poliméricas, estas são subdivididas em nanocápsulas e nanoesferas, que se diferem quanto à estrutura interna e morfologia. As nanocápsulas são compostas de um núcleo oleoso no qual o IFA é geralmente dissolvido,

cercado por uma membrana polimérica que controla o perfil de liberação do IFA a partir do núcleo (Crucho, 2015). Apesar desse comportamento comumente observado, também é possível que o IFA fique adsorvido na parte externa da membrana polimérica que envolve o núcleo das nanocápsulas (Shishir et al., 2018). As nanoesferas, por outro lado, são baseadas em redes poliméricas contínuas nas quais o IFA pode ficar retido no interior ou adsorvido na superfície (Crucho; Barros, 2017). Esses dois tipos de nanopartículas poliméricas, reconhecidos como um sistema de reservatório (nanocápsula) e um sistema de matriz (nanoesfera), são representados na Figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Madawi et al. (2023).

Para preparar nanopartículas poliméricas, de acordo com suas aplicações, diferentes métodos foram desenvolvidos e podem ser baseados na polimerização de monômeros ou na dispersão de polímeros pré-formados (Wang et al., 2016). Esses métodos podem ser subdivididos em duas categorias: procedimentos de duas etapas, que envolvem a preparação de um sistema de emulsificação seguido pela formação das nanopartículas; e procedimentos de uma etapa, nos quais a emulsificação não é necessária para formar as nanopartículas (Yue; Ma, 2015). Dentre os procedimentos de duas etapas baseados em emulsificação, encontram-se as metodologias de emulsificação-evaporação de solvente, emulsificação-difusão de solvente e *salting-out*. Com relação aos procedimentos de uma etapa, destacam-se as metodologias de nanoprecipitação, diálise, tecnologia de fluidos supercríticos e gelificação iônica (Ansari; Alshahrani, 2019; De Marco, 2022; Jamkhane et al., 2019; Lepeltier; Bourgaux; Couvreur, 2014).

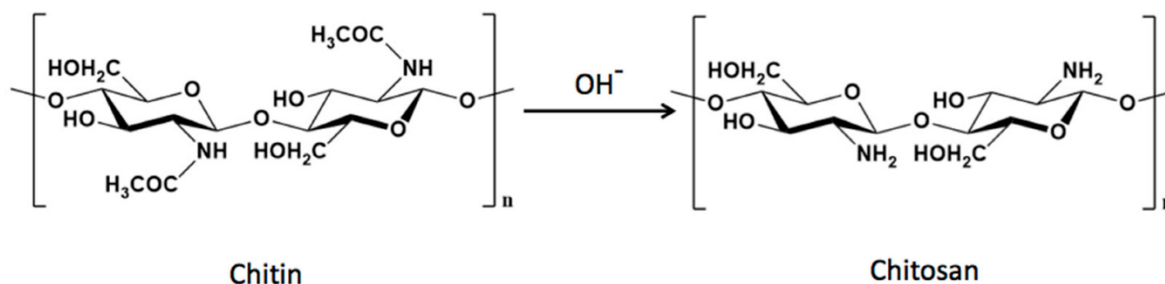
As nanopartículas poliméricas podem ser produzidas a partir de biomateriais naturais (quitosana, albumina, gelatina, colágeno e outros) e sintéticos (ácido polilático (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), polietilenoglicol (PEG), policaprolactona (PCL) e outros). A produção de diferentes tipos de nanopartículas por meio dos polímeros supracitados confere diferentes características às nanoestruturas, o que inclui tamanho, forma, hidrofobicidade e cargas de superfície. Essas características, por sua vez, influenciam a penetração das nanopartículas em membranas celulares e outras barreiras biológicas (Abd Elrahman; Mansour, 2019; Bhardwaj; Jangde, 2023). Dentre os variados tipos de polímeros naturais que podem ser utilizados para preparar nanopartículas, a quitosana (QT) tem demonstrado potencial significativo e crescente para a administração de fármacos devido às suas propriedades intrínsecas, que incluem: mucoadesividade, atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e de cicatrização de feridas. Juntamente a isso, a QT foi reconhecida como um polímero “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA), o que permite seu uso em engenharia de tecidos e dispositivos de administração de IFAs (Desai et al., 2023; Rasul et al., 2020; Rawal; Patel; Butani, 2018).

2.5 QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

2.5.1 Quitosana

A QT é um aminopolissacarídeo linear formado pela replicação de unidades de 2-amina-2-desoxi- β -(1,4)-d-glucosamina e 2-acetamida-2-desoxi- β -(1,4)-d-glucosamina, que são obtidas através da desacetilação parcial da quitina em ambiente alcalino (Figura 5) (Berger et al., 2005; Patrulea et al., 2015). Por outro lado, a quitina é um polímero natural nomeado de poli (β -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina), um composto natural abundante encontrado no exoesqueleto de crustáceos, insetos, artrópodes e na parede celular de fungos. A QT marinha, proveniente de fontes como camarão, lagosta e caranguejo, representa a principal fonte de QT comercializada para diferentes aplicações (Issahaku; Tetteh; Tetteh, 2023; Rashki et al., 2021).

Figura 5 – Reação alcalina para formação de QT a partir da desacetilação da quitina



Fonte: Zacaron et al. (2023).

Quimicamente, a QT é um polímero linear policatiônico com grupos acetamida livres e funções hidroxila associadas aos anéis de glicopirranose, que podem reagir através de ataque nucleofílico. Assim, a alteração seletiva dos grupos amino livres da QT proporciona uma vasta variedade de funcionalidades para este polímero (Shoueir et al., 2021). Em contraste com a quitina, que tem restrições de uso devido à sua baixa solubilidade em água e baixa reatividade, a QT é mais hidrofílica e tem um maior potencial para sofrer alterações devido aos grupamentos amino livres mencionados anteriormente. Ademais, enquanto a quitina possui uma biodegradabilidade reduzida, a QT possui excelente degradabilidade e biocompatibilidade (Ardean et al., 2021; Silva et al., 2024).

As características físico-químicas mais importantes que influenciam a qualidade e a velocidade de fluxo da QT são a cristalinidade, a superfície, o tamanho das partículas, o peso molecular e a proporção de N-desacetilação (Kapadnis et al., 2019; Sugiyanti et al., 2018). Os elementos mencionados são relevantes, pois influenciam a solubilidade, a estrutura policatiônica, a eficácia antimicrobiana, a biocompatibilidade e a bioadesão da QT (Byun et al., 2013).

A QT possui cristalinidade, que consiste na relação entre as partes cristalinas e amorfas deste biopolímero, medida como índice de cristalinidade. Comumente, o índice de cristalinidade é determinado pela relação entre picos característicos observados através da técnica de difração de raios X (DRX) (Li; Cai; Zhang, 2019). No estado sólido, a QT é um biopolímero semicristalino e polimórfico, disponível em três fases polimórficas com variados níveis de cristalinidade, os quais variam conforme a origem e a disposição das cadeias (Dodero et al., 2020). Nesse contexto, é crucial destacar a importância da avaliação quantitativa do índice de cristalinidade, visto que se trata de um parâmetro que influencia as características de inchamento, porosidade, hidratação e absorção da QT (Jakubowska et al., 2020; Thakhiew; Devahastin; Soponronnarit, 2013). Por outro lado, a área superficial e a dimensão das partículas

estão ligadas à origem e ao método de extração. Normalmente, os pós de QT possuem uma área superficial reduzida (menor que 10 m²/g), o que os classifica como materiais não porosos (Monier; Youssef; Abdel-Latif, 2018).

O peso molecular da QT, por sua vez, está ligado ao número de unidades monoméricas do biopolímero, e sua avaliação é crucial, pois essa característica está diretamente ligada a características como viscosidade e solubilidade. Com base no peso molecular, a QT pode ser categorizada como de peso molecular baixo (50,000-190,000 Da), médio (190,000-310,000 Da) ou alto (310,000-375,000 Da) (Aranda-Barradas et al., 2022; Liu et al., 2020; Villegas-Peralta et al., 2021). Além disso, a porcentagem de N-desacetilação da QT pode ser caracterizada pelo grau de desacetilação (GD) ou pelo grau de acetilação (GA). O termo mais frequentemente utilizado é o GA, que indica a relação entre a quantidade de monômeros de N-acetil-D-glucosamina e o total de unidades do polímero (Jiang et al., 2017). É importante destacar que o GA é fundamental para definir as características físico-químicas da QT, pois é a N-desacetilação da quitina que torna a QT mais hidrossolúvel e reativa em relação ao seu polímero de origem. Isso significa que, no geral, a QT com GA mais baixo e, portanto, mais grupos amino livres, tende a ser mais hidrossolúvel (Facchinatto et al., 2020; Pavoni; Luchese; Tessaro, 2019; Shariatnia, 2019).

Em soluções ácidas diluídas (pH < 6,5), a QT é solúvel quando seu GA é inferior a 70% e exibe uma solubilidade ótima quando seu GA varia entre 45 e 55%. A dissolução da QT em ácido diluído ocorre devido à combinação do grupo amino com prótons de hidrogênio na solução aquosa, convertendo-a em um polieletrólito com carga positiva. Assim, os cátions rompem as ligações de hidrogênio originadas entre as moléculas de QT, resultando na sua dissolução na solução aquosa ácida (Sikorski; Gzyra-Jagiela; Draczyński, 2021). Normalmente, quanto mais elevada a desacetilação da QT, mais acentuada é a protonação dos grupos amino e mais fácil é a sua dissolução. Por outro lado, quanto maior é o peso molecular da QT, mais ligações de hidrogênio intra e intermoleculares se estabelecem na cadeia polimérica, tornando a dissolução mais difícil (Foster et al., 2015; Sharmin et al., 2022).

2.5.2 Nanopartículas de quitosana

Assim como outros tipos de nanoestruturas, as nanopartículas de QT aumentam a estabilidade, a biodisponibilidade e a liberação controlada do IFA, superando barreiras e aumentando a permeabilidade. Elas podem carrear IFAs hidrofóbicos e hidrossolúveis, os quais podem ser aprisionados dentro da matriz polimérica ou adsorvidos na superfície das partículas

(Garg et al., 2019). O carregamento do IFA nas nanopartículas de QT pode ocorrer durante a formação das nanopartículas (incorporação) ou após a formação (incubação), o que envolve interações como ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e adsorção eletrostática (Ali; Ahmed, 2018; Li et al., 2023). A eficiência de encapsulação (EE) do IFA nas nanopartículas é predominantemente influenciada pelas propriedades físico-químicas do IFA e pelo método de preparação das nanopartículas. Comumente, uma maior EE é obtida quando o IFA é adicionado durante a formação das partículas, embora isso possa ser afetado pela metodologia empregada ou pela presença de aditivos adicionais (Desai et al., 2023; Herdiana et al., 2024; Jaferník et al., 2023).

As características das nanopartículas de QT variam significativamente com base nos procedimentos de preparação e modificação de superfície. Nesse âmbito, vários métodos foram desenvolvidos para a preparação de nanopartículas de QT, e as abordagens básicas utilizadas consistem em emulsificação, precipitação, reticulação iônica ou covalente, ou combinações dessas técnicas (El-Saadony et al., 2025; Matalqah et al., 2020).

O método inicial proposto para a preparação de nanopartículas de QT se baseava na reticulação covalente, através da reação entre o grupo amino da QT e o grupo aldeído de um agente de reticulação, como o glutaraldeído (Ohya et al., 1994). Nesse procedimento, uma emulsão é obtida pela combinação de uma solução de QT em água com uma fase oleosa formada por Span 80 (estabilizador), tolueno e glutaraldeído. Apesar de o método gerar nanopartículas de tamanho reduzido e distribuição uniforme, ele deixou de ser utilizado após a descoberta de que o glutaraldeído poderia causar toxicidade evidente e comprometer a integridade do IFA (Yanat; Schroën, 2021).

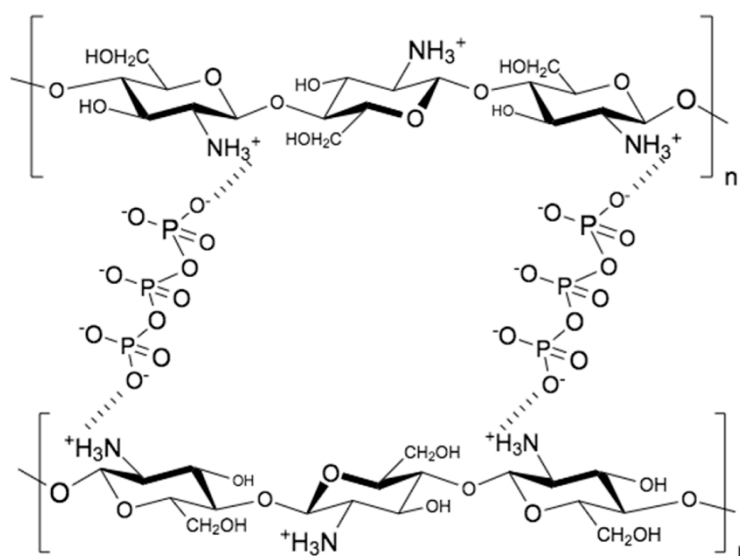
Também é possível produzir nanopartículas de QT através de técnicas baseadas em precipitação, como a precipitação por inversão de fase e a dessolvatação (Ichikawa et al., 2003; Tokumitsu; Ichikawa; Fukumori, 1999). O processo de precipitação por inversão de fase inicia-se com a emulsificação, que envolve a utilização de uma solução aquosa de QT, um estabilizador (poloxâmico) e uma fase orgânica (diclorometano e acetona). Então, utiliza-se um homogeneizador de alta pressão para produzir gotas de emulsão nanométricas. Por fim, as nanopartículas são formadas pela evaporação do diclorometano sob baixa pressão e temperatura ambiente, resultando na precipitação das nanopartículas (El-Shabouri, 2002; Verma et al., 2023).

A dessolvatação, também chamada de coacervação simples ou separação de fases, envolve a união de duas emulsões de água em óleo, promovendo a precipitação das nanopartículas. Nesse processo, utiliza-se uma combinação de parafina líquida e sesquioleato

como fase contínua para as duas emulsões, uma contendo QT e outra contendo NaOH. Após ocorrer a fusão entre as duas emulsões, o NaOH se espalha em gotas que diminuem a solubilidade da QT, resultando na formação e precipitação de nanopartículas (Borges et al., 2005; Yanat; Schroën, 2021). Esses processos de precipitação não são frequentemente empregados por exigirem solventes orgânicos e processos de homogeneização de alta energia. Adicionalmente, as nanopartículas de QT obtidas através de processos de precipitação costumam ser maiores que 600-800 nm (Grenha, 2012).

Desde a sua introdução por Calvo et al., a técnica de reticulação ou gelificação iônica tem sido amplamente empregada em diversos campos (Calvo et al., 1997), em virtude da simplicidade, do custo reduzido, do potencial de escalabilidade e por ser um processo que não causa danos significativos ao meio ambiente (Desai, 2016). A gelificação iônica envolve interações eletrostáticas entre grupos amino primários positivamente carregados de QT e poliânions negativamente carregados que funcionam como agentes de reticulação (Chellathurai et al., 2023). Nesse procedimento, uma solução aquosa do agente reticulante como, por exemplo, tripolifosfato de sódio (TPP), é adicionada à solução aquosa ácida (pH 4-6) de QT por gotejamento. Assim, as nanoesferas são formadas espontaneamente após a mistura das duas soluções através de ligações inter e intramoleculares entre os grupos fosfato do TPP e os grupos amino protonados da QT (Figura 6) (Calvo et al., 1997; Jalal et al., 2023; Marques Gonçalves et al., 2023). Além dos benefícios mencionados, essa técnica possibilita o ajuste do tamanho final das nanopartículas através da modificação da proporção QT/TPP, o que impacta diretamente a eficiência de encapsulação do IFA (Hejjaji; Smith; Morris, 2018). Apesar das inúmeras vantagens da gelificação iônica, uma restrição dessa técnica é que as partículas são formadas por interações eletrostáticas, o que pode levar à instabilidade do sistema em caso de alterações de pH. Ademais, esse procedimento normalmente origina nanopartículas maiores (100 a 400 nm) e com elevado índice de polidispersividade em comparação a outros tipos de nanoestruturas (Jardim et al., 2022; Kamat; Bodas; Paknikar, 2016).

Figura 6 – Representação esquemática da interação entre a QT e o TPP no método de gelificação iônica



Fonte: Zacaron et al. (2023).

Para o preparo de nanopartículas de QT, variados agentes de reticulação (contra-íons) podem ser utilizados, os quais incluem polímeros sintéticos e naturais, ânions metálicos e sais inorgânicos (Lawall Werneck Cerqueira et al., 2020). Diferentes tipos e concentrações de contra-íons podem promover variações na densidade de reticulação e na organização da matriz polimérica, o que impacta o tamanho, a morfologia e a carga superficial das nanopartículas, além da eficiência de encapsulação e do perfil de liberação do(s) composto(s) encapsulado(s). Como agente reticulante, o TPP tem sido muito utilizado por conta de sua rápida capacidade de gelificação, facilidade de manuseio, controle, alta compatibilidade e baixa toxicidade (Abdelgawad; Hudson, 2019; Kašpar; Jakubec; Štěpánek, 2013). Contudo, as ligações iônicas formadas entre o TPP e a QT são relativamente sensíveis a variações de pH e força iônica, o que pode impactar a estabilidade das nanopartículas durante o armazenamento (Estevinho et al., 2013). Nesse contexto, outros potenciais contra-íons também estão sendo explorados para o preparo de nanopartículas de QT, como: alginato, pectina, carragenina, goma xantana, celulose, colágeno, ácido cítrico e ácido hialurônico (Hamman, 2010; Lawall Werneck Cerqueira et al., 2020; Luo; Wang, 2014). Esses contra-íons variam em termos de estrutura, carga e peso molecular, o que influencia diretamente as propriedades finais das nanopartículas, como mencionado anteriormente. Desse modo, a escolha do contra-íon ideal depende da aplicação desejada e se trata de um fator crítico no desenvolvimento de sistemas eficientes de

liberação controlada ou de veículos para aplicações terapêuticas e tecnológicas (Abdelgawad; Hudson, 2019; Wang; Jung; Zhao, 2017).

Como a emulsificação e a reticulação, o método micelar reverso (microemulsão) se fundamenta na reticulação covalente, empregando micelas reversas como nanorreatores. Nessa abordagem, os reticuladores (moléculas que possuem pelo menos dois grupos funcionais reativos) possibilitam a criação de pontes entre cadeias de QT, resultando em aglomerados de polímeros de QT interligados. Geralmente, um meio aquoso que contém QT e glutaraldeído é combinado com um meio orgânico que inclui um solvente orgânico e um surfactante lipofílico, como o bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Khalid et al., 2021). Na preparação de nanopartículas de QT, um obstáculo para a maioria dos métodos é a complexidade em regular a distribuição de tamanho das partículas, uma limitação que o método micelar reverso superou, pois permite a produção de nanopartículas com uma distribuição de tamanho reduzida. Ademais, quando comparada à técnica de gelificação iônica, por exemplo, a microemulsão gera nanopartículas de menor tamanho (Riegger et al., 2018). No entanto, apesar do glutaraldeído ser um dos catalisadores mais eficientes para a produção de nanopartículas de QT, sua citotoxicidade restringe sua aplicação na área biomédica. Este problema sugere a necessidade de investigar agentes de reticulação seguros e eficientes para uso no método micelar reverso, como a genipina (Baldino et al., 2015; Song et al., 2015).

Atualmente, a pesquisa de métodos de preparo que não impactam o meio ambiente está sendo cada vez mais explorada. Neste cenário, o processo de secagem através da técnica de *spray drying* é destacado para a produção de nanopartículas de QT (Fernández-Paz et al., 2022). Nessa metodologia, a QT é comumente diluída em uma solução de ácido acético, e as nanopartículas são produzidas ao passar essa solução por um bico a uma temperatura de ar que varia entre 120°C e 150°C. As características das nanopartículas de QT produzidas por essa técnica são influenciadas por diversos fatores operacionais, tais como o tamanho do bico, a vazão e as temperaturas de entrada e saída (Ngan et al., 2014). Os inconvenientes desse método englobam um tempo de processamento prolongado, produção de partículas de grande dimensão e inadequação para IFAs termossensíveis (Başaran et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho consiste no desenvolvimento de nanopartículas de QT carregadas com MPD visando o tratamento da Síndrome Respiratória Aguda Grave decorrente da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adequar e otimizar uma metodologia analítica para identificar e quantificar a MPD e o MPS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Desenvolver nanopartículas de QT carregadas com MPD ou MPS por meio da metodologia de gelificação iônica, avaliando a influência do contra-íon e da forma do fármaco nas características físico-químicas das nanopartículas;
- Avaliar as características físico-químicas das nanopartículas de QT a partir de análises de diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade, potencial Zeta e eficiência de encapsulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A MPD (padrão secundário farmacêutico) e o MPS (pó liofilizado de sal de sódio de 6 α -metilprednisolona 21-hemisuccinato) foram adquiridos da Sigma-Aldrich RTC (Laramie, Wyoming, EUA). A QT de baixo peso molecular (PM: 50,000-190,000 Da; GD: 75-85%), o tripolifosfato de sódio e a acetonitrila grau HPLC foram adquiridos através da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). A coluna cromatográfica modelo XBridge BEH C18, 130Å, 5 μ m, 150 mm x 3,9 mm foi adquirida da Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EUA). O ácido acético glacial e a acetona foram obtidos da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, São Paulo, Brasil). O acetato de amônio foi obtido através da Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Adequação e otimização de metodologia analítica para a quantificação dos fármacos

Tendo em vista que as nanopartículas foram desenvolvidas com a MPD e com o MPS, foi necessário buscar e adequar uma metodologia analítica capaz de identificar e quantificar corretamente esses analitos. Para tanto, realizou-se uma busca por artigos científicos que descrevessem metodologias para a análise dos IFAs supracitados através de CLAE. Dessa forma, foi possível adequar e otimizar as metodologias encontradas na literatura científica por meio de testes experimentais.

Como embasamento para os testes realizados em laboratório, foram utilizados os artigos publicados por Rezaei et al. (2018) e Balakrishnan et al. (2022) (Balakrishnan; Prasad; Suresh Babu, 2022; Rezaei et al., 2018). A partir dos artigos supracitados, foram adequados os seguintes parâmetros: fase móvel, fluxo de fase móvel, volume de injeção, coluna cromatográfica e temperatura do forno de aquecimento da coluna. Todos os testes realizados para a obtenção das metodologias finais, bem como as condições finais de análise, estão descritos de forma detalhada no item 5.1.

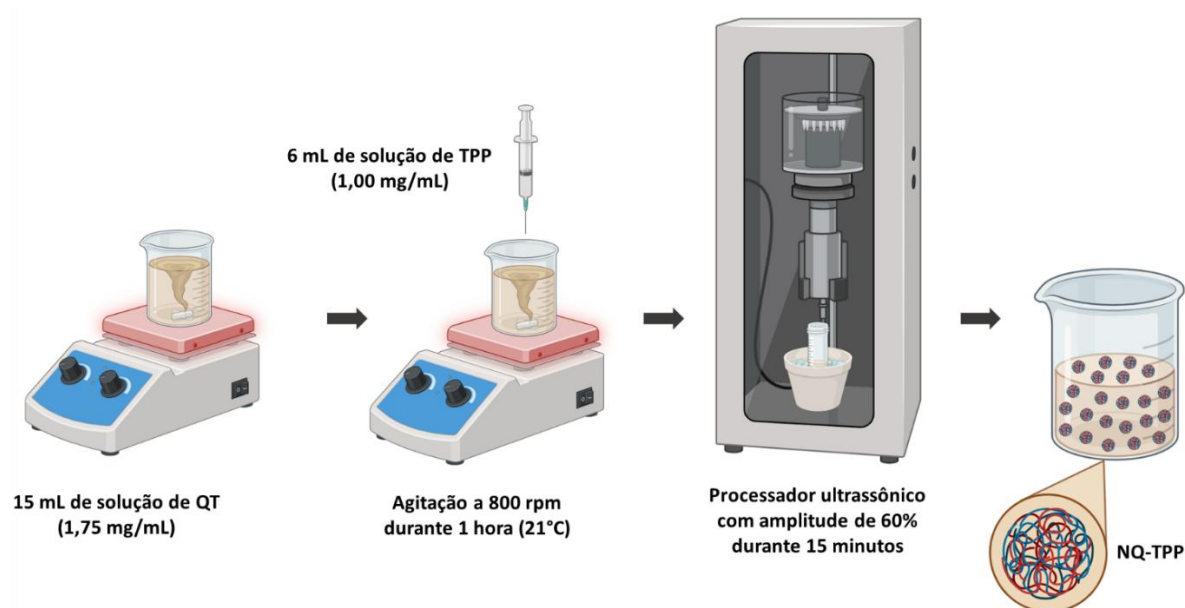
4.2.2 Desenvolvimento das nanopartículas

4.2.2.1 Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) (Nanopartículas brancas; NQ-TPP)

O desenvolvimento das nanopartículas brancas de QT com TPP (n=3) foi baseado na metodologia de gelificação iônica (Calvo et al., 1997; Ding et al., 2022), conforme ilustrado na Figura 7. Nesse procedimento, foram utilizadas soluções de QT com concentração igual a 1,75 mg/mL e de TPP com concentração igual a 1,0 mg/mL. A produção da solução de QT a 1,75 mg/mL foi realizada por meio da solubilização da QT em ácido acético 1%, sob agitação, por 30 minutos. Seguidamente, o pH da solução final foi ajustado para 4,7 com aminometilpropanol (AMP). Já a solução de TPP a 1,0 mg/mL foi produzida por meio da solubilização do TPP em água purificada. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado para 9,0 com ácido acético a 1%.

Após realizar o preparo das soluções, 15 mL da solução de QT eram submetidos a agitação (800 rpm). Em seguida, 6 mL da solução de TPP eram gotejados sobre a solução de QT por meio de uma seringa de 5 mL com agulha (proporção de 5:2 entre a solução de QT e a solução de TPP, respectivamente). Após finalizar o gotejamento do TPP, todo o conteúdo era mantido sob agitação (800 rpm) por 1 hora a 21°C para que ocorresse a reticulação iônica entre a QT e o TPP, promovendo a formação das nanopartículas. Por fim, a suspensão era submetida a processador ultrassônico por 15 minutos, com amplitude de 60% e em banho de gelo.

Figura 7 – Representação esquemática da produção das nanopartículas brancas (NQ-TPP)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

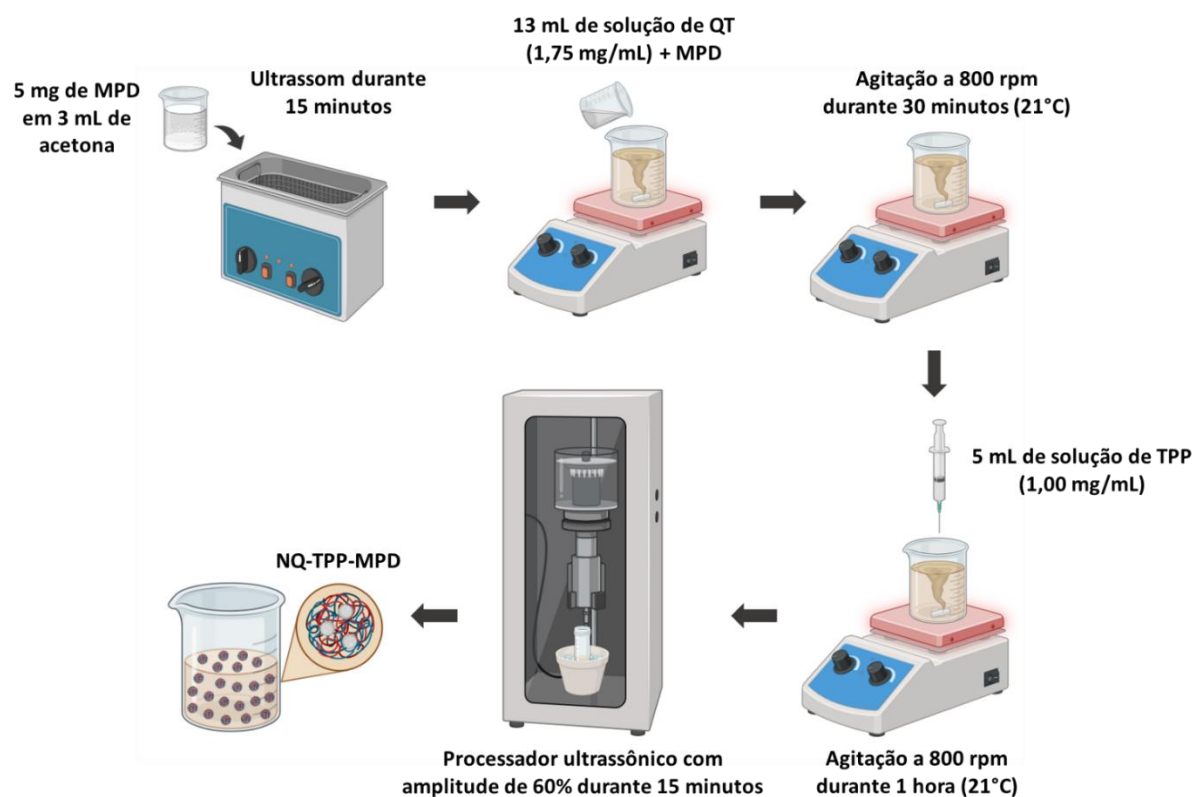
4.2.2.2 Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) carregadas com MPD (NQ-TPP-MPD)

O desenvolvimento das nanopartículas de QT com MPD (n=3) foi baseado na metodologia de gelificação iônica (Calvo et al., 1997; Ding et al., 2022). Nesse procedimento, foram utilizadas soluções de QT com concentração igual a 1,75 mg/mL e de TPP com concentração igual a 1,0 mg/mL. A produção da solução de QT a 1,75 mg/mL foi realizada por meio da solubilização da QT em ácido acético 1%, sob agitação, por 30 minutos. Seguidamente, o pH da solução final foi ajustado para 4,7 com aminometilpropanol (AMP). Já a solução de TPP a 1,0 mg/mL foi produzida por meio da solubilização do TPP em água purificada. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado para 9,0 com ácido acético a 1%.

Em seguida, 5 mg de MPD foram solubilizados em 3 mL de acetona em ultrassom por 15 minutos. A necessidade de realizar essa etapa inicial de solubilização do IFA em acetona se deu por testes experimentais prévios, os quais demonstraram a falta de miscibilidade da MPD na solução ácida de QT. Desse modo, a acetona foi escolhida como solvente orgânico para solubilizar o IFA, tendo em vista suas características físico-químicas e seu caráter hidrofóbico.

Feito isso, o IFA solubilizado em acetona era vertido sobre 13 mL da solução de QT, e todo o conteúdo era deixado sob agitação (800 rpm) por 30 minutos. Em seguida, 5 mL da solução de TPP eram gotejados sobre a solução de QT + IFA por meio de uma seringa de 5 mL com agulha (proporção de aproximadamente 5:2 entre a solução de QT e a solução de TPP, respectivamente). Após finalizar o gotejamento do TPP, todo o conteúdo era mantido sob agitação (800 rpm) por 1 hora a 21°C para que ocorresse a reticulação iônica entre a QT e o TPP, promovendo a formação das nanopartículas. Por fim, a suspensão era submetida a processador ultrassônico por 15 minutos, com amplitude de 60% e em banho de gelo (Figura 8).

Figura 8 – Representação esquemática da produção das nanopartículas de QT-TPP com MPD (NQ-TPP-MPD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.2.2.3 Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) carregadas com MPS (NQ-TPP-MPS)

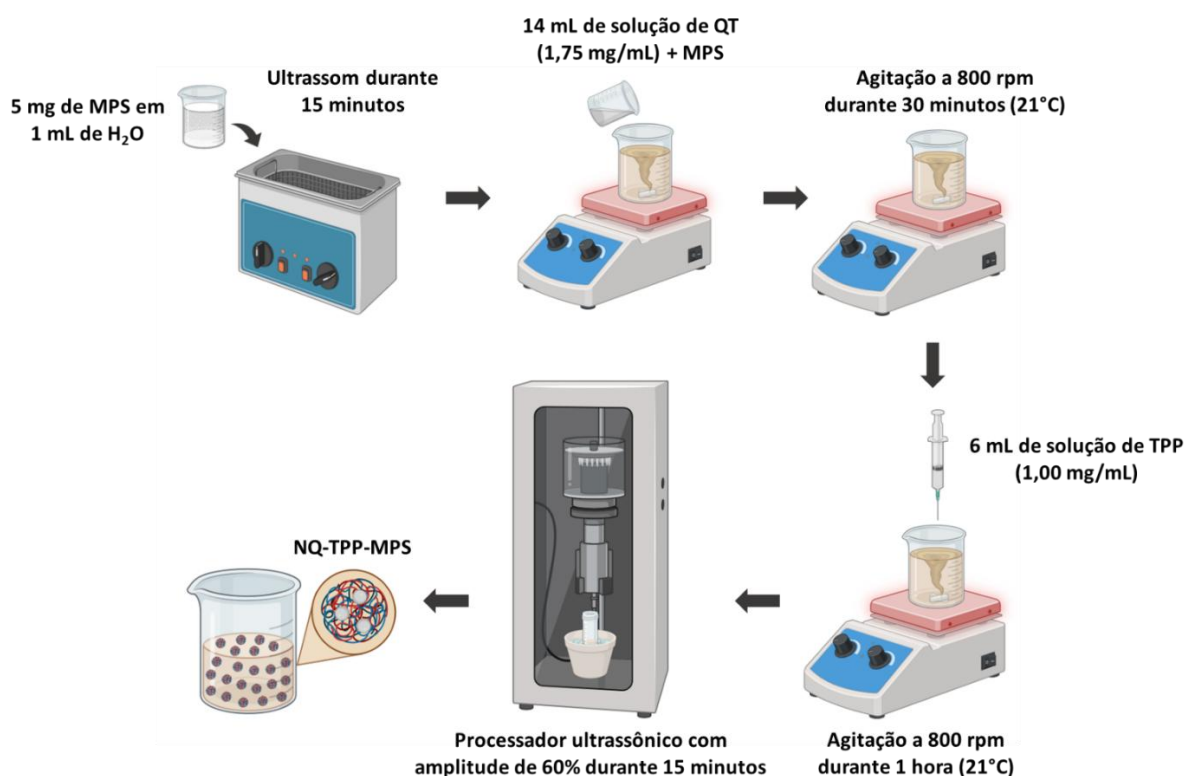
O desenvolvimento das nanopartículas de QT com MPS (n=3) também foi baseado na metodologia de gelificação iônica (Calvo et al., 1997; Ding et al., 2022). Nesse procedimento, foram utilizadas soluções de QT com concentração igual a 1,75 mg/mL e de TPP com concentração igual a 1,0 mg/mL. A produção da solução de QT a 1,75 mg/mL foi realizada por meio da solubilização da QT em ácido acético 1%, sob agitação, por 30 minutos. Seguidamente, o pH da solução final foi ajustado para 4,7 com aminometilpropanol (AMP). Já a solução de TPP a 1,0 mg/mL foi produzida por meio da solubilização do TPP em água purificada. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado para 9,0 com ácido acético a 1%.

Em seguida, 5 mg de MPS foram dissolvidos em 1 mL de água purificada em ultrassom por 15 minutos. A necessidade de realizar essa etapa inicial de solubilização do IFA em água se deu por testes experimentais prévios, os quais demonstraram a falta de miscibilidade do MPS

na solução ácida de QT. Desse modo, a água foi escolhida como solvente para solubilizar o IFA, tendo em vista suas características físico-químicas e seu caráter hidrossolúvel.

Feito isso, o IFA solubilizado em água era vertido sobre 14 mL da solução de QT, e todo o conteúdo era deixado sob agitação (800 rpm) por 30 minutos. Em seguida, 6 mL da solução de TPP eram gotejados sobre a solução de QT + IFA por meio de uma seringa de 5 mL com agulha (proporção de aproximadamente 5:2 entre a solução de QT e a solução de TPP, respectivamente). Após finalizar o gotejamento do TPP, todo o conteúdo era mantido sob agitação (800 rpm) por 1 hora a 21°C para que ocorresse a reticulação iônica entre a QT e o TPP, promovendo a formação das nanopartículas. Por fim, a suspensão era submetida a processador ultrassônico por 15 minutos, com amplitude de 60% e em banho de gelo (Figura 9).

Figura 9 – Representação esquemática da produção das nanopartículas de QT-TPP com MPS (NQ-TPP-MPS)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

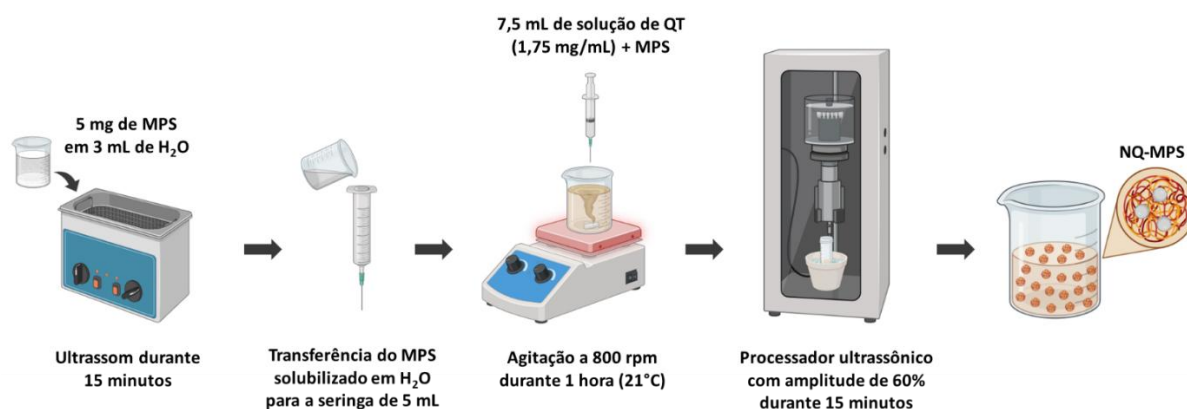
4.2.2.4 Nanopartículas de quitosana carregadas com MPS (NQ-MPS)

O desenvolvimento das nanopartículas de QT com MPS, sem TPP ($n=3$), se baseou na interação iônica entre o IFA e a QT. Nesse procedimento, foi utilizada a solução de QT com concentração igual a 1,75 mg/mL. A produção da solução de QT a 1,75 mg/mL foi realizada por meio da solubilização da QT em ácido acético 1%, sob agitação, por 30 minutos. Seguidamente, o pH da solução final foi ajustado para 4,7 com aminometilpropanol (AMP).

Posteriormente, 5 mg de MPS eram solubilizados em 3 mL de água purificada em ultrassom por 15 minutos. A necessidade de realizar essa etapa inicial de solubilização do IFA em água se deu por testes experimentais prévios, os quais demonstraram a falta de miscibilidade do MPS na solução ácida de QT. Desse modo, a água foi escolhida como solvente para solubilizar o IFA, tendo em vista suas características físico-químicas e seu caráter hidrossolúvel.

Feito isso, os 3 mL da solução aquosa do IFA eram gotejados sobre 7,5 mL de solução de QT por meio de uma seringa de 5 mL com agulha (proporção de aproximadamente 5:2 entre a solução de QT e a solução do IFA, respectivamente). Após finalizar o gotejamento do IFA, todo o conteúdo era mantido sob agitação (800 rpm) por 1 hora a 21°C para que ocorresse a interação iônica entre a QT e o MPS, promovendo a formação das nanopartículas e a incorporação do IFA nas mesmas. Por fim, a suspensão era submetida a processador ultrassônico por 15 minutos, com amplitude de 60% e em banho de gelo (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática da produção das nanopartículas de QT com MPS (NQ-MPS)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.2.3 Caracterização das nanopartículas

4.2.3.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHm), Índice de Polidispersividade (PdI) e Potencial Zeta (PZ)

O DHm e o PdI das amostras foram determinados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), com ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°. O potencial Zeta (PZ), por sua vez, foi mensurado por meio da avaliação da mobilidade eletroforética. As análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®), em triplicata e temperatura ambiente, sem diluição prévia da amostra.

4.2.3.2 Eficiência de Encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação dos IFAs nas nanopartículas (n=3) foi determinada de maneira indireta, isto é, através da ultracentrifugação das amostras seguida pela análise dos ultrafiltrados obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para analisar as suspensões das nanopartículas de QT carregadas com MPS e MPD, foi preciso diluir as amostras na proporção de 1:3 v/v em água ultrapura (MilliQ). Seguidamente, as amostras eram ultrafiltradas por meio de filtro Amicon® de 4 mL (4000 rpm por 20 minutos). Os ultrafiltrados eram coletados e filtrados (filtro PVDF de 0,45 µm) para prosseguir a quantificação dos IFAs por CLAE (Ding et al., 2022).

As condições cromatográficas finais comuns aos dois IFAs consistiram em: cromatografia de fase reversa com coluna modelo XBridge BEH C18, 150 mm x 3,9 mm com partículas de 5 µm; temperatura do forno de aquecimento da coluna igual a 50 °C; fase móvel composta de tampão acetato de amônio 0,1M com pH 5,7 (A) e acetonitrila (B) na proporção de 75:25; fluxo de fase móvel de 1,5 mL por minuto; comprimento de onda de 244 nm para a obtenção dos picos cromatográficos (244 nm correspondeu ao comprimento de onda de máxima absorbância para MPS e MPD) e tempo de corrida de 12 minutos (Balakrishnan; Prasad; Suresh Babu, 2022; Rezaei et al., 2018).

Com relação às demais condições cromatográficas, os parâmetros que se diferenciaram entre os dois IFAs analisados foram os volumes de injeção e os solventes utilizados para construir as curvas analíticas. Em relação aos volumes de injeção, utilizou-se 10 µL para MPS e 40 µL para MPD. Para a construção das curvas analíticas de MPS a solução padrão estoque e as diluições obtidas a partir dela foram preparadas em uma solução de água ultrapura (MilliQ) e acetonitrila na proporção de 50:50. Já para a construção das curvas analíticas de MPD, a

solução padrão estoque foi preparada em acetonitrila; a diluição subsequente foi preparada com 25% da solução estoque e 75% de tampão acetato de amônio 0,1M; as demais diluições foram preparadas sempre com 50% da solução anterior (concentração maior) e 50% de tampão acetato de amônio 0,1M.

O cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Waters™ ACQUITY™ Arc™) utilizado nas análises é composto de detector de arranjo de diodos (DAD) modelo 2998, uma bomba quaternária (QSM-R), sistema automático de injeção de amostras (SM FTN-R) com controle de temperatura e um forno de aquecimento de colunas. O *software* Empower™ foi utilizado para aquisição e processamento de dados. A EE dos IFAs nas nanopartículas foi calculada através da equação abaixo.

Equação 1 – Equação utilizada para calcular a EE dos IFAs nas nanopartículas

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

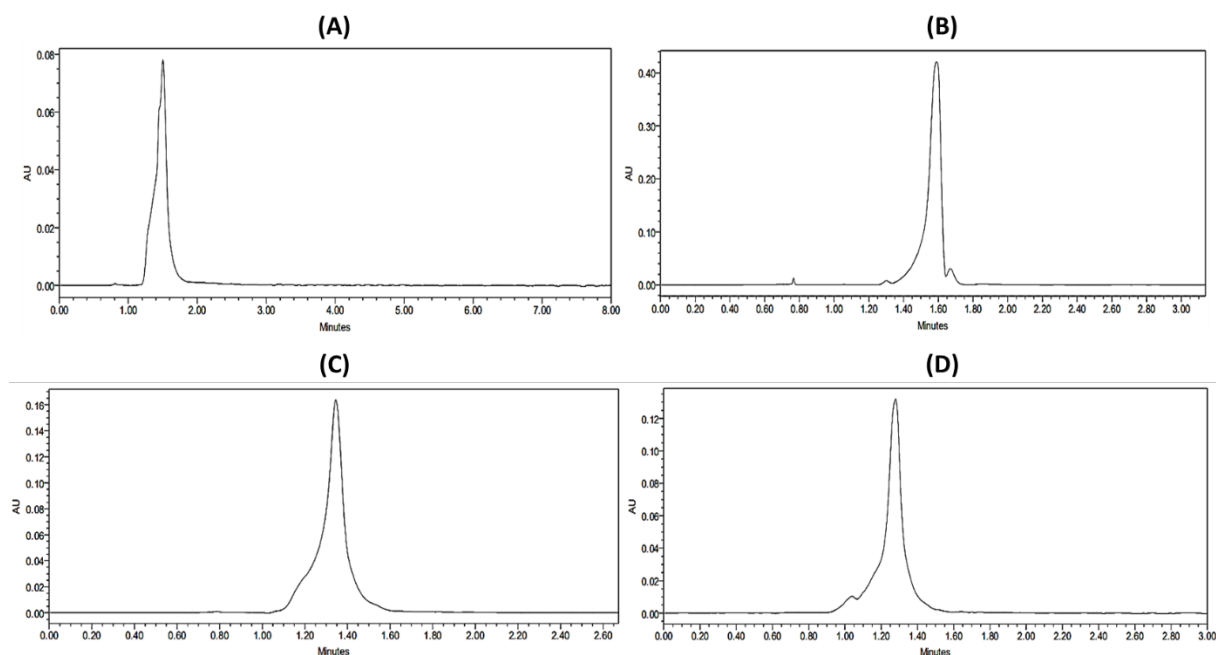
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ADEQUAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS

Inicialmente, a composição da fase móvel pôde ser definida após testarmos diferentes combinações de acetonitrila (ACN) e água ou tampão acetato 0,1M (pH 5,7). Inicialmente, os testes foram realizados com a fase móvel composta por ACN:H₂O nas proporções de 60:40, 50:50, 65:35 e 70:30, respectivamente. Vale salientar que o uso de metodologias por CLAE com coluna de fase reversa octadecilsilano (C18) é largamente empregado na determinação de IFAs. No caso da MPD, a maior parte dos artigos científicos encontrados também empregava essa coluna. A partir disso, optou-se por iniciar os experimentos com a coluna C18 da marca WatersTM, modelo XBridge BEH.

Entretanto, os resultados não foram satisfatórios, visto que os picos correspondentes ao MPS ficaram assimétricos, alargados, duplos, com caudas e frentes (Figura 11). Além disso, o MPS apresentou baixo tempo de retenção, ou seja, a eluição desse IFA ocorreu rapidamente (entre 1 e 2 minutos), o que pode ter ocorrido em virtude de uma baixa afinidade do MPS com a fase estacionária. A coluna C18 utilizada é constituída de uma fase estacionária apolar, ao passo que o MPS consiste em um analito hidrossolúvel (Moldoveanu; David, 2025a). Desse modo, é possível que o MPS tenha permanecido, predominantemente, na fase móvel (mais polar), o que fez com que o analito fosse carregado rapidamente pela coluna, resultando em uma eluição muito rápida (Wu et al., 2022). Essa característica não é desejável, pois significa que a eluição do analito estava próxima do volume morto, que corresponde ao tempo necessário para que haja a eluição de um componente não retido. Assim, a pureza e a resolução do pico do IFA podem ser comprometidas (Ding et al., 2025; Simon; Kovács; Szabó, 2025).

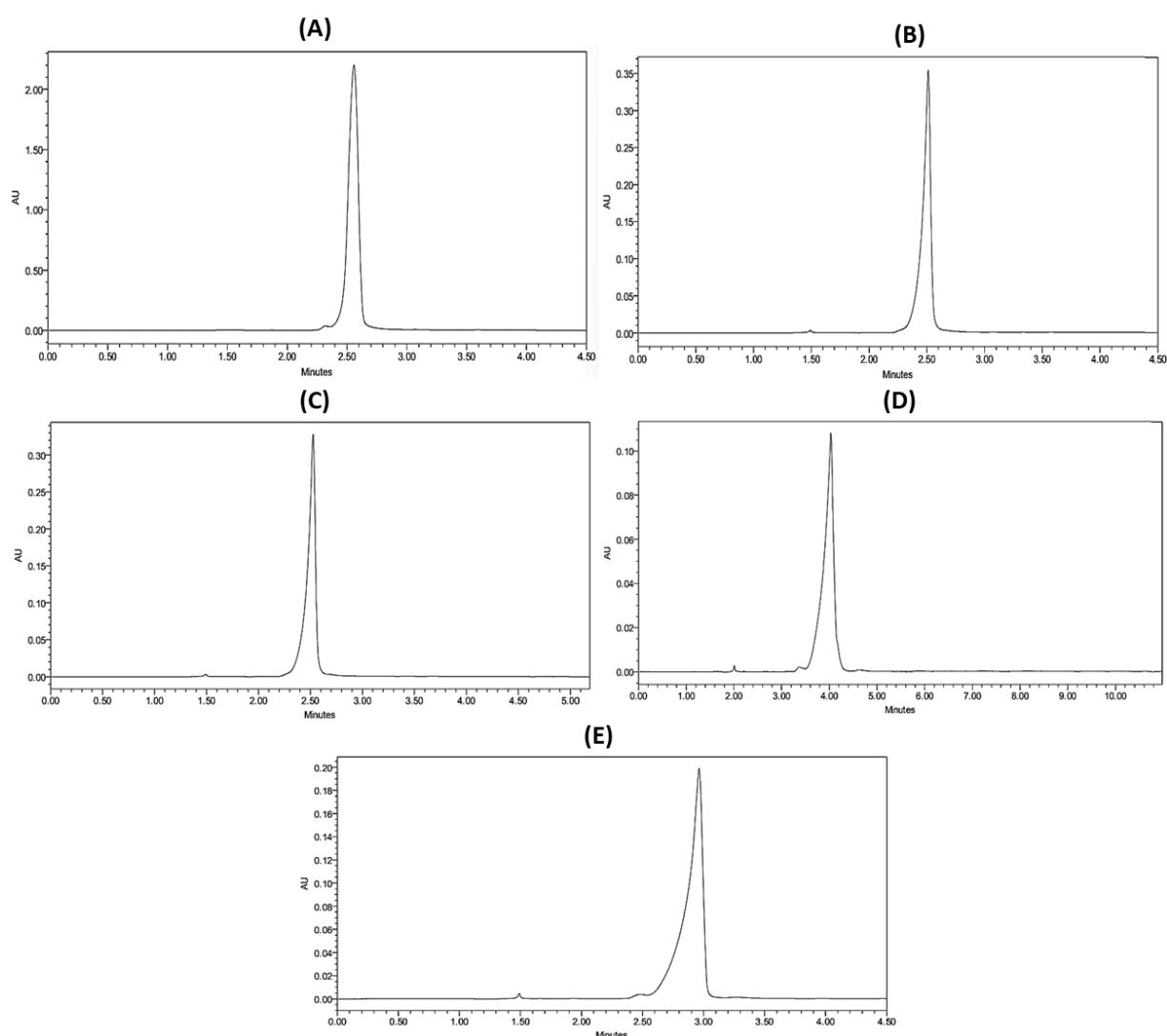
Figura 11 – Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (300 $\mu\text{g/mL}$) com diferentes proporções de fase móvel (ACN e H_2O). (A) fase móvel composta por 60:40 de ACN: H_2O ; (B) fase móvel composta por 50:50 de ACN: H_2O ; (C) fase móvel composta por 65:35 de ACN: H_2O ; (D) fase móvel composta por 70:30 de ACN: H_2O . Análises realizadas com coluna C18



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Após a obtenção de resultados não satisfatórios com as fases móveis e a coluna cromatográfica apresentadas anteriormente, optou-se por testar uma coluna cromatográfica de fenil, muito utilizada para analisar compostos aromáticos e moderadamente polares. Na Figura 12, pode-se analisar os cromatogramas obtidos com a utilização da coluna de fenil e, apesar de terem sido testadas diferentes proporções de fase móvel composta por água e acetonitrila, todos os picos ficaram assimétricos e apresentaram fronte. Além disso, a temperatura do forno da coluna foi modificada com a intenção de melhorar a resolução dos picos, mas este parâmetro não foi suficiente para produzir picos simétricos e com boa resolução.

Figura 12 – Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (300 $\mu\text{g/mL}$) com diferentes proporções de fase móvel (ACN e H_2O) e diferentes temperaturas do forno de aquecimento da coluna (T $^{\circ}\text{C}$). (A) fase móvel composta por 60:40 de ACN: H_2O sem emprego de temperatura; (B) fase móvel composta por 60:40 de ACN: H_2O e T 40 $^{\circ}\text{C}$; (C) fase móvel composta por 60:40 de ACN: H_2O e T 45 $^{\circ}\text{C}$; (D) fase móvel composta por 50:50 de ACN: H_2O e T 30 $^{\circ}\text{C}$; (E) fase móvel composta por 50:50 de ACN: H_2O e T 50 $^{\circ}\text{C}$. Análises realizadas com coluna de fenil

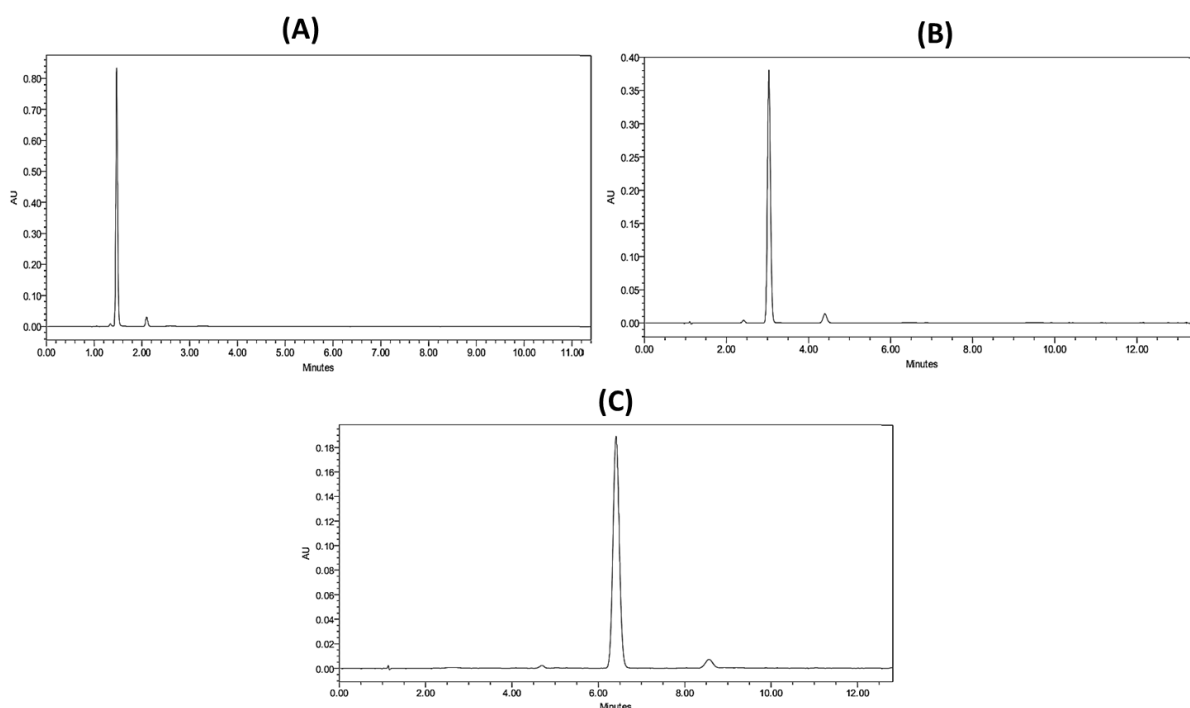


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Tendo em vista que as diferentes proporções de ACN: H_2O avaliadas como fase móvel não produziram bons resultados com a coluna C18 e com a coluna de fenil, uma outra composição de fase móvel foi proposta com o emprego de tampão acetato de amônio 0,1M (pH 5,7) e acetonitrila (proporções de 60:40, 70:30 e 75:25). Nesse contexto, vale ressaltar que fases móveis com água são mais indicadas para compostos neutros, ao passo que fases móveis

constituídas por tampões aquosos são indicadas para compostos ionizáveis (como é o caso do MPS) (Moldoveanu; David, 2025b). Isso é explicado pelo fato de os tampões serem capazes de manter o grau de ionização das moléculas, o que evita a formação de picos com caudas (Djajić et al., 2022). Como pode-se observar na Figura 13, a utilização da fase móvel composta de tampão e ACN, em conjunto com o emprego da coluna C18, originou picos simétricos e com boa resolução.

Figura 13 – Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (300 µg/mL) com diferentes proporções de fase móvel (tampão acetato de amônio pH 5,7 a 0,1M e ACN). (A) fase móvel composta por 60:40 de tampão:ACN; (B) fase móvel composta por 70:30 de tampão:ACN; (C) fase móvel composta por 75:25 de tampão:ACN. Análises realizadas com coluna C18



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

No entanto, foi preciso adequar a proporção entre os dois constituintes da fase móvel, visto que nas proporções de 60:40 e 70:30 (tampão:ACN) o MPS eluiu rapidamente, isto é, próximo do volume morto (assim como aconteceu com a fase móvel constituída de água e ACN). Além disso, a proporção de 60:40 gerou um pico duplo. Ao aplicar a proporção de 75:25, obteve-se um pico simétrico, com boa resolução, sem caudas, fronteiras e alargamentos. Ademais, o tempo de retenção do MPS se mostrou adequado por não ficar próximo do volume morto. Desse modo, a fase móvel formada por tampão acetato de amônio 0,1M (pH 5,7) e ACN, na

proporção de 75:25, respectivamente, foi a escolhida para realizar a identificação e quantificação da MPD nas nanopartículas (Figura 13C).

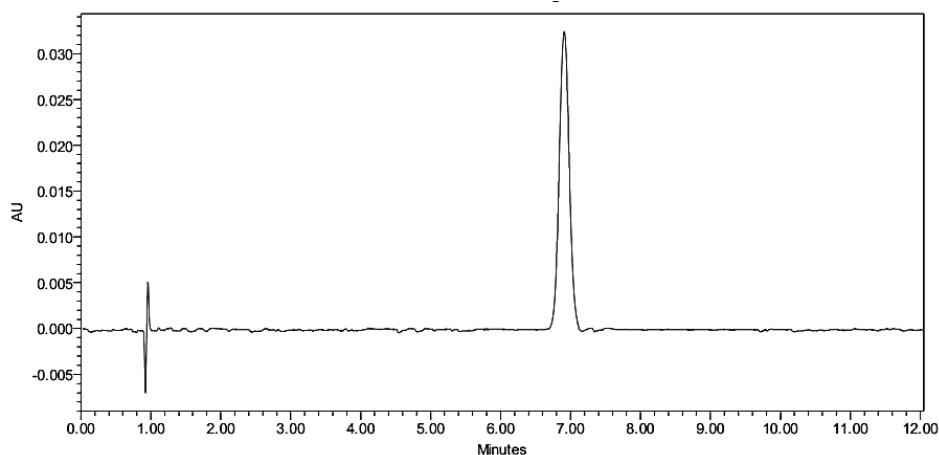
Durante a adequação da proporção da fase móvel composta por tampão e ACN, também foi necessário ajustar o fluxo da fase móvel, o forno de aquecimento da coluna e o volume de injeção da amostra. Para os dois IFAs empregados neste trabalho (MPS e MPD), o fluxo de fase móvel correspondente a 1,5 mL/min e a temperatura do forno da coluna igual a 50 °C gerou picos bem definidos. As outras condições testadas em relação ao fluxo e à temperatura produziram picos alargados, geralmente com cauda e/ou frente.

Com relação ao volume de injeção da amostra, dois parâmetros distintos precisaram ser definidos para MPS e MPD: 10 µL para MPS e 40 µL para MPD. Para o MPS, apenas 10 µL foram suficientes para gerar uma linha de base adequada, além de um pico simétrico e com boa resolução, inclusive para concentrações baixas das soluções padrão. Já para o MPD, volumes inferiores a 40 µL produziram picos simétricos e com boa resolução, porém a linha de base ficou com muitos ruídos (Figura 14).

É importante ressaltar que o MPS foi utilizado para iniciar os testes em laboratório e realizar a otimização do método analítico. Após definir a coluna cromatográfica, a composição da fase móvel, o fluxo da fase móvel e a temperatura do forno de aquecimento da coluna através dos testes realizados com o MPS, essas condições foram aplicadas à MPD (base livre) e também se mostraram adequadas. Isto é, ao utilizar os parâmetros definidos com o MPS para a análise da MPD, foram obtidos picos cromatográficos simétricos, bem definidos e sem distorções. Diante disso, fez-se necessário adequar, individualmente, somente o volume de injeção das amostras (10 µL para MPS e 40 µL para MPD).

Figura 14 – Cromatograma referente ao padrão de MPD com volume de injeção igual a 20 μL , fase móvel tampão acetato de amônio:ACN (75:25), fluxo da fase móvel de 1,5 mL/min e temperatura do forno de aquecimento da coluna igual a 50 °C. Análise realizada com coluna

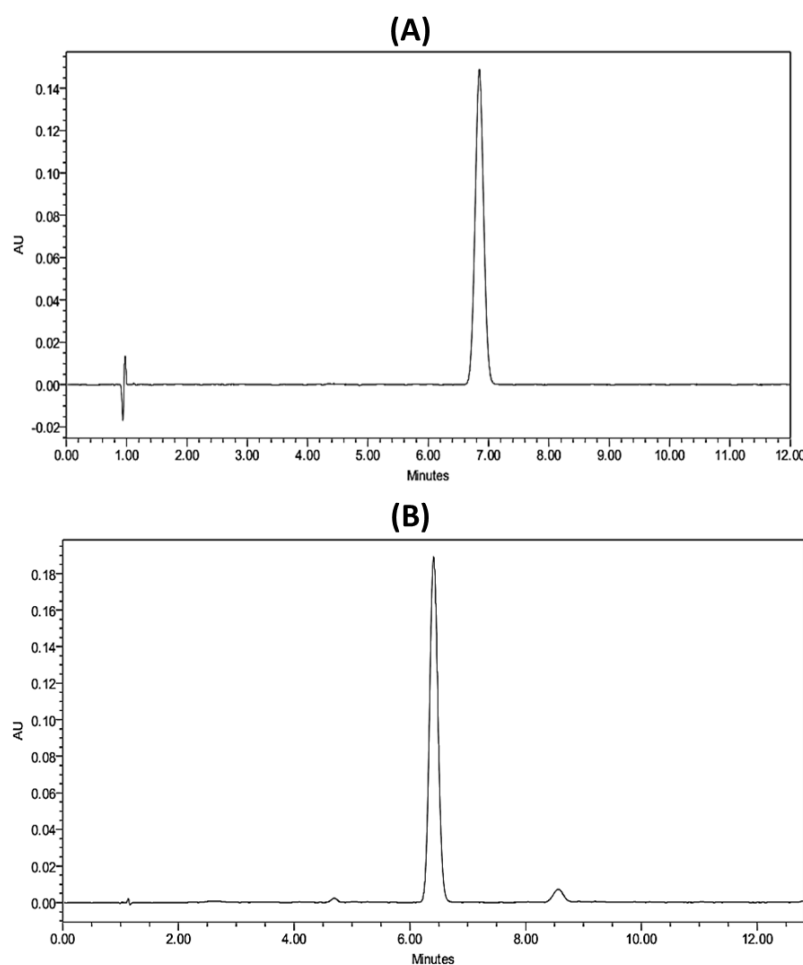
C18



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A partir de todos os experimentos descritos anteriormente, foi possível definir as condições cromatográficas finais para a análise de MPS e MPD por CLAE (Figura 15). Em ambas, é possível notar que os picos cromatográficos são simétricos, bem definidos e não possuem alargamento, cauda, frente e outras distorções. Os parâmetros finais definidos foram: coluna C18, eluição isocrática com fase móvel composta por tampão acetato de amônio:ACN (75:25), fluxo da fase móvel de 1,5 mL/min, temperatura do forno de aquecimento da coluna igual a 50 °C e detecção dos picos em 244 nm. O volume de injeção para MPD corresponde a 40 μL e para MPS corresponde a 10 μL .

Figura 15 – Cromatogramas referentes aos padrões de MPD e MPS (300 µg/mL) analisados nas condições finais determinadas, sendo (A) MPD e (B) MPS



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Como já descrito, a gelificação iônica é o método mais comumente empregado para o preparo de nanopartículas de QT, utilizando contra-íons de carga oposta para promover o entrecruzamento das cadeias poliméricas. O tipo de contra-íon influencia diretamente as características físico-químicas das nanopartículas e, alguns fármacos, ao se ionizarem negativamente em meio aquoso, podem atuar como reticulantes, favorecendo a interação com a QT e potencializando a eficiência de encapsulação (Cho et al., 2024; Lawall Werneck Cerqueira et al., 2020; Zacaron et al., 2023). Assim, nesta etapa do trabalho, investigamos: (1) a influência do tipo de reticulante nas características físico-químicas das nanopartículas, utilizando o fármaco na forma de succinato sódico como agente de reticulação e comparando-o com um reticulante clássico (TPP); e (2) se diferentes formas do fármaco — a base livre, mais

hidrofóbica, e o sal solúvel (succinato sódico) — impactariam nas propriedades das nanopartículas, especialmente na eficiência de encapsulação. Os resultados obtidos são apresentados abaixo.

5.2.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHm), Índice de Polidispersividade (PdI) e Potencial Zeta (PZ)

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados de DHm, PdI e PZ para as nanopartículas de QT brancas (NQ-TPP) e para as três formulações de nanopartículas de QT desenvolvidas, empregando-se MPD ou MPS (NQ-TPP-MPD, NQ-TPP-MPS e NQ-MPS).

Tabela 1 – Resultados* das análises de DHm, PdI e PZ para as nanopartículas de QT brancas e para as nanopartículas de QT contendo MPS e MPD

Formulação	DHm (nm)	PdI	PZ (mV)
NQ-TPP	99,01 ± 1,1	0,25 ± 0,013	+24,7 ± 1,40
NQ-TPP-MPD	107,12 ± 5,3	0,25 ± 0,006	+19,6 ± 1,35
NQ-TPP-MPS	106,07 ± 3,3	0,41 ± 0,011	+20,8 ± 1,13
NQ-MPS	483,60 ± 83,7	0,59 ± 0,052	+20,9 ± 1,52

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

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi usada neste trabalho para determinar o tamanho das nanopartículas nas suspensões coloidais. Comumente, essa técnica tem sido usada para medir o tamanho das partículas de amostras coloidais em suspensão, para estudar a estabilidade de formulações e para detectar a presença de agregação ou aglomeração. O DLS mede o diâmetro hidrodinâmico médio (DHm) das partículas através da dispersão de luz de um laser que passa pela suspensão coloidal e analisa a modulação da intensidade da luz dispersa em função do tempo. Assim, o movimento browniano das partículas individuais é convertido em tamanho de partícula por meio de softwares incorporados nos equipamentos, os quais utilizam a equação de Stokes Einstein (Raval et al., 2019).

Com relação aos resultados obtidos de DHm, é possível observar que os dois tipos de nanopartículas de QT desenvolvidas com TPP (NQ-TPP-MPD e NQ-MPS) apresentaram tamanhos similares e inferiores às nanopartículas produzidas sem TPP (NQ-MPS). As NQ-

TPP-MPD e as NQ-TPP-MPS apresentaram DHm iguais a $107,12 \pm 5,3$ nm e $106,07 \pm 3,3$ nm, respectivamente. Já as NQ-MPS obtiveram DHm igual a $483,60 \pm 83,7$ nm. Esses resultados demonstram que a utilização do TPP é um fator importante para controlar o DHm das nanopartículas de QT ao final do processo. É possível que, devido a esse contra-íon apresentar elevada densidade de carga no pH utilizado para sua solubilização (pH 9,0), haja uma interação mais eficiente com os sítios protonados da QT. Essa interação pode favorecer o processo de reticulação iônica, resultando na formação de partículas menores e mais estáveis (Pan et al., 2020). Em contraste, o MPS possui apenas um grupamento funcional capaz de ionizar em solução (Figura 2), o que limita sua capacidade de interação com a QT. Essa limitação pode comprometer a eficiência do processo de *crosslinking*, favorecendo a formação de aglomerados e resultando em sistemas particulados com menor homogeneidade de tamanho, o que fica evidente a partir do valor de desvio padrão obtido.

Além do DHm, o índice de polidispersividade (PDI) é outro parâmetro importante que descreve a largura ou a dispersão da distribuição do tamanho das partículas e tem relação direta com a estabilidade das partículas. Nesse sentido, é consenso na literatura que valores de PDI menores que 0,3 são característicos de amostras monodispersas (Tavares et al., 2020). Entretanto, alguns autores consideram adequados valores abaixo de 0,4 (Ta et al., 2021; Valencia et al., 2021), o que foi observado para ambas as formulações preparadas com o TPP. No entanto, um maior valor foi obtido para as NQ-TPP-MPS. Nesse contexto, sugerimos que o maior valor de PDI observado para essas nanopartículas possa ser atribuído à possível competição entre o TPP e o MPS pelos sítios protonados da QT. Essa competição pode comprometer a uniformidade do processo de reticulação iônica, resultando na formação de partículas com maior heterogeneidade de tamanho. Por sua vez, para as NQ-MPS, o elevado valor de PDI pode refletir a maior dificuldade de reticulação do fármaco com os sítios protonados da QT, conforme discutido anteriormente, resultando em partículas com maior heterogeneidade de tamanho.

Finalmente, o PZ consiste na medida da carga superficial de uma nanopartícula. Quando uma nanopartícula está localizada em uma solução iônica, a superfície carregada é cercada por uma dupla camada elétrica. Uma camada de íons com carga oposta à da superfície da nanopartícula constitui a camada de Stern. A segunda camada fica sobre a camada de Stern e é composta de contra-íons com carga oposta, que permanecem contra o plano de deslizamento. O PZ pode ser determinado pela diferença entre o potencial da superfície da nanopartícula e a solução na qual a nanopartícula reside, resultante da alteração da velocidade da partícula que se

move em direção a um eletrodo, o que promove a variação do campo elétrico em toda a amostra (Raval et al., 2019).

O PZ reflete a carga de superfície das partículas e apresenta influência direta na interação biológica, bem como na estabilidade coloidal das nanopartículas (Raval et al., 2019). A literatura aponta que nanopartículas que apresentem $PZ \geq \pm 30$ mV são altamente estáveis, uma vez que, devido à repulsão eletrostática, não há a tendência à agregação das partículas em suspensão. No entanto, nanopartículas cujo PZ esteja compreendido entre ± 20 -30 mV podem apresentar estabilidade satisfatória (Bhattacharjee, 2016), o que se aplica às formulações desenvolvidas em nosso trabalho. Nesse caso, os valores de PZ positivos são devido à protonação dos grupos amino da QT em meio ácido e estão condizentes com os obtidos em outros estudos da literatura (Dos Santos et al., 2022; Huang et al., 2023; Valverde-Fraga et al., 2023). Por fim, é importante ressaltar que as nanopartículas também podem ser estabilizadas do ponto de vista coloidal por meio de impedimento estérico ou uma combinação desse impedimento com a repulsão eletrostática (Mudalige et al., 2019).

Na literatura científica, é possível encontrar estudos envolvendo o desenvolvimento de nanopartículas de QT com resultados similares aos que foram alcançados neste trabalho. No trabalho desenvolvido por Ding et al. (2022), por exemplo, foram produzidas nanopartículas de QT-TPP por meio do método de gelificação iônica visando a encapsulação da MPD para administração direcionada ao pulmão. O DHm das nanopartículas produzidas foi de aproximadamente 120,6 nm, com PdI abaixo de 0,2 e PZ de +14,5 mV (Ding et al., 2022).

Ahmadi et al. (2018), por sua vez, desenvolveram nanopartículas de QT-TPP carregadas com óleo essencial de *Saturega hortensis* pelo método de gelificação iônica e obtiveram DHm de 85 nm para as nanopartículas brancas (NQ-TPP), com PdI de 0,37. Já as nanopartículas de QT-TPP contendo *Saturega hortensis* apresentaram DHm de 192,1 nm e PdI igual a 0,22 (Ahmadi et al., 2018).

No estudo publicado por Wu et al. (2017), os autores prepararam nanopartículas de QT-TPP através de reticulação iônica para encapsular resveratrol. Para as nanopartículas brancas (NQ-TPP), foram alcançados os seguintes resultados: DHm igual a 105 nm, PdI igual a 0,221 e PZ igual a +22,7 mV. Já para as NQ-TPP carregadas com resveratrol, os pesquisadores testaram duas concentrações de resveratrol durante o preparo das nanopartículas: 1 mg/mL (R-CS-1) e 5 mg/mL (R-CS-5). Assim, foram obtidos resultados de DHm iguais a 172 nm (R-CS-1) e 217 nm (R-CS-5), PdI iguais a 0,256 (R-CS-1) e 0,262 (R-CS-5) e PZ iguais a +38,7 mV (R-CS-1) e +58,8 mV (R-CS-5) (Wu et al., 2017).

Dos Santos et al. (2022) desenvolveram nanopartículas de QT-TPP por meio de gelificação iônica para a incorporação de 5-fluorouracil. Nesse estudo, os autores avaliaram a influência da modificação do pH do meio nas características físico-químicas das nanopartículas. Ao incorporar o fármaco em uma solução de QT com pH 4,5, foram formadas nanopartículas com DHm entre 122-149 nm e PDI entre 0,240 e 0,350. Em contrapartida, ao incorporar o fármaco em uma solução de QT com pH 5,5, foram formadas nanopartículas com DHm entre 262-301 nm e PDI entre 0,680 e 0,890. Já o PZ das nanopartículas produzidas em pH 4,5 variou de +21,6 a +35,3 mV, enquanto o PZ das nanopartículas produzidas em pH 5,5 variou de +14,1 a +21,6 mV (Dos Santos et al., 2022).

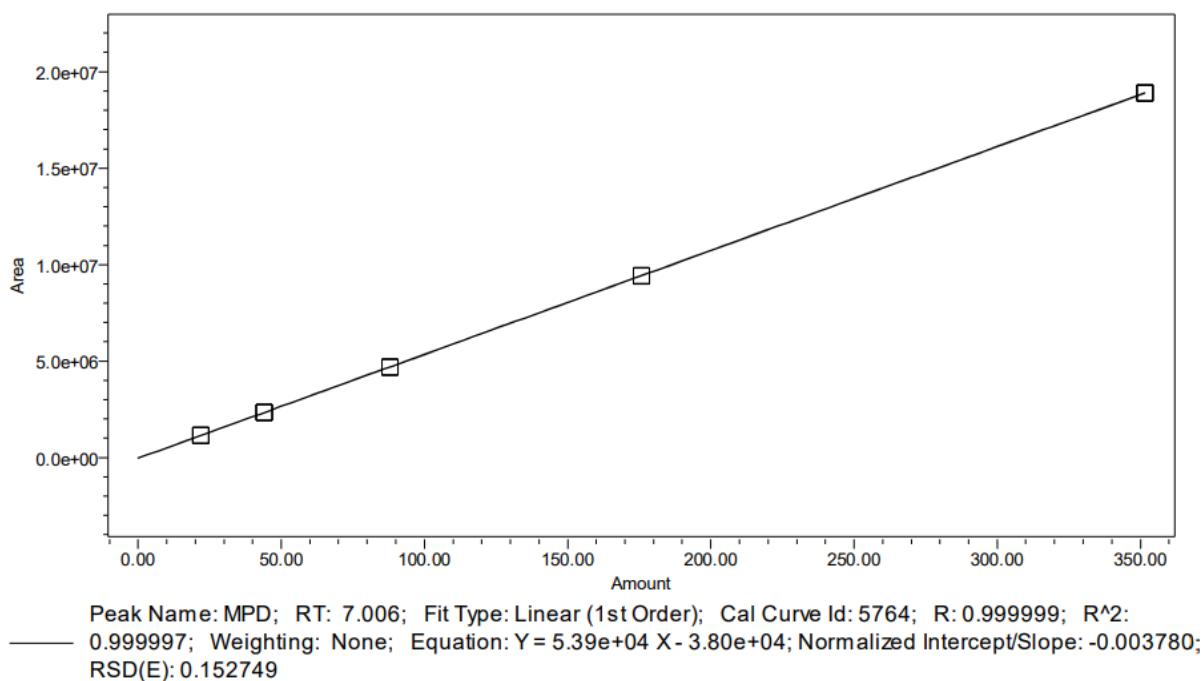
Huang et al. (2023) produziram nanopartículas de QT, através de gelificação iônica, com ciclosporina A para a administração pulmonar profunda do IFA. As nanoestruturas desenvolvidas apresentaram DHm entre 135 nm e 273 nm, PDI entre 0,14 e 0,26 e PZ entre +9,70 e +44,30 mV. As condições ótimas de produção das nanopartículas produziram DHm de $224,90 \pm 0,97$ nm, PDI de $0,14 \pm 0,06$ e PZ de $24,10 \pm 0,10$ mV (Huang et al., 2023).

Por fim, na pesquisa publicada por Deshpande et al. (2017), foram desenvolvidas nanopartículas de QT-TPP, por gelificação iônica, complexadas com zinco. Os autores obtiveram nanopartículas com DHm superior em comparação aos estudos mencionados anteriormente, resultados estes que se aproximam mais dos valores obtidos para as NQ-MPS. Os resultados de DHm, PDI e PZ das nanopartículas de QT-TPP complexadas com zinco corresponderam a 325 nm, 0,280 e +32,2 mV, respectivamente (Deshpande et al., 2017).

5.2.2 Eficiência de Encapsulação (EE)

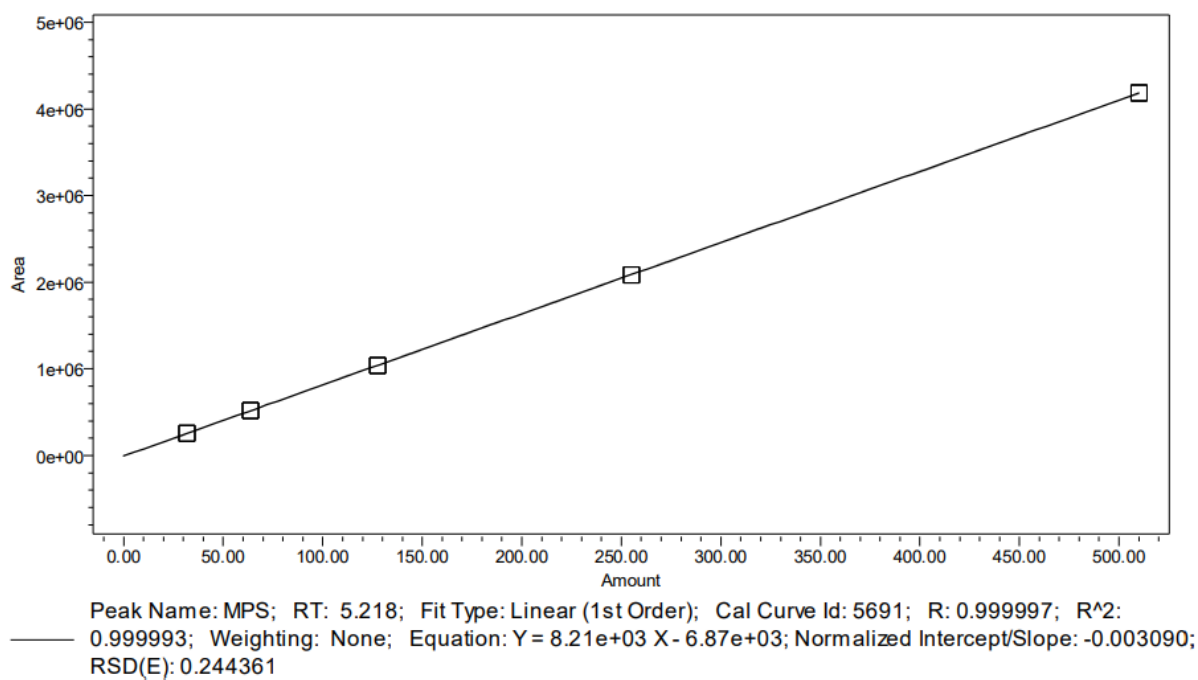
Como mencionado na seção 4.2.3.2, a determinação da EE da MPD e do MPS nas nanopartículas de QT foi realizada de maneira indireta, por meio da técnica de CLAE. Para isso, foi necessário construir duas curvas analíticas, uma para cada IFA, as quais podem ser visualizadas abaixo (Figuras 16 e 17).

Figura 16 – Curva analítica utilizada para calcular a EE das nanopartículas de QT com MPD (concentrações de 21,875 µg/mL; 43,750 µg/mL; 87,500 µg/mL; 175 µg/mL; 350 µg/mL)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

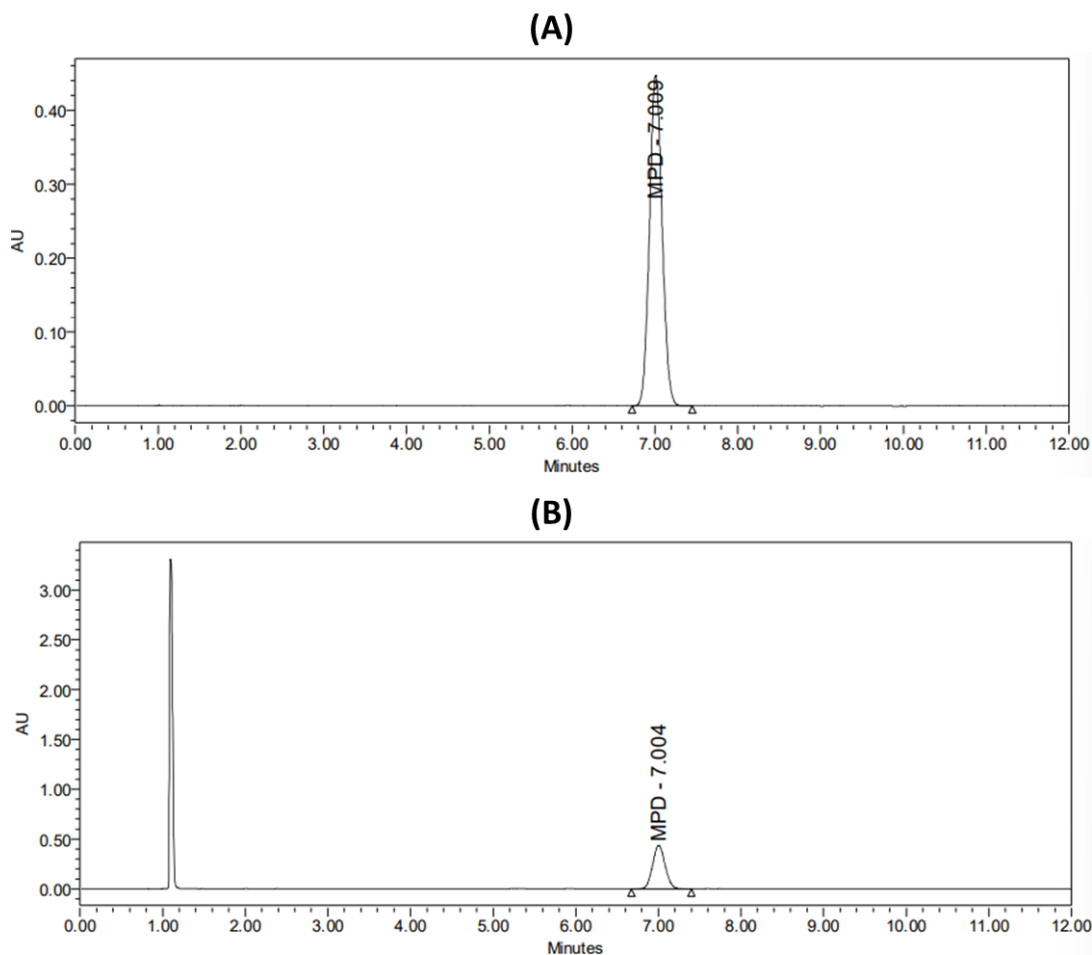
Figura 17 – Curva analítica utilizada para calcular a EE das nanopartículas de QT com MPS (concentrações de 31,250 µg/mL; 62,500 µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Na Figura 18, estão apresentados os cromatogramas referentes ao padrão de MPD e ao sobrenadante das NQ-QT-MPD.

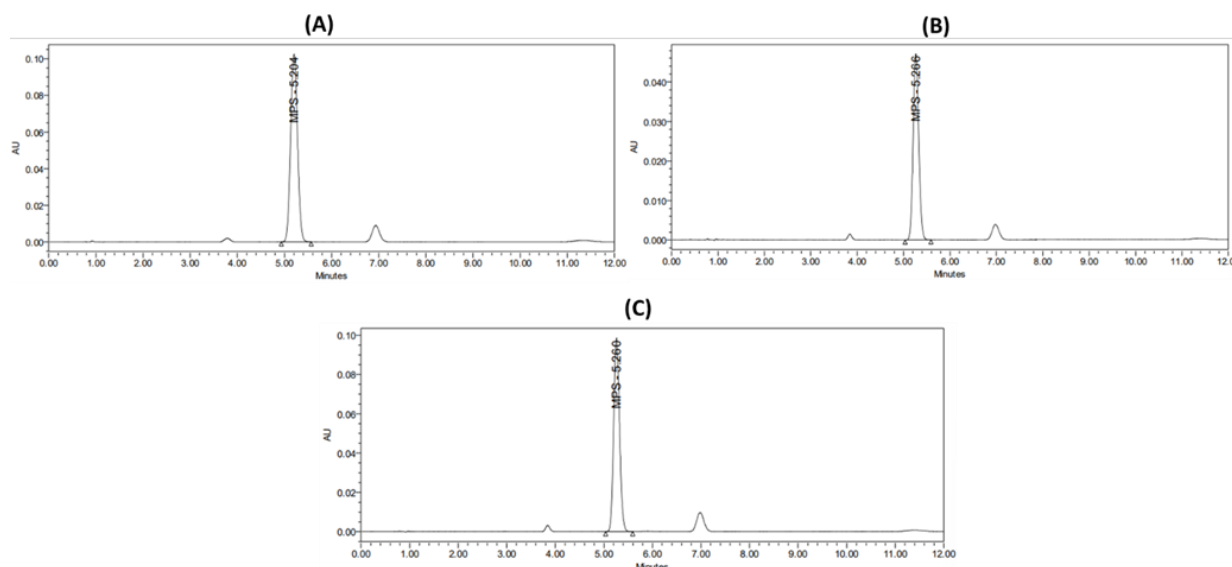
Figura 18 – Cromatogramas referentes ao padrão de MPD (A) no ponto central da curva analítica (87,5 µg/mL) e (B) sobrenadante das NP-QT-MPD



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Já na Figura 19, estão apresentados os cromatogramas referentes ao padrão de MPS e aos sobrenadantes das NQ-QT-MPS e das NQ-MPS.

Figura 19 – Cromatogramas referentes ao padrão de MPS (A) no ponto central da curva analítica (125 µg/mL); (B) sobrenadante das NP-QT-MPS e (C) sobrenadante das NP-MPS



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados de EE para as três formulações de nanopartículas de QT desenvolvidas, empregando-se MPD ou MPS.

Tabela 2 – Resultados* das análises de EE para as nanopartículas de QT contendo MPS e MPD

Formulação	EE (%)
NQ-TPP-MPD	23,68 ± 0,7
NQ-TPP-MPS	38,74 ± 6,4
NQ-MPS	38,26 ± 1,4

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

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Ao observar os resultados apresentados acima, é possível constatar que a EE do IFA nas nanopartículas foi mais baixa na formulação preparada com MPD, com cerca de 23% de encapsulação do IFA. Já as formulações desenvolvidas com MPS, com e sem TTP, apresentaram EE superiores (cerca de 38%). A partir desses achados, fica evidente que a forma do fármaco influencia na capacidade de encapsulação. Nesse contexto, sugerimos que a menor EE verificada para a MPD esteja relacionada ao caráter altamente hidrofóbico do fármaco na

forma base, o que resulta em baixa miscibilidade e interação limitada com a matriz de QT (Souto; Severino; Santana, 2012). Por outro lado, no caso da forma solúvel — que, como mencionado anteriormente, encontra-se ionizada em solução — há uma maior interação química com a matriz de QT, predominantemente por meio de interações eletrostáticas, o que favorece uma maior carga de fármaco nas nanopartículas, independentemente da presença de TPP. No entanto, devido à elevada hidrossolubilidade, a MPS tende a se difundir para o meio aquoso externo (Zhao et al., 2021). Vale pontuar que, para as NQ-TPP-MPS, os resultados de EE obtidos neste trabalho (38,74%) ficaram próximos aos resultados obtidos em um estudo publicado na literatura científica, no qual os autores também realizaram a encapsulação do MPS em nanopartículas de QT-TPP e obtiveram EE igual a 43,83% (Ding et al., 2022). Apesar das diferenças observadas entre as formulações, todos os resultados apresentaram EE abaixo do que consideramos adequado (50%).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados de caracterização físico-química obtidos para as quatro formulações de nanopartículas de QT desenvolvidas neste trabalho, foi possível concluir que a presença do TPP contribuiu significativamente para a redução do DHm das nanopartículas, enquanto sua ausência resultou em partículas maiores. Juntamente a isso, os valores de PDI evidenciaram a importância da utilização do TPP como contra-íon para promover uma maior homogeneidade no tamanho das nanopartículas.

Já o PZ das formulações variou entre +19 mV e +24 mV, valores considerados indicativos de estabilidade coloidal. Apesar disso, é importante que sejam realizados estudos complementares de estabilidade ao longo do tempo para confirmar a viabilidade das formulações em condições reais de armazenamento.

Em relação aos resultados de EE obtidos, foi possível constatar que as formulações contendo MPS, com ou sem TPP, apresentaram EE superiores em relação àquelas contendo MPD, o que indica que a melhor solubilidade em meio aquoso favorece a interação do fármaco com a matriz polimérica de QT. Apesar das EEs obtidas estarem aquém do ideal para sistemas nanoestruturados (geralmente $\geq 50\%$), os resultados obtidos, especialmente para a formulação NQ-TPP-MPS, demonstram o potencial promissor da abordagem adotada neste trabalho.

Como perspectivas futuras, destaca-se a importância de padronizar o processo de secagem das nanopartículas, a fim de obter formulações sólidas adequadas à administração inalatória. Sugere-se, ainda, a realização de estudos de estabilidade físico-química, perfil de liberação *in vitro* e, sobretudo, ensaios de eficácia terapêutica em modelos biológicos, de modo a avançar na consolidação dessa alternativa terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, Ladan *et al.* **Comparing efficacy and safety of tocilizumab and methylprednisolone in the treatment of patients with severe COVID-19.** International Immunopharmacology, v. 107, p. 108689, jun. 2022.
- ABD ELRAHMAN, Abeer A.; MANSOUR, Fotouh R. **Targeted magnetic iron oxide nanoparticles: Preparation, functionalization and biomedical application.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 52, p. 702–712, ago. 2019.
- ABDELGAWAD, Abdelrahman M.; HUDSON, Samuel M. **Chitosan nanoparticles: Polyphosphates cross-linking and protein delivery properties.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 136, p. 133–142, set. 2019.
- AHMAD, Mohammad Zaki *et al.* **Nanoscale Topical Pharmacotherapy in Management of Psoriasis: Contemporary Research and Scope.** Journal of Functional Biomaterials, v. 14, n. 1, p. 19, 29 dez. 2022.
- AHMADI, Zeinab *et al.* **Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 161, p. 111–119, out. 2018.
- ALGHAREEB, Salah *et al.* **Chitosan nanoparticles for nasal drug delivery.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 105, p. 106623, mar. 2025.
- ALI, Akbar; AHMED, Shakeel. **A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 109, p. 273–286, abr. 2018.
- AMOABEDINY, Ghasem *et al.* **Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review.** International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, v. 67, n. 6, p. 383–400, 13 abr. 2018.
- ANSARI, Mohammad Javed; ALSHAHRANI, Saad M. **Nano-encapsulation and characterization of baricitinib using poly-lactic-glycolic acid co-polymer.** Saudi Pharmaceutical Journal, v. 27, n. 4, p. 491–501, maio 2019.
- ARANDA-BARRADAS, María E. *et al.* **Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery.** Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, v. 4, p. 100228, dez. 2022.
- ARDEAN, Cristina *et al.* **Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization.** International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 14, p. 7449, 12 jul. 2021.

- AWASTHI, Rajendra; BHUSHAN, Bharat; KULKARNI, Giriraj T. **Concepts of nanotechnology in nanomedicine: From discovery to applications.** *In: Targeting Chronic Inflammatory Lung Diseases Using Advanced Drug Delivery Systems. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 171–209.*
- BALAKRISHNAN, C.; PRASAD, K. R. S.; SURESH BABU, K. **Development and Validation of Stability Indicating Mass Compatible RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Assay and Related Substances in Methylprednisolone Acetate Injectable Suspension.** *Asian Journal of Chemistry*, v. 34, n. 10, p. 2561–2566, 19 set. 2022.
- BALDINO, Lucia *et al.* **Complete glutaraldehyde elimination during chitosan hydrogel drying by SC-CO₂ processing.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 103, p. 70–76, ago. 2015.
- BAŞARAN, Ebru *et al.* **Chitosan nanoparticles for ocular delivery of cyclosporine A.** *Journal of Microencapsulation*, v. 31, n. 1, p. 49–57, 8 fev. 2014.
- BERGER, J. *et al.* **Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, n. 2, p. 197–206, jan. 2005.
- BHARDWAJ, Harish; JANGDE, Rajendra Kumar. **Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications.** *Next Nanotechnology*, v. 2, p. 100013, jun. 2023.
- BHATTACHARJEE, Sourav. **DLS and zeta potential – What they are and what they are not?** *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.
- BISLA, Amarjeet; HONPARKHE, Mrigank; SRIVASTAVA, Neeraj. **A review on applications and toxicities of metallic nanoparticles in mammalian semen biology.** *Andrologia*, v. 54, n. 11, 14 dez. 2022.
- BORGES, Olga *et al.* **Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 299, n. 1–2, p. 155–166, ago. 2005.
- BORRESEN, Stina Willemoes *et al.* **Approach to the Patient With Glucocorticoid-induced Adrenal Insufficiency.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 107, n. 7, p. 2065–2076, 16 jun. 2022.
- BRUSCOLI, Stefano *et al.* **Glucocorticoids and COVID-19.** *Pharmacological Research*, v. 185, p. 106511, nov. 2022.
- BYUN, Sung Mi *et al.* **Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells.** *International Journal of Food Science & Technology*, v. 48, n. 1, p. 136–142, 11 jan. 2013.
- CALVO, P. *et al.* **Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 63, n. 1, p. 125–132, 3 jan. 1997.

CHASTAIN, Daniel B. *et al.* **Unintended Consequences: Risk of Opportunistic Infections Associated With Long-term Glucocorticoid Therapies in Adults.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 78, n. 4, p. e37–e56, 10 abr. 2024.

CHAUDHARY, Kabi Raj; KUJUR, Sima; SINGH, Karanvir. **Recent advances of nanotechnology in COVID 19: A critical review and future perspective.** *OpenNanoElsevier Inc.*, 1 jan. 2023.

CHELLATHURAI, Melbha Starlin *et al.* **Self-assembled chitosan-insulin oral nanoparticles — A critical perspective review.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 243, p. 125125, jul. 2023.

CHEN, Nanshan *et al.* **Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study.** *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 507–513, fev. 2020.

CHENG, Zhe *et al.* **Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives.** *Journal of Hematology & Oncology*, v. 14, n. 1, p. 85, 31 dez. 2021.

CHO, Do-Yeon *et al.* **Chitosan-based crosslinking for controlled topical drug release in rhinosinusitis.** *International Forum of Allergy & Rhinology*, v. 14, n. 11, p. 1802–1805, 11 nov. 2024.

CORRAL-GUDINO, Luis *et al.* **Methylprednisolone in adults hospitalized with COVID-19 pneumonia.** *Wiener klinische Wochenschrift*, v. 133, n. 7–8, p. 303–311, 3 abr. 2021.

CRUCHO, Carina I. C. **Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine.** *ChemMedChem*, v. 10, n. 1, p. 24–38, 16 jan. 2015.

CRUCHO, Carina I. C.; BARROS, Maria Teresa. **Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 80, p. 771–784, nov. 2017.

DASTENAE, Zahra Habibi *et al.* **Comparison of the effect of intravenous dexamethasone and methylprednisolone on the treatment of hospitalized patients with COVID-19: a randomized clinical trial.** *International Journal of Infectious Diseases*, v. 122, p. 659–664, set. 2022.

DE ALCUBIERRE, D. *et al.* **Glucocorticoids and cognitive function: a walkthrough in endogenous and exogenous alterations.** *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 46, n. 10, p. 1961–1982, 14 abr. 2023.

DE MARCO, Iolanda. **Supercritical Fluids and Nanoparticles in Cancer Therapy.** *Micromachines*, v. 13, n. 9, p. 1449, 1 set. 2022.

DESAI, Kashappa Goud. **Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances.** *Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 33, n. 2, p. 107–158, 2016.

DESAI, Nimeet *et al.* **Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications.** *Pharmaceutics*, v. 15, n. 4, p. 1313, 21 abr. 2023.

DESHPANDE, Paresh *et al.* **Zinc complexed chitosan/TPP nanoparticles:** A promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application. *Carbohydrate Polymers*, v. 165, p. 394–401, jun. 2017.

DING, Ruifang *et al.* **One-stop solution for wide polar range compounds:** Preparation and application of quaternary ammonium salt molecular cage stationary phase. *Talanta*, v. 292, p. 127962, set. 2025.

DING, Yaning *et al.* **RBC-hitchhiking chitosan nanoparticles loading methylprednisolone for lung-targeting delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 341, p. 702–715, jan. 2022.

DJAJIĆ, Nevena *et al.* **Modified aqueous mobile phases:** A way to improve retention behavior of active pharmaceutical compounds and their impurities in liquid chromatography. *Journal of Chromatography Open*, v. 2, p. 100023, nov. 2022.

DODERO, Andrea *et al.* **Chitosan-based electrospun membranes:** Effects of solution viscosity, coagulant and crosslinker. *Carbohydrate Polymers*, v. 235, p. 115976, maio 2020.

DOS SANTOS, Aline Martins *et al.* **Understanding the role of electrostatic interactions on the association of 5-fluorouracil to chitosan-TPP nanoparticles.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 640, p. 128417, maio 2022.

EDALATIFARD, Maryam *et al.* **Intravenous methylprednisolone pulse as a treatment for hospitalised severe COVID-19 patients:** results from a randomised controlled clinical trial. *European Respiratory Journal*, v. 56, n. 6, p. 2002808, dez. 2020.

EL-SAADONY, Mohamed T. *et al.* **Chitosan, derivatives, and its nanoparticles:** Preparation, physicochemical properties, biological activities, and biomedical applications – A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 313, p. 142832, jun. 2025.

EL-SABER BATIHA, Gaber *et al.* **COVID-19 and corticosteroids:** a narrative review. *Inflammopharmacology*, v. 30, n. 4, p. 1189–1205, 13 ago. 2022.

EL-SHABOURI, M. H. **Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, n. 1–2, p. 101–108, dez. 2002.

ESTEVINHO, Berta Maria Abreu Nogueiro *et al.* **Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry.** *Journal of Microencapsulation*, v. 30, n. 6, p. 571–579, 18 set. 2013.

FACCHINATTO, William Marcondes *et al.* **Evaluation of chitosan crystallinity:** A high-resolution solid-state NMR spectroscopy approach. *Carbohydrate Polymers*, v. 250, p. 116891, dez. 2020.

FEI, Qinqin *et al.* **Pulmonary drug delivery for acute respiratory distress syndrome.** *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 79, p. 102196, abr. 2023.

FENG, Xiaoying; JIA, Ping; ZHANG, Dingding. **Nanocarrier drug delivery system: promising platform for targeted depression therapy.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, 25 jul. 2024.

FERNÁNDEZ-PAZ, Estefanía *et al.* **Dry powders containing chitosan-based nanocapsules for pulmonary administration: Adjustment of spray-drying process and in vitro evaluation in A549 cells.** *Powder Technology*, v. 399, p. 117149, fev. 2022.

FEUERSTEIN, Joseph D. *et al.* **Appropriate use and complications of corticosteroids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review.** 2025.

FOSTER, Leslie John Ray *et al.* **Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties.** *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0135153, 25 ago. 2015.

FRIED, John H.; ARTH, Glen E.; SARETT, Lewis H. **Alkylated Adrenal Hormones. The Synthesis of 6 α -Methyl Cortical Steroids.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 81, n. 5, p. 1235–1239, 1 mar. 1959.

GARG, Unnati *et al.* **Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 9, n. 2, p. 195–204, 1 jun. 2019.

GRENHA, Ana. **Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods.** *Journal of Drug Targeting*, v. 20, n. 4, p. 291–300, 2 maio 2012.

GUPTA, Jayesh; QUADROS, Mural; MOMIN, Munira. **Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis and multifaceted functionalization for controlled drug delivery.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 81, p. 104305, mar. 2023.

GUTIÉRREZ, L. *et al.* **Nanotechnology in Drug Discovery and Development.** *In: Comprehensive Medicinal Chemistry III. [S.l.]*: Elsevier, 2017. p. 264–295.

HABEEB, Mohammad *et al.* **Strategies of nanomedicine for targeting the signaling pathways of Colorectal cancer.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 84, p. 104487, jun. 2023.

HAMMAN, Josias H. **Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems.** *Marine Drugs*, v. 8, n. 4, p. 1305–1322, 19 abr. 2010.

HEJJAJI, Ezzeddin M. A.; SMITH, Alan M.; MORRIS, Gordon A. **Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different chitosan to tripolyphosphate (CS:TPP) ratios.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 1610–1617, dez. 2018.

HERDIANA, Yedi *et al.* **Drug Loading in Chitosan-Based Nanoparticles.** *Pharmaceutics*, v. 16, n. 8, p. 1043, 6 ago. 2024.

HITI, Luka *et al.* **The immunopathogenesis of a cytokine storm: The key mechanisms underlying severe COVID-19.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 82, p. 1–17, abr. 2025.

HONG, Shukun *et al.* **A systematic review and meta-analysis of glucocorticoids treatment in severe COVID-19: methylprednisolone versus dexamethasone.** BMC Infectious Diseases, v. 23, n. 1, p. 290, 5 maio 2023.

HUANG, Yongpeng *et al.* **Cyclosporine A-loaded chitosan extra-fine particles for deep pulmonary drug delivery: In vitro and in vivo evaluation.** Journal of Controlled Release, v. 362, p. 243–256, out. 2023.

ICHIKAWA, Hideki *et al.* **Nanoparticles for Neutron Capture Therapy of Cancer.** In: Nanotechnologies for the Life Sciences. [S.l.]: Wiley, 2003.

ISSAHAKU, Ibrahim; TETTEH, Isaac K.; TETTEH, Antonia Y. **Chitosan and chitosan derivatives: Recent advancements in production and applications in environmental remediation.** Environmental Advances, v. 11, p. 100351, abr. 2023.

IYER, Roshni; HSIA, Connie; NGUYEN, Kytai. **Nano-Therapeutics for the Lung: State-of-the-Art and Future Perspectives.** Current Pharmaceutical Design, v. 21, n. 36, p. 5233–5244, 2 nov. 2015.

JAFERNIK, Karolina *et al.* **Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems—A review.** Molecules, v. 28, n. 4, p. 1963, 18 fev. 2023.

JAKUBOWSKA, Ewelina *et al.* **Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent.** Food Hydrocolloids, v. 108, p. 106007, nov. 2020.

JALAL, Renas Rzgar *et al.* **Preparation of mucoadhesive methacrylated chitosan nanoparticles for delivery of ciprofloxacin.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 242, p. 124980, jul. 2023.

JAMKHANDE, Prasad Govindrao *et al.* **Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 53, p. 101174, out. 2019.

JARDIM, Katiúscia Vieira *et al.* **In vitro cytotoxic and antioxidant evaluation of quercetin loaded in ionic cross-linked chitosan nanoparticles.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 74, p. 103561, ago. 2022.

JERONIMO, Christiane Maria Prado *et al.* **Methylprednisolone as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19; Metcovid): A Randomized, Double-blind, Phase IIb, Placebo-controlled Trial.** Clinical Infectious Diseases, v. 72, n. 9, p. e373–e381, 4 maio 2021.

JIANG, Yao *et al.* **Determination of the Deacetylation Degree of Chitooligosaccharides.** Marine Drugs, v. 15, n. 11, p. 332, 25 out. 2017.

KAMAT, Vivek; BODAS, Dhananjay; PAKNIKAR, Kishore. **Chitosan nanoparticles synthesis caught in action using microdroplet reactions.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, p. 22260, 29 fev. 2016.

KAPADNIS, Gaurav *et al.* **Effect of degree of deacetylation on solubility of low-molecular-weight chitosan produced via enzymatic breakdown of chitosan.** Polymer International, v. 68, n. 6, p. 1054–1063, 20 jun. 2019.

KAŠPAR, Ondřej; JAKUBEC, Martin; ŠTĚPÁNEK, František. **Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles.** Powder Technology, v. 240, p. 31–40, maio 2013.

KHALID, Muhammad Yasir *et al.* **Recent advances in nanocellulose-based different biomaterials: types, properties, and emerging applications.** Journal of Materials Research and Technology, v. 14, p. 2601–2623, set. 2021.

KOLE, Eknath *et al.* **Nanotherapeutics for pulmonary drug delivery: An emerging approach to overcome respiratory diseases.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 81, p. 104261, mar. 2023.

LÄNGERICH, Jan; KRÄMER, Irene; KAHALY, George J. **Glucocorticoids in Graves' orbitopathy: mechanisms of action and clinical application.** Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, v. 11, 14 jan. 2020.

LAWALL WERNECK CERQUEIRA, Ana Flávia *et al.* **Influence of the xanthan gum as a crosslinking agent on the physicochemical properties of chitosan microparticles containing green coffee extract.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 29, p. 101782, out. 2020.

LEPELTIER, Elise; BOURGAUX, Claudie; COUVREUR, Patrick. **Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 71, p. 86–97, maio 2014.

LEVY, Elizabeth; REILLY, John P. **Pharmacologic Treatments in Acute Respiratory Failure.** Critical Care Clinics, v. 40, n. 2, p. 275–289, abr. 2024.

LI, Changyong *et al.* **Human Serum Albumin Based Nanodrug Delivery Systems: Recent Advances and Future Perspective.** Polymers, v. 15, n. 16, p. 3354, 10 ago. 2023.

LI, Huan *et al.* **Impact of corticosteroid therapy on outcomes of persons with SARS-CoV-2, SARS-CoV, or MERS-CoV infection: a systematic review and meta-analysis.** Leukemia, v. 34, n. 6, p. 1503–1511, 5 jun. 2020a.

LI, Wenwen; CAI, Guixin; ZHANG, Pudun. **A simple and rapid Fourier transform infrared method for the determination of the degree of acetyl substitution of cellulose nanocrystals.** Journal of Materials Science, v. 54, n. 10, p. 8047–8056, 22 maio 2019.

LI, Xiaowei *et al.* **Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19.** Journal of Pharmaceutical Analysis, v. 10, n. 2, p. 102–108, abr. 2020b.

LIU, Yuntao *et al.* **Preparation and characterization of chitosan films with three kinds of molecular weight for food packaging.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 155, p. 249–259, jul. 2020.

LUO, Yangchao; WANG, Qin. **Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 64, p. 353–367, mar. 2014.

LV, Jicheng *et al.* **Effect of Oral Methylprednisolone on Decline in Kidney Function or Kidney Failure in Patients With IgA Nephropathy.** *JAMA*, v. 327, n. 19, p. 1888, 17 maio 2022.

MADAWI, Eiman Abdalla *et al.* **Polymeric Nanoparticles as Tunable Nanocarriers for Targeted Delivery of Drugs to Skin Tissues for Treatment of Topical Skin Diseases.** *Pharmaceutics*, v. 15, n. 2, p. 657, 15 fev. 2023.

MAJUMDER, Joydeb; MINKO, Tamara. **Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19.** *The AAPS Journal*, v. 23, n. 1, p. 14, 5 jan. 2021.

MARQUES GONÇALVES, Melissa *et al.* **Negatively charged chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation for encapsulation of positively charged proteins.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 642, p. 123164, jul. 2023.

MATALQAH, Sina M. *et al.* **Chitosan Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System: A Review Article.** *Current Drug Targets*, v. 21, n. 15, p. 1613–1624, 27 nov. 2020.

MEHTA, Puja *et al.* **COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression.** *The Lancet*, v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, mar. 2020.

MINNETTI, Marianna *et al.* **Fixing the broken clock in adrenal disorders: focus on glucocorticoids and chronotherapy.** *Journal of Endocrinology*, v. 246, n. 2, p. R13–R31, ago. 2020.

MOLDOVEANU, Serban C.; DAVID, Victor. **Chromatographic columns in high-performance liquid chromatography.** *In: Method Development in Analytical HPLC. [S.l.]: Elsevier, 2025a. p. 301–354.*

MOLDOVEANU, Serban C.; DAVID, Victor. **Mobile phase and the role of solvents in high-performance liquid chromatography.** *In: Method Development in Analytical HPLC. [S.l.]: Elsevier, 2025b. p. 355–387.*

MONIER, M.; YOUSSEF, I.; ABDEL-LATIF, D. A. **Synthesis of photo-responsive chitosan-cinnamate for efficient entrapment of β -galactosidase enzyme.** *Reactive and Functional Polymers*, v. 124, p. 129–138, mar. 2018.

MUDALIGE, Thilak *et al.* **Characterization of Nanomaterials.** *In: Nanomaterials for Food Applications. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 313–353.*

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 23680530, Methylprednisolone Sodium Succinate.**

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 5877, Methylprednisolone Acetate.**

NGAN, La Thi Kim *et al.* **Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity.** Research on Chemical Intermediates, v. 40, n. 6, p. 2165–2175, 1 jul. 2014.

OHYA, Yuichi *et al.* **Release Behavior of 5-Fluorouracil from Chitosan-Gel Nanospheres Immobilizing 5-Fluorouracil Coated with Polysaccharides and Their Cell Specific Cytotoxicity.** Journal of Macromolecular Science, Part A, v. 31, n. 5, p. 629–642, maio 1994.

PAN, Cunli *et al.* **Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles.** Carbohydrate Polymers, v. 241, p. 116349, ago. 2020.

PAPICH, Mark G. **Methylprednisolone.** In: Saunders Handbook of Veterinary Drugs. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 517–519.

PARAMASIVAM, Gokul *et al.* **Nanomaterials: Synthesis and Applications in Theranostics.** Nanomaterials, v. 11, n. 12, p. 3228, 28 nov. 2021.

PATRULEA, V. *et al.* **Chitosan as a starting material for wound healing applications.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 97, p. 417–426, nov. 2015.

PAVONI, Julia Menegotto Frick; LUCHESE, Cláudia Leites; TESSARO, Isabel Cristina. **Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 138, p. 693–703, out. 2019.

PINZÓN, Miguel Alejandro *et al.* **Dexamethasone vs methylprednisolone high dose for Covid-19 pneumonia.** PLOS ONE, v. 16, n. 5, p. e0252057, 25 maio 2021.

POFI, Riccardo *et al.* **Treating the Side Effects of Exogenous Glucocorticoids; Can We Separate the Good From the Bad?** Endocrine Reviews, v. 44, n. 6, p. 975–1011, 9 nov. 2023.

PRASANNA, Pragya *et al.* **Nanotherapeutics in the treatment of acute respiratory distress syndrome.** Life Sciences, v. 276, p. 119428, jul. 2021.

RAHEEM, Muhammad Akmal *et al.* **Advances in nanoparticles-based approaches in cancer theranostics.** OpenNano, v. 12, p. 100152, jul. 2023.

RAJAN, Asha K. *et al.* **Efficacy of corticosteroids in COVID-19: An evidence-based approach from the published randomized controlled trials.** Clinical Epidemiology and Global Health, v. 33, p. 101867, maio 2025.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale Farmacologia.** 8. ed. [S.l.]: Elsevier, 2016.

RANJBAR, Keivan *et al.* **Methylprednisolone or dexamethasone, which one is superior corticosteroid in the treatment of hospitalized COVID-19 patients: a triple-blinded randomized controlled trial.** BMC Infectious Diseases, v. 21, n. 1, p. 337, 10 dez. 2021.

RASHKI, Somaye *et al.* **Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections.** Carbohydrate Polymers, v. 251, p. 117108, jan. 2021.

RASUL, Ruhisy Mohd *et al.* **A review on chitosan and its development as pulmonary particulate anti-infective and anti-cancer drug carriers.** Carbohydrate Polymers, v. 250, p. 116800, dez. 2020.

RAVAL, Nidhi *et al.* **Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development.** In: Basic Fundamentals of Drug Delivery. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 369–400.

RAWAL, Tejal; PATEL, Snehal; BUTANI, Shital. **Chitosan nanoparticles as a promising approach for pulmonary delivery of bedaquiline.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 124, p. 273–287, nov. 2018.

REZAEI, Fatemeh *et al.* **Handling of highly coeluted chromatographic peaks by multivariate curve resolution for a complex bioanalytical problem: Quantitation of selected corticosteroids and mycophenolic acid in human plasma.** Talanta, v. 187, p. 1–12, set. 2018.

RIEGGER, Benjamin R. *et al.* **A systematic approach of chitosan nanoparticle preparation via emulsion crosslinking as potential adsorbent in wastewater treatment.** Carbohydrate Polymers, v. 180, p. 46–54, jan. 2018.

SCHURR, Ulrich P. *et al.* **Preoperative administration of steroids: influence on adhesion molecules and cytokines after cardiopulmonary bypass.** The Annals of Thoracic Surgery, v. 72, n. 4, p. 1316–1320, out. 2001.

SHARIATINIA, Zahra. **Pharmaceutical applications of chitosan.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 263, p. 131–194, jan. 2019.

SHARMA, Anshika; AHMAD FAROUK, Isra; LAL, Sunil Kumar. **COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention.** Viruses, v. 13, n. 2, p. 202, 29 jan. 2021.

SHARMIN, Nusrat *et al.* **Effect of Citric Acid Cross Linking on the Mechanical, Rheological and Barrier Properties of Chitosan.** Molecules, v. 27, n. 16, p. 5118, 11 ago. 2022.

SHISHIR, Mohammad Rezaul Islam *et al.* **Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters.** Trends in Food Science & Technology, v. 78, p. 34–60, ago. 2018.

SHOUEIR, Kamel R. *et al.* **Chitosan based-nanoparticles and nanocapsules: Overview, physicochemical features, applications of a nanofibrous scaffold, and bioprinting.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 167, p. 1176–1197, jan. 2021.

SIKORSKI, Dominik; GZYRA-JAGIEŁA, Karolina; DRACZYŃSKI, Zbigniew. **The Kinetics of Chitosan Degradation in Organic Acid Solutions.** Marine Drugs, v. 19, n. 5, p. 236, 22 abr. 2021.

- SILVA, Allana Carvalho *et al.* **The Role of Inhaled Chitosan-Based Nanoparticles in Lung Cancer Therapy.** *Pharmaceutics*, v. 16, n. 8, p. 969, 23 jul. 2024.
- SIMON, József; KOVÁCS, Márton; SZABÓ, Pál T. **Finding the best column for polar basic analytes across reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography.** *Heliyon*, v. 11, n. 4, p. e42461, fev. 2025.
- SONG, Xiaojie *et al.* **Ultrasmall Chitosan–Genipin Nanocarriers Fabricated from Reverse Microemulsion Process for Tumor Photothermal Therapy in Mice.** *Biomacromolecules*, v. 16, n. 7, p. 2080–2090, 13 jul. 2015.
- SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A. **Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II.** *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 101–106, 27 jan. 2012.
- SUGIYANTI, Dina *et al.* **Preparation and Characterization of Chitosan from Indonesian Tambak Lorok Shrimp Shell Waste and Crab Shell Waste.** *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 17, n. 9, p. 446–453, 15 ago. 2018.
- TA, Quynh *et al.* **Chitosan nanoparticles for enhancing drugs and cosmetic components penetration through the skin.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 160, p. 105765, maio 2021.
- TAVARES, Guilherme Diniz *et al.* **N,N,N-trimethylchitosan-poly (n-butylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles as a potential oral delivery system for acyclovir.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 196, p. 111336, dez. 2020.
- THAKHIEW, Wasina; DEVAHASTIN, Sakamon; SOPONRONNARIT, Somchart. **Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of antimicrobial agent.** *Journal of Food Engineering*, v. 119, n. 1, p. 140–149, nov. 2013.
- THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. **Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19.** *New England Journal of Medicine*, v. 384, n. 8, p. 693–704, 25 fev. 2021.
- TOKUMITSU, Hiroyuki; ICHIKAWA, Hideki; FUKUMORI, Yoshinobu. **Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron- capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion- droplet coalescence technique and characterization.** *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 12, p. 1830–1835, 1999.
- UMAKANTHAN, Srikanth *et al.* **Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19).** *Postgraduate Medical Journal*, v. 96, n. 1142, p. 753–758, 20 jun. 2020.
- URQUIAGA, Mariana; SAAG, Kenneth G. **Risk for osteoporosis and fracture with glucocorticoids.** *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 36, n. 3, p. 101793, set. 2022.
- VALENCIA, Marcela Sarmiento *et al.* **Bioactivity and cytotoxicity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 31, p. 101879, jan. 2021.

VALVERDE-FRAGA, Lorena *et al.* **Design and in vitro assessment of chitosan nanocapsules for the pulmonary delivery of rifabutin.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 187, p. 106484, ago. 2023.

VAZ, Elisa Souza *et al.* **Drug repositioning in the COVID-19 pandemic: fundamentals, synthetic routes, and overview of clinical studies.** European Journal of Clinical Pharmacology, v. 79, n. 6, p. 723–751, 20 jun. 2023.

VERMA, Deepak *et al.* **Sustainable functionalized chitosan based nano-composites for wound dressings applications: A review.** Environmental Research, v. 235, p. 116580, out. 2023.

VILLEGAS-PERALTA, Yedidia *et al.* **Impact of the molecular weight on the size of chitosan nanoparticles: characterization and its solid-state application.** Polymer Bulletin, v. 78, n. 2, p. 813–832, 27 fev. 2021.

WANG, Wenjie; JUNG, Jooyeoun; ZHAO, Yanyun. **Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins.** Carbohydrate Polymers, v. 157, p. 1246–1253, fev. 2017.

WANG, Yichao *et al.* **Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer.** Nanomaterials, v. 6, n. 2, p. 26, 1 fev. 2016.

WU, Jie *et al.* **Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles.** Carbohydrate Polymers, v. 175, p. 170–177, nov. 2017.

WU, Yan *et al.* **Recent advances of innovative and high-efficiency stationary phases for chromatographic separations.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 153, p. 116647, ago. 2022.

XU, Zhe *et al.* **Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome.** The Lancet Respiratory Medicine, v. 8, n. 4, p. 420–422, abr. 2020.

XUE, Huaqian *et al.* **Construction of intelligent drug delivery system based on polysaccharide-derived polymer micelles: A review.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 254, p. 128048, jan. 2024.

YANAT, Murat; SCHROËN, Karin. **Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging.** Reactive and Functional Polymers, v. 161, p. 104849, abr. 2021.

YANG, Yang; DU, Lanying. **SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies.** Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 6, n. 1, p. 95, 26 fev. 2021.

YUAN, Yongliang *et al.* **The development of COVID-19 treatment.** Frontiers in Immunology, v. 14, 26 jan. 2023.

YUAN, Zhize *et al.* **Methylprednisolone alleviates lung injury in sepsis by regulating miR-151-5p/USP38 pathway.** *International Immunopharmacology*, v. 138, p. 112548, set. 2024.

YUE, Hua; MA, Guanghui. **Polymeric micro/nanoparticles:** Particle design and potential vaccine delivery applications. *Vaccine*, v. 33, n. 44, p. 5927–5936, nov. 2015.

ZACARON, Thiago Medeiros *et al.* **Advancements in Chitosan-Based Nanoparticles for Pulmonary Drug Delivery.** *Polymers*, v. 15, n. 18, p. 3849, 21 set. 2023.

ZENG, Zhigang; LIAO, Changzhou; YU, Lei. **Molecules for COVID-19 treatment.** *Chinese Chemical Letters*, v. 35, n. 7, p. 109349, jul. 2024.

ZHAO, Jing *et al.* **Chitosan-based nanoparticles for controlled release of hydrophobic and hydrophilic drugs.** *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, v. 10, n. 3, p. 98–106, 1 set. 2021.

ZHAO, Tianyu *et al.* **The development of therapeutics and vaccines against COVID-19.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 111, n. 3, p. 116643, mar. 2025.

ZHAO, Yuanrui *et al.* **Glucocorticoid therapy for acute respiratory distress syndrome: Current concepts.** *Journal of Intensive Medicine*, v. 4, n. 4, p. 417–432, out. 2024.

ZHOU, Wei *et al.* **Potential benefits of precise corticosteroids therapy for severe 2019-nCoV pneumonia.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 18, 21 fev. 2020.

ZOULIKHA, Makhloufi *et al.* **COVID-19 inflammation and implications in drug delivery.** *Journal of Controlled Release, Elsevier B.V.*, 1 jun. 2022.