

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GRAZIELLA GOMES RIVELLI**

**NANOFIBRAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO FUROATO DE MOMETASONA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA EM  
MODELO EXPERIMENTAL**

**BELO HORIZONTE**

**2021**

**Graziella Gomes Rivelli**

**NANOFIBRAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO FUROATO DE MOMETASONA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA EM  
MODELO EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti.

BELO HORIZONTE - MG

2021

R621n	<p>Rivelli, Graziella Gomes. Nanofibras biodegradáveis contendo furoato de mometasona: desenvolvimento, caracterização e avaliação da segurança em modelo experimental / Graziella Gomes Rivelli. – 2021. 103 f. : il.</p> <p>Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior. Coorientador: Gerson Antônio Pianetti.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. Medicamentos – Teses. 2. Glicocorticóides – Teses. 3. Copolímeros – Teses. 3. Rinossinusite crônica – Teses. 4. Tecnologia de liberação controlada – Teses. 5. Nanofibras – Teses. 6. Planejamento experimental – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Pianetti, Gerson Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p>CDD: 615.4</p>
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**"NANOFIBRAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO FURATO DE MOMETASONA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA EM MODELO EXPERIMENTAL"**

**GRAZIELLA GOMES RIVELLI**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS.

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo  
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto  
Universidade Federal de Goiás - UFG

Prof. Dr. Wagner da Nova Mussel  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Isabela da Costa César  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior- Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Coorientador

Belo Horizonte, 29 de março de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior**, Membro, em 29/03/2021, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wagner da Nova Mussel**, Membro de comissão, em 29/03/2021, às 20:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Membro**, em 30/03/2021, às 08:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **RICARDO NEVES MARRETO, Usuário Externo**, em 30/03/2021, às 08:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gerson Antonio Planetti, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2021, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Antunes de Souza Araújo, Usuário Externo**, em 14/04/2021, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0640398 e o código CRC 259379FA.

*Às pessoas que sofrem com a  
rinossinusite crônica.*

## AGRADECIMENTOS

Tudo que vale a pena e é completo, não é construído sozinho. Assim, nada é mais legítimo, do que agradecer a Deus por colocar pessoas especiais em meu caminho. São elas que fazem parte da minha vida, da minha construção como indivíduo e contribuíram para conclusão deste trabalho.

Ao Ramiro e aos meus filhos, Alice e Tiago, MEUS AMORES, por terem vivido e participado intensamente de todos os momentos junto a mim. Aos meus pais, Maria das Graças e Espedito, pelas palavras de apoio e por sempre serem exemplos de perseverança, dedicação e inteligência. Às minhas irmãs, Érika e Giovana, melhores amigas em todas as horas. Aos meus afilhados e sobrinhos, Maria Fernanda, Pedro, Rafael e Miguel, pelos momentos de carinho e boas risadas, fundamentais no decorrer dos anos do doutorado. Aos meus familiares, Anar, Maria das Graças, Raimundo, Maria Olívia, Mateus e Mara, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, que foi um mentor e uma referência desde a minha graduação em Farmácia. Seu apoio, compreensão e confiança em minha capacidade foram fundamentais para trilhar minha trajetória profissional. Agradeço por fazer parte da *Insert Care* e representar o grupo de pesquisa em programas de aceleração de *startups*. O reconhecimento recebido durante o LEMONADE foi um dos melhores momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Gérson Antônio Pianetti, um amigo inestimável e uma referência, pelo acolhimento e a confiança desde o mestrado. Fazer parte da sua equipe no processo de revisão da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição foi um sonho realizado.

Ao Cleildo e ao Pedro, grandes e melhores amigos, pesquisadores exemplares, pelos preciosos conselhos de vida e pela presença constante.

Aos amigos do laboratório: Brenda, Bruna, Carol, Cibele, Desirré, Elisa, Gracielle, Lays, Marcela, Marcus, Nayara, Raquel, Rumenigge, Thomas e Vinícius, pela alegre convivência. Um carinho especial pela Mayara, uma amiga formidável desde o

primeiro momento e compartilhou comigo, experiência e conhecimento. Ao Anderson, pelo companheirismo e por partilhar muitas descobertas e bons cafés.

Aos amigos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) que contribuíram no andamento do projeto. Entre eles: Carol Souza, Maria Carolina e Silvia Fialho, da Diretoria de Pesquisa. Além disso, sou grata aos amigos de longa data e colegas dos tempos de graduação: Alisson Luzia e Bruno Gonçalves, da Diretoria Industrial.

À Sarah Lamas e ao Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice, por cederem a utilização do equipamento para eletrofiação do LepCOM/DEMET da UFMG.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Christian Fernandes, Profa. Dra. Elionai Cassiana de Lima Gomes e Dr. Tiago Hilário Ferreira, pelas considerações no decorrer do percurso.

Ao Dr. André Coura Perez, Dra. Wilma Anselmo-Lima, Dr. Edwin Tamashiro e Dra. Fabiana Valera, pela condução dos ensaios *in vivo* na Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

Aos amigos da *Insert Care*, Lorena e Cleildo, pelo trabalho em equipe e pelos momentos alegres durante nossa jornada no ecossistema do empreendedorismo e da inovação.

Às minhas amigas Dardânia Leite, Fabiana Abrantes e Janaína Duarte, pelos nossos doces momentos. À Caryne Bertollo, amiga incrível, e sempre, com as melhores palavras.

À comunidade da UFMG e à Faculdade de Farmácia, pelo ensino público, gratuito e de qualidade, o qual foi imprescindível para meu desenvolvimento profissional e pessoal. Ao colegiado da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Marton Victor Alves, pelo cuidado e comprometimento durante a minha jornada como discente.



*“Se procurar bem você acaba encontrando.  
Não a explicação (duvidosa) da vida,  
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”*  
Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

A rinossinusite é uma doença que atinge grande parte da população mundial, acarretando um ônus significativo para a sociedade, nos gastos em saúde e na perda de produtividade. A rinossinusite crônica representa um problema de saúde significativo, que atinge entre 5 e 12% da população. O tratamento de primeira escolha é a utilização de medicamentos de administração intranasal contendo glicocorticoides, mas que demonstram, como principal obstáculo, o acesso restrito aos seios paranasais. Uma nova abordagem para o tratamento da doença consiste na utilização de sistemas de liberação de fármacos capazes de promover a liberação controlada do ativo veiculado diretamente na mucosa nasossinusal. Neste contexto, o objetivo desta tese foi o desenvolvimento de nanofibras poliméricas biodegradáveis, como sistemas de liberação contendo furoato de mometasona, e a avaliação da segurança do sistema obtido em um modelo animal *in vivo*. A metodologia de superfície de resposta com planejamento de experimentos foi aplicada para o desenvolvimento da formulação. Os fatores delineados foram a concentração de polímero e a proporção de solventes, e a variável resposta, o diâmetro das nanofibras. O sistema ideal obtido foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, doseamento e perfil de liberação da mometasona por método cromatográfico validado. Os resultados demonstraram que o fármaco está disperso na matriz polimérica, é estável e com cinética de liberação prolongada em meio biorrelevante *in vitro* (modelo de Higuchi). Nos testes *in vivo*, o nível de inflamação na mucosa dos animais que receberam a nanofibra contendo furoato de mometasona foi menor do que aqueles que receberam as nanofibras sem o fármaco ( $\alpha = 0,05$ ). A análise histopatológica mostrou que as nanofibras poliméricas contendo mometasona são seguras e biocompatíveis quando aplicadas topicamente na mucosa nasossinusal e mostram um novo horizonte no tratamento da rinossinusite crônica.

**Palavras-chave:** Furoato de mometasona. Copolímero dos ácidos glicólico e láctico. Liberação sustentada. Rinossinusite crônica. Nanofibras. Planejamento de experimentos.

## ABSTRACT

Rhinosinusitis is a disease that affects a large part of the world population, causing a significant burden for society in health costs and loss of productivity. Chronic rhinosinusitis represents a significant health problem that affects 5 to 12% of the population. The treatment of choice is the use of intranasal glucocorticoids, which have restricted access to the paranasal sinuses. Our new approach consists of the development of mometasone furoate biodegradable polymeric nanofibers. The new system, to treat chronic rhinosinusitis, provides a controlled release of glucocorticoids in the nasosinusal mucosa. This study aimed to develop biodegradable polymeric nanofibers and explore these fibers' safety in an *in vivo* rabbit model. The nanofibers development was optimized using the Response Surface Methodology and Design of Experiments to achieve the best polymer concentration and solvent ratio for the electrospinning process. The ideal system, determined by nanofiber's diameter responses, was analyzed by scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, assay, and drug delivery by a validated chromatographic method. The results showed that mometasone furoate is dispersed in the polymeric matrix, is stable, and showed sustained release kinetics in a bio-relevant nasal environment (Higuchi model kinetics). *In vivo* tests, the inflammation level of the animals' mucosa which received the mometasone furoate-loaded nanofiber was lower than those that received the nanofibers without the drug ( $\alpha = 0.05$ ). Histopathology analysis showed that the mometasone furoate-loaded nanofibers are safe when topically applied on the sinonasal mucosa, opening a new horizon in chronic rhinosinusitis treatment.

**Keywords:** Mometasone furoate. Poly (lactic-co-glycolic acid). Nanofibers. Sustained-release. Chronic rhinosinusitis. Nanofiber. Design of Experiments.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação da Rinossinusite Crônica Primária. ....	26
Figura 2 - Classificação da Rinossinusite Crônica Secundária. ....	28
Figura 3 - Anatomia dos seios paranasais e da cavidade nasal.....	29
Figura 4 - Fórmulas estruturais do cortisol (a), furoato de mometasona (b) e mometasona (c). ....	35
Figura 5 - Mecanismo de sinalização dos corticosteroides. ....	37
Figura 6 - Diagrama do processo de eletrofiação.....	42
Figura 7- Estrutura química do copolímero dos ácidos glicólico e láctico e seus respectivos monômeros. ....	46
Figura 8 - Procedimento cirúrgico para acesso à cavidade nasal de coelhos. ....	63
Figura 9 - Procedimento cirúrgico com a inserção das nanofibras.....	64
Figura 10 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (a).....	65
Figura 11 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (b).....	66
Figura 12 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (c).....	66
Figura 13 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (d).....	67
Figura 14 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (e).....	67
Figura 15 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (f).....	68
Figura 16 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (g).....	68
Figura 17 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (h).....	69
Figura 18 - Superfícies de Resposta para o diâmetro das nanofibras contendo FM-PLGA.....	70
Figura 19 - Micrografias das nanofibras otimizadas contendo furoato de mometasona. ....	71
Figura 20 - Curvas TG (a) e DTG (b) em razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. ....	72
Figura 21 - Curvas de DSC em razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. ....	74
Figura 22 - Difrátogramas das nanofibras contendo FM-PLGA, de PLGA, FM e do polímero. ....	75
Figura 23 - Dispersão dos resíduos obtidos no teste de Jacknife relativo ao parâmetro linearidade do FM.....	76

Figura 24 - Curva analítica do doseamento de furoato de mometasona por CLUE, no intervalo de 5,00 a 65,00 µg/mL. ....	78
Figura 25 - Cromatograma da hidrólise alcalina das nanofibras contendo FM-PLGA. ....	80
Figura 26 - Cromatograma da hidrólise ácida das nanofibras contendo FM-PLGA. .	81
Figura 27 - Cromatograma da oxidação das nanofibras contendo FM-PLGA. ....	81
Figura 28 - Cromatograma da fotólise das nanofibras contendo FM-PLGA. ....	82
Figura 29 - Cromatograma da degradação das nanofibras contendo FM-PLGA na presença de íons metálicos. ....	82
Figura 30 - Avaliação da adequação do modelo matemático, Valores observados <i>versus</i> preditos. ....	83
Figura 31 - Perfil de liberação cumulativo de FM das nanofibras. ....	85
Figura 32 - Seções de mucosa nasal de coelhos por tempo após a administração de nanofibras. ....	89
Figura 33 - Níveis de inflamação de mucosa nasal de coelhos por tempo após a administração de nanofibras. ....	89

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sinais inflamatórios relacionados aos tipos de RSC. ....	27
Quadro 2 - Diferenças clínicas entre RSCsPN e RSCcPN.....	31
Quadro 3 - Sistemas de liberação prolongada para o tratamento da RSC em estudos clínicos aprovados (em andamento/concluídos) pelo FDA.....	34
Quadro 4 - Características físico-químicas de furoato de mometasona.....	36
Quadro 5 - Afinidade de ligação ao GR relativa dos glicocorticoides tópicos.....	37
Quadro 6 - Fatores clínicos dos INCS intranasais.....	41
Quadro 7 - Técnicas de preparo de nanofibras por eletrospinning e seus benefícios...	43
Quadro 8 - Aplicação de CCD na otimização e desenvolvimento de nanofibras.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis e fatores empregados nos estudos de otimização. ....	53
Tabela 2 - Condições de processamento das nanofibras contendo FM-PLGA. ....	54
Tabela 3 - Condições cromatográficas. ....	56
Tabela 4 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade. ....	57
Tabela 5 - Condições de degradação forçada. ....	60
Tabela 6 - Planejamento fatorial da Robustez com valores codificados. ....	61
Tabela 7 - Experimentos realizados no CCD das nanofibras contendo FM-PLGA. ..	69
Tabela 8 - Concentrações e média das áreas dos picos relativos ao FM do parâmetro linearidade. ....	76
Tabela 9 - Premissas necessárias à utilização dos MMQO. ....	77
Tabela 10 - Precisão intermediária e repetibilidade do doseamento de FM por CLUE. ....	78
Tabela 11 - Exatidão do doseamento de FM em nanofibras por CLUE. ....	79
Tabela 12 - Exatidão do perfil de liberação de FM em nanofibras por CLUE. ....	79
Tabela 13 - Resultados percentuais do FM nas amostras degradadas. ....	80
Tabela 14 - Teor das nanofibras contendo FM-PLGA por CLUE. ....	84
Tabela 15 - Avaliação do modelo matemático da cinética de liberação das nanofibras contendo FM-PLGA. ....	85
Tabela 16 - Avaliação histológica da inflamação nas mucosas nasais de coelhos. ..	87
Tabela 17 - Padrão inflamatório nos seios nasais <i>versus</i> tempo de eutanásia. ....	88
Tabela 18 - Padrão inflamatório observados nas mucosas de coelhos. ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFRS	Rinossinusite fúngica alérgica (do inglês <i>allergic fungal rhinosinusitis</i> )
ANOVA	Análise de Variância
B	Boro
C.V.	Coeficiente de variação
CCAD	Doença atópica do compartimento central (do inglês <i>central compartment atopic disease</i> )
CCD	Planejamento de composto central, do inglês <i>central composite design</i> )
CLUE	Cromatografia a líquido de ultra performance
CMD	Concentração média determinada
CME	Concentração média experimental
CS	Quitosana
CT	Concentração teórica
DACC	Doença atópica do compartimento central
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCB	Denominação Comum Brasileira
DMF	N,N-dimetilformamida
DoE	Planejamento de experimentos ( <i>Design of Experiments</i> )
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês, <i>Differential scanning calorimetry</i> )
DTG	Termogravimetria Derivada
eCRS	Rinossinusite crônica eosinofílica (do inglês <i>eosinophilic CRS</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FESS	Cirurgia endoscópica funcional dos seios paranasais (do inglês <i>functional endoscopic sinus surgery</i> )
FM	Furoato de mometasona
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FNS	Fluido nasal simulado
FUNED	Fundação Ezequiel Dias



GR	Receptor de glicocorticoides
HPA	Eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal
HE	Hematoxilina eosina
Hf	Háfnio
I.V.	Intravenoso
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
ILC	Células linfoides inatas
INCS	Corticosteroides intranasais (do inglês <i>intranasal corticosteroids</i> )
GRE	Elementos dos receptores de glicocorticoides.
Ka	Constante de ionização do ácido
Log P	Coeficiente de partição
M	Concentração molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
Non-eCRS	RSC não-eosinofílica (do inglês <i>non-eosinophilic CRS</i> )
OMC	Complexo ostiomeatal (do inglês <i>ostiomeatal complex involvement</i> )
PA	Poliamida
PAA	Ácido poliacrílico
PAN	Poliacrilonitrila
PGA	Ácido poliglicólico
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo negativo de Ka
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Copolímero dos ácidos glicólico e láctico
PVA	Álcool polivinílico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PVP	Polivinilpirrolidona
r	Coeficiente de determinação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

REBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
RS	Rinossinusite
RSA	Rinossinusite aguda
RSC	Rinossinusite crônica
RSCcPN	Rinossinusite crônica com polipose nasal
RSCsPN	Rinossinusite crônica sem polipose nasal
RSM	Metodologia de superfície de resposta (do inglês <i>response surface methodology</i> )
SPE	Solução padrão estoque
SQR	Substância química de referência
TG	Termogravimetria
$T_g$	Transição vítrea
$T_H$	Célula T auxiliar ou T <i>helper</i>
THF	Tetraidrofurano
TIIF	Tetraaisopropóxido de titânio.
$TiO_2$	Dióxido de titânio
TNF	Fator de necrose tumoral
$t_0$	Tempo morto
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo

## LISTA DE NOTAÇÕES OU SÍMBOLOS

\$	Dólar
%	Por cento
€	Euro
<	Menor que
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual
°	Graus
°C	Graus <i>Celsius</i>
µg	Micrograma
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
Da	Dalton
g	Gramma
h	Hora
Kg	Quilograma
kGy	Quilogrey
KV	Quilovolts
L	Litro
mA	Miliampére
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pg	Picograma
θ	Theta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA .....	19
2 OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo Geral .....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 DESENVOLVIMENTO.....	24
3.1 Revisão da literatura.....	24
3.1.1 Rinossinusite .....	24
3.1.2 Furoato de mometasona .....	34
3.1.3 Administração nasal de fármacos.....	38
3.1.4 Nanofibras poliméricas.....	41
3.1.5 Planejamento e otimização de experimentos .....	47
3.2. Material e métodos .....	51
3.2.1 Material.....	51
3.2.2 Métodos.....	52
3.2.2.1 Preparo das nanofibras contendo furoato de mometasona .....	52
3.2.2.2 Estudos de otimização das nanofibras contendo furoato de mometasona....	53
3.2.2.3 Caracterização das nanofibras contendo furoato de mometasona .....	53
3.2.2.3.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	53
3.2.2.3.2 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG).....	54
3.2.2.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	55
3.2.2.3.4 Difração de Raios-X (DRX) .....	55
3.2.2.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para doseamento e perfil de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona por CLUE .....	55
3.2.2.5 Doseamento de furoato de mometasona nas nanofibras .....	61
3.2.2.6 Cinética de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona <i>in vitro</i> .....	61
3.2.2.7 Teste de esterilidade e endotoxina bacteriana .....	62
3.2.2.8 Avaliação da segurança das nanofibras contendo furoato de mometasona <i>in vivo</i> .....	62
3.3 Resultados e discussão.....	65
3.3.1 Estudos de otimização das nanofibras contendo furoato de mometasona.....	65
3.3.2 Preparo do lote ideal das nanofibras contendo furoato de mometasona.....	71

3.3.3 Caracterização das nanofibras .....	72
3.3.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para doseamento e perfil de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona por CLUE. ....	75
3.3.5 Doseamento de furoato de mometasona nas nanofibras .....	84
3.3.6 Cinética de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona <i>in vitro</i> .....	84
3.3.7 Teste de esterilidade e endotoxina bacteriana .....	86
3.3.8 Avaliação da segurança das nanofibras contendo furoato de mometasona <i>in vivo</i> .....	86
4 CONCLUSÃO.....	91
5 PERSPECTIVAS .....	92
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO.....	103

## 1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

A rinossinusite (RS) é caracterizada pela inflamação da mucosa dos seios nasais e paranasais e pode ser classificada em aguda ou crônica. A rinossinusite crônica (RSC) é um problema de saúde significativo que afeta entre 5 e 12% da população, constituindo uma das doenças mais prevalentes das vias aéreas superiores. A doença tem um impacto econômico, apresentando custos diretos e indiretos. Os pacientes demandam a utilização de serviços de saúde, com diminuição da qualidade de vida relacionada e perda de produtividade. A RSC é caracterizada pela presença de dois ou mais sintomas, um dos quais deve ser obstrução nasal, congestão ou secreção nasal (gotejamento nasal anterior / posterior), dor facial e / ou pressão; anosmia por pelo menos 12 semanas (AH-SEE; MACKENZIE; AH-SEE, 2012; ANSELMO LIMA *et al.*, 2015; FOKKENS *et al.*, 2020; GRAYSON *et al.*, 2020; KATO, 2015).

Embora a fisiopatologia da RSC seja multifatorial e não tenha sido totalmente elucidada, várias causas foram propostas, incluindo fatores ambientais e genéticos, variações anatômicas, imunodeficiência e falhas no mecanismo do *clearance* mucociliar (BACHERT *et al.*, 2012; BACHERT; HOLTAPPELS, 2015).

Os corticosteroides intranasais são a terapia padrão de primeira linha para todas as formas de RSC, embora sejam mais eficazes em pacientes com polipose. O uso da endoscopia nasal ampliou o tratamento cirúrgico, considerando a visualização detalhada dos recessos das cavidades paranasais. Além disso, a cirurgia endoscópica melhora a ventilação nasossinusal e restaura o *clearance* mucociliar, principalmente em pacientes que não respondem aos medicamentos prescritos (FOKKENS *et al.*, 2020; HAMILOS, 2011; MARPLE *et al.*, 2012; PARIKH *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2016).

Desde 1935, os esteróides têm sido amplamente utilizados devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. O furoato de mometasona (FM) é um glicocorticóide com propriedades anti-inflamatórias locais, com efeitos em várias células, como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e também em mediadores envolvidos no processo inflamatório (BOUSQUET, 2009; HOCHHAUS, 2008; VAN DRUNEN *et al.*, 2005).

O FM é utilizado em formas farmacêuticas tópicas e apresenta alta afinidade pelo receptor de glicocorticoide com mínima absorção sistêmica. A lipofilicidade do fármaco, associada à dissolução das partículas do medicamento, prolonga o tempo de residência na cavidade nasal. O FM é estruturalmente semelhante ao cortisol, divergindo pela presença de grupos que aumentam a afinidade pelo receptor de glicocorticoide e apresentam inibição mais potente da síntese e liberação de interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (BARTON *et al.*, 1991; ERICSON-NEILSEN; KAYE, 2014; HE *et al.*, 2014; HÜBNER; HOCHHAUS; DERENDORF, 2005; ONRUST; LAMB, 1998).

A presença de um grupo metil em C<sub>16</sub> aumenta a seletividade do FM pelo receptor e a dupla ligação na posição 1,2 no anel A, aumenta a atividade glicocorticoide. A porção esterificada do furoato na posição 17- $\alpha$  é responsável por aumentar a afinidade aos receptores de glicocorticoides (GR) (BARTON *et al.*, 1991; ERICSON-NEILSEN; KAYE, 2014; HE *et al.*, 2014; HÜBNER; HOCHHAUS; DERENDORF, 2005; ONRUST; LAMB, 1998).

A mucosa nasal tem um grande potencial como via de administração de medicamentos; é uma alternativa para uma maior absorção de fármacos quando comparada ao trato gastrointestinal, devido às suas características de permeabilidade celular, menor atividade enzimática, efeitos de diluição por conteúdo e pH (KUSHWAHA; KESHARI; RAI, 2011; SMITH *et al.*, 2016).

Os esteroides tópicos, incluindo o spray nasal de FM, quando administrados, podem reduzir o edema, a formação de tecido de granulação e a deposição de fibrina e são amplamente utilizados no pós-operatório. A limitação mais significativa da administração de sprays nasais é o *clearance* mucociliar, que pode ser minimizado por sistemas que aumentam o tempo de residência na cavidade nasal e, conseqüentemente, a concentração e a biodisponibilidade do fármaco. Entretanto, estudos têm demonstrado que os implantes que requerem remoção posterior podem causar um trauma adicional à mucosa adjacente, dificultando a cicatrização (SAHIN-YILMAZ; NACLERIO, 2011; SZEFLER, 2001; WANNER; SALATHÉ; O'RIORDAN, 1996; WEI; KENNEDY, 2012).

Os sistemas poliméricos biodegradáveis são capazes de modular a cinética de degradação *in vivo* em função da liberação controlada dos fármacos dispersos em uma matriz polimérica (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005; TAHERALI; VARUM; BASIT, 2017).

Polímeros e copolímeros são derivados de ácidos láctico e glicólico, tais como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e, especialmente, o copolímero dos ácidos glicólico e láctico (PLGA) demonstram biocompatibilidade, cinética de biodegradação e resistência mecânica. A degradação *in vivo* desses polímeros ocorre pelo mecanismo de erosão, clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando ácidos láctico e glicólico, que são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de dióxido de carbono e água. Na seleção e utilização do PLGA como excipiente para as nanofibras, sua biocompatibilidade e seu mecanismo de degradação foram parâmetros determinantes, visto que os produtos da sua biotransformação já são naturalmente excretados do organismo (JAIN *et al.*, 1998; JAIN, 2000; MAKADIA; SIEGEL, 2011; UHRICH *et al.*, 1999).

A eletrofiação é uma técnica para obtenção de fibras a partir de soluções poliméricas com um diâmetro de dimensões nanométricas, quando submetida a um campo elétrico. As nanofibras apresentam área superficial maior do que as obtidas em processos de fiação convencionais. Fundamentalmente, o sistema de eletrofiação tem quatro componentes: (1) campo elétrico, (2) tubo capilar condutor, (3) bomba e (4) coletor. A solução polimérica contida no tubo capilar condutor é submetida a uma diferença de potencial elétrico. A gotícula formada acumula carga elétrica em sua superfície, gerando um jato na direção do coletor. Durante esse deslocamento da solução polimérica, o solvente é evaporado e as nanofibras formadas se depositam no coletor (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CHEW *et al.*, 2006; CHOU; CARSON; WOODROW, 2015; RENEKER *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2016; XUE *et al.*, 2019).

As nanofibras poliméricas obtidas por eletrofiação, contendo fármacos, têm sido pesquisadas como sistemas *drug delivery* no tratamento de diversas doenças. As nanofibras poliméricas apresentam cinética de liberação controlada pelas suas características morfológicas, dimensionais e farmacotécnicas. A matriz polimérica possibilita a incorporação de fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos bem como a



utilização de polímeros que modulem a velocidade e extensão da liberação dos princípios ativos (BALUSAMY *et al.*, 2020; CHOU; CARSON; WOODROW, 2015).

Avanços científicos nas áreas de oncologia, Alzheimer e infectologia corroboram com o grande potencial da aplicação de nanofibras poliméricas no carregamento de fármacos (MEINEL *et al.*, 2012; THAKKAR; MISRA, 2017; TSENG *et al.*, 2013).

Os objetivos da tese envolvem o desenvolvimento otimizado das nanofibras poliméricas carregadas com FM, sua caracterização química e o seu perfil de liberação. A avaliação de segurança das nanofibras *in vivo* foi realizada pelo exame da mucosa após a inserção do sistema nos seios maxilares de coelhos em tempos pré-estabelecidos (COSTANTINO *et al.*, 2007; KARA, 2004; PARIKH *et al.*, 2014; PEREZ *et al.*, 2012, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver as nanofibras poliméricas biodegradáveis contendo furoato de mometasona e a avaliação da sua segurança em modelo experimental.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver as nanofibras poliméricas e otimizar sua fabricação utilizando planejamento de experimentos com o planejamento de composto central.
- Caracterizar as nanofibras utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial.
- Desenvolver e validar um método cromatográfico, para quantificar o furoato de mometasona nas nanofibras e no perfil de liberação *in vitro*.
- Avaliar a cinética de liberação do fármaco a partir das nanofibras em meio e condições biorrelevantes.
- Avaliar a segurança das nanofibras *in vivo*, após implantação nos seios nasais de coelhos.

## 3 DESENVOLVIMENTO

### 3.1 Revisão da literatura

#### 3.1.1 Rinossinusite

A rinossinusite (RS) é uma doença sintomática caracterizada pela inflamação da mucosa nasal e seios paranasais, também denominada mucosa rinossinusal. A RS pode ser classificada em rinossinusite aguda (RSA) e crônica (RSC), de acordo com o tempo de evolução dos sinais e sintomas. Os fatores de risco potenciais para o desenvolvimento da RSC incluem fatores genéticos, anatômicos e ambientais, bem como a presença de comorbidades (ANSELMO LIMA *et al.*, 2015; BACHERT *et al.*, 2020a).

A prevalência da RSC na população mundial é 5 a 12%, compromete a vida social e ocupacional dos indivíduos e acarreta custos diretos e indiretos aos seus portadores, aos sistemas de saúde e à sociedade (FOKKENS *et al.*, 2020). Na Europa, foi estimado que 10,9% da população apresentava sintomas da doença e com uma variação significativa entre seus países (6,9% na Finlândia e 27,1% em Portugal), no ano de 2011. De acordo com as estatísticas de saúde publicadas em 2018 pelo *National Center for Health Statistics* (NCHS), 11,2% da população dos Estados Unidos apresentaram sintomas de RS. No Brasil, a prevalência da RSC de 5,51% foi obtida por um estudo realizado no município de São Paulo, com inquéritos transversais de base populacional em população com idade superior a 12 anos (CDC, 2018; HASTAN *et al.*, 2011; PILAN *et al.*, 2012; WAHID *et al.*, 2020).

Os sintomas nasossinusais da RSC causam impactos negativos no sono, no humor e na função das vias aéreas. Dessa forma, há uma redução significativa tanto na qualidade de vida quanto na produtividade laboral. Os custos diretos da RSC estão relacionados às consultas médicas, ao tratamento farmacológico, à hospitalização e à cirurgia; já os custos indiretos se referem à redução da produtividade laboral, na forma de absenteísmo ou presenteísmo (BACHERT *et al.*, 2020a).

Um estudo transversal, realizado na Holanda, demonstrou que o custo direto anual de pacientes adultos com RSCcPN (Rinossinusite crônica com polipose nasal) equivale a €1501 euros e um custo indireto de €5659 euros. Considerando que a prevalência da RSC equivale a 2%, na Holanda, os custos anuais totais de pacientes com RSCcPN foram estimados em 1,9 bilhões de euro/ano. Nos Estados Unidos, os custos anuais diretos foram estimados entre US\$ 10 e US\$ 13 bilhões e os indiretos, US\$ 20 bilhões. Os pacientes com RSCcPN têm gasto de saúde estimado em US\$ 5,7 bilhões anuais. No Brasil, as informações relacionadas aos custos diretos e indiretos da doença são escassas, em decorrência da ausência de uma política nacional que estabeleça os mecanismos de detecção e monitoramento da RSC (BACHERT *et al.*, 2020a; BHATTACHARYYA *et al.*, 2019; LOURIJSEN; FOKKENS; REITSMA, 2020; RUDMIK, 2017).

Em adultos, a RSA é diagnosticada quando ocorre o início súbito de pelo menos dois dos sintomas: bloqueio, obstrução, congestão ou secreção nasal, gotejamento nasal, dor ou pressão facial e redução ou perda do olfato com duração inferior a 12 semanas. Já em crianças, o diagnóstico ocorre na presença de dois ou mais dos sintomas: bloqueio, obstrução ou congestão nasal, secreção nasal sem coloração e tosse, também com duração inferior a 12 semanas (ANSELMO LIMA *et al.*, 2015; FOKKENS *et al.*, 2020).

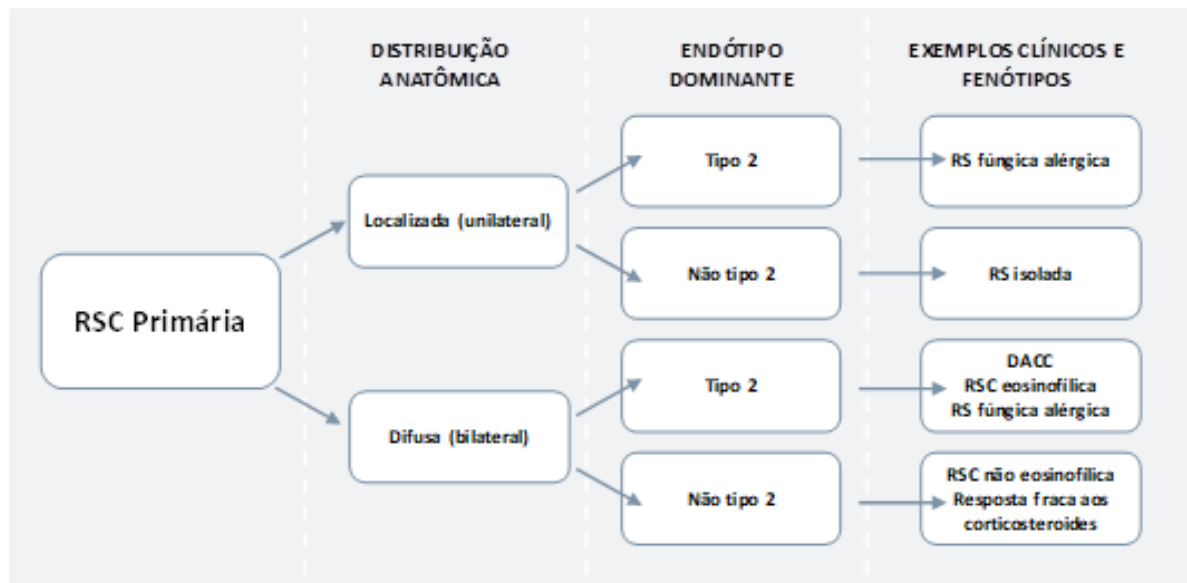
A RSC tem uma duração igual ou superior a 12 semanas. Em adultos, é definida pela ocorrência de dois ou mais sintomas, sendo um a ocorrência, bloqueio, obstrução, congestão ou gotejamento nasal, com dor ou pressão facial; ou redução ou perda do olfato. Em crianças, o diagnóstico ocorre com a presença de dois ou mais sintomas, no qual um é bloqueio, obstrução, congestão ou gotejamento nasal; dor ou pressão facial; ou tosse (ANSELMO LIMA *et al.*, 2015; FOKKENS *et al.*, 2020).

A RSC pode ser classificada como primária ou secundária, de acordo com distribuição anatômica, dominância do endótipo ou com mecanismos de cada fenótipo (BACHERT; AKDIS, 2016; FOKKENS *et al.*, 2020; GRAYSON *et al.*, 2020; KATO, 2015).

Na RSC primária (**Figura 1**), a distribuição anatômica é geralmente unilateral e acomete a mucosa nasossinusal, sem o envolvimento das vias aéreas inferiores. A distribuição difusa pode acometer tanto as vias aéreas superiores quanto as inferiores.

No que diz respeito à dominância de endótipo, a resposta imunológica na mucosa nasossinusal pode ser mediada em respostas de células T e de células B. O padrão de imunidade não está completamente elucidado, entretanto, as respostas imunológicas mais reconhecidas estão relacionadas ao tipo 1 (T<sub>H</sub>1), T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17. A resposta inflamatória Tipo 2 associa-se, provavelmente, a células T<sub>H</sub>2, células T citotóxicas e linfócito T CD4+ (BACHERT *et al.*, 2020b; GRAYSON *et al.*, 2020).

**Figura 1 - Classificação da Rinossinusite Crônica Primária.**



RS: rinossinusite; RSC: rinossinusite crônica; e DACC: doença atópica do compartimento central.  
**Fonte:** adaptados de GRAYSON *et al.*, 2020 e FOKKENS *et al.*, 2020

As respostas estão associadas à produção regulada de interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-3, imunoglobulina E e eosinofilia. Em longo prazo, a presença dos mastócitos e a degranulação dos eosinófilos ocasionam lesão tecidual. A resposta inflamatória não tipo 2 abrange as do tipo 1 e 3 (**Quadro 1**) (BACHERT *et al.*, 2020b; GRAYSON *et al.*, 2020).

As interleucinas IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral estimulam a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-8. Sequencialmente, ocorre a liberação de citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e mieloperoxidase. O IFN- $\gamma$  leva à diferenciação de células

T CD4+ pela produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (BACHERT *et al.*, 2020b; GRAYSON *et al.*, 2020).

**Quadro 1 - Sinais inflamatórios relacionados aos tipos de RSC.**

Tipo	Células T helper e ILCs	Citocinas típicas	Células típicas envolvidas
Tipo 1	T <sub>H</sub> 1 e ILC1	IFN- $\gamma$ e TNF	Neutrófilos e células NK
Tipo 2	T <sub>H</sub> 2 e ILC2	IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13	Células B produtoras de IgE, mastócitos e eosinófilos.
Tipo 3	T <sub>H</sub> 17 e ILC3	IL-17 IL-22	Neutrófilos

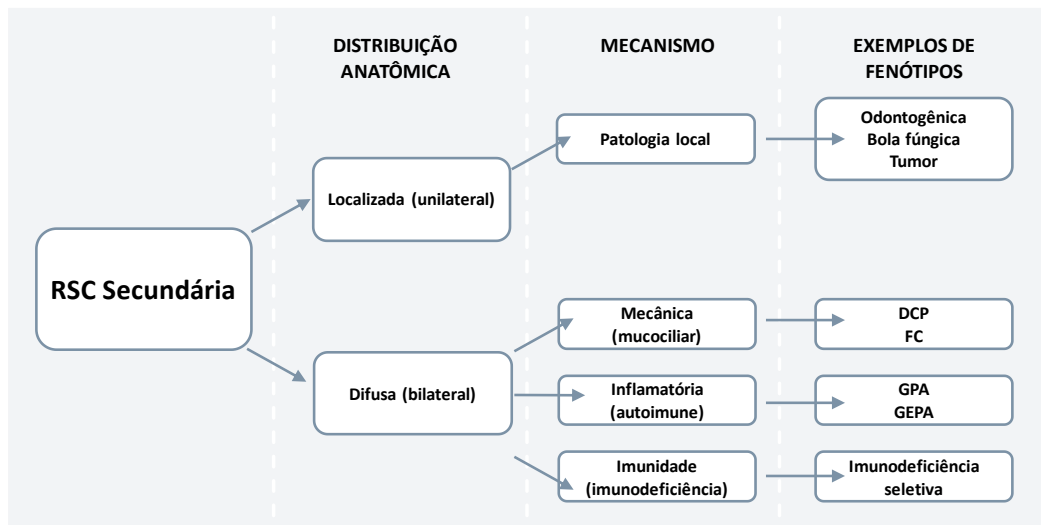
ILCs: células linfoides inatas; NK: natural killers; e T<sub>H</sub>: T helper. **Fonte:** Bachert, *et al.*, 2020.

Na avaliação do fenótipo clínico, as condições patológicas localizadas associadas à inflamação do tipo 2, podem estar relacionadas à rinossinusite fúngica alérgica (AFRS, do inglês *allergic fungal rhinosinusitis*), como uma resposta à infecção local por fungos como *Alternaria*, *Bipolaris* e *Curvularia*. Incluem a doença frontal isolada, doença esfenoidal isolada e envolvimento do complexo ostiomeatal (OMC, do inglês *ostiomeatal complex involvement*) que, usualmente requerem intervenção cirúrgica para desobstrução das vias aéreas (GRAYSON *et al.*, 2020).

As condições patológicas difusas do tipo 2 incluem a doença atópica do compartimento central (CCAD, do inglês *central compartment atopic disease*), RSC eosinofílica (eCRS, do inglês *eosinophilic CRS*) e AFSR. Os pacientes acometidos pela RSC eosinofílica apresentam pólipos nasais e severa disfunção olfatória, com tratamento sensível aos corticosteroides. Já a condição patológica difusa não-tipo 2 inclui a RSC não-eosinofílica (Non-eCRS, do inglês *non-eosinophilic CRS*) e não é sensível ao tratamento com corticosteroides (GRAYSON *et al.*, 2020).

A RSC secundária (**Figura 2**) é menos comum e é geralmente associada a uma doença sistêmica ou patologia local. Quando RSC é localizada, sua causa pode estar relacionada ao abscesso dentário periapical, neoplasia, trauma facial e corpos estranhos (GRAYSON *et al.*, 2020).

**Figura 2 - Classificação da Rinossinusite Crônica Secundária.**



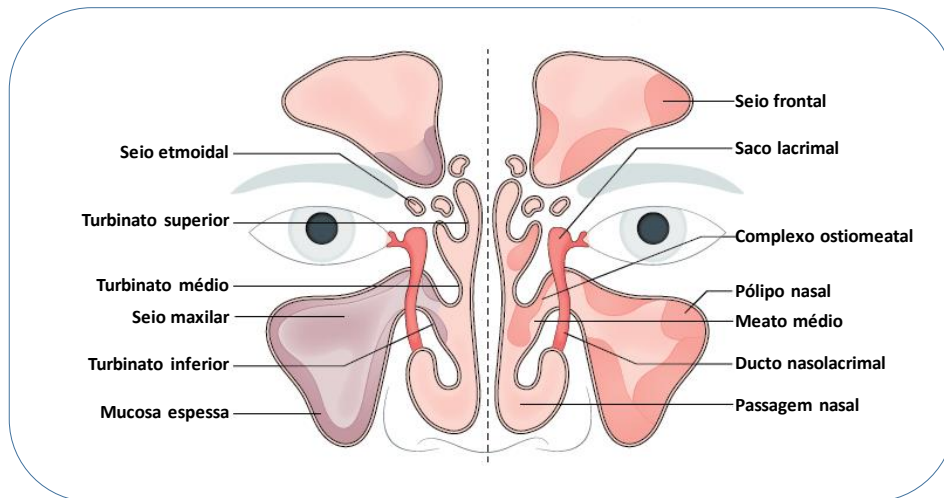
RS: rinossinusite; DCP: discinesia ciliar primária; FC: fibrose cística; GPA: granulomatose com poliangite (doença de Wegener); e GEPA: granulomatose eosinofílica com poliangite (doença de Churg-Strauss). **Fonte:** adaptados de GRAYSON *et al.*, 2020 e FOKKENS *et al.*, 2020.

A RSC secundária difusa pode ser causada por doença autoimune como eosinofilia e granulomatose com poliangite. Doenças difusas associadas às imunodeficiências incluem deficiência seletiva de IgA, deficiência imunológica comum variável (CVID, do inglês *common variable immune deficiency*) e diabetes (GRAYSON *et al.*, 2020).

A fisiopatologia da RSC é estabelecida sistematicamente, de acordo com suas categorias. O epitélio nasal é uma barreira imunológica colonizada por microrganismos não patogênicos, cuja função primordial é a manutenção do balanço hidroeletrólítico e remoção de partículas e toxinas provenientes do meio ambiente. O epitélio nasal é protegido por uma camada de muco e pelo movimento mucocilar (BACHERT *et al.*, 2020a).

As cavidades nasais representam extensa superfície mucosa, determinada por saliências e reentrâncias conferidas pelas conchas nasais e septo nasal, apresentando como principais funções o equilíbrio da temperatura e umidade do ar inspirado, além de filtrar as partículas em suspensão (**Figura 3**). Esses processos fisiológicos nasais são dinâmicos, apresentando variações relacionadas aos mecanismos autônomos e em resposta a estímulos externos (BACHERT *et al.*, 2020a).

**Figura 3 - Anatomia dos seios paranasais e da cavidade nasal.**



**Fonte:** Adaptado de BACHERT, 2020a.

O desarranjo da estrutura epitelial nasal é um dos mecanismos da doença pelos processos de acantose (hipertrofia epitelial) e acantólise (segregação epitelial), que comprometem a funcionalidade do epitélio. O ciclo de lesão e reparo associados à transição mesenquimal epitelial (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) são desencadeados pela presença de patógenos, alérgenos e tabagismo. Este mecanismo fisiopatológico é associado às respostas inflamatórias eosinofílicas da RSCsPN (rinossinusite crônica sem polipose nasal) e RSCcPN (rinossinusite crônica com polipose nasal). As formas não eosinofílicas da RSC (tipos 1 e 3) apresentam hiperplasia glandular e deposição de colágeno mais intensas (BACHERT *et al.*, 2020a; WANG; YAN; ZHANG, 2020).

Alterações da função mucociliar, relacionadas à frequência do batimento ciliar, à coordenação ou à estrutura, promovem crescimento bacteriano e formação de biofilme. A colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* produzem toxinas ciliostática ou ciliotóxica levando à exacerbação da disfunção e lesão ciliares. A teoria atual sustenta que o papel das bactérias e fungos no processo da doença é mais imunoestimulador que infeccioso, e que esses agentes infecciosos podem iniciar e propagar uma resposta inflamatória crônica. Os mecanismos genético e epigenético também estão associados à lesão ciliar e à ciliogênese anormal em RSC (BACHERT *et al.*, 2020a).



O mecanismo de crescimento de pólipos nasais não está claramente elucidado e as principais hipóteses são a presença de pseudocistos, edemas e alterações da glândula submucosal que causam a obstrução dos seios nasais (BACHERT *et al.*, 2020a; GRAYSON *et al.*, 2020).

Os sistemas imunológicos adaptativo e inato desempenham um papel importante na RSCcPN e RSCsPN pelas respostas dos eosinófilos e macrófagos. Os mecanismos celulares são decorrentes da ruptura da barreira epitelial por proteases bacterianas e toxinas formadoras de poros, a liberação de alarminas em resposta aos fatores de virulência bacteriana e a liberação de histamina dos leucócitos ou mastócitos desencadeados por componentes bacterianos (BACHERT *et al.*, 2020a).

O diagnóstico precoce de cada indivíduo é essencial para um tratamento adequado e previne complicações. Na maioria dos casos, o diagnóstico é feito apenas com base nos sintomas, entretanto, outras modalidades diagnósticas são utilizadas, incluindo técnicas de imagem, rinoscopia anterior e cultura microbiológica. É crucial distinguir acerca da presença de pólipos nasais na RSC, os quais são detectados apenas com endoscopia nasal (BACHERT *et al.*, 2020a; HAMILOS, 2011).

A rinoscopia anterior e a endoscopia nasal podem revelar uma combinação de edema no interior do meato médio, mucopurulência e polipose nasal. Asma, rinite alérgica inalatória e sensibilidade à aspirina são comorbidades que corroboram às manifestações clínicas para o adequado diagnóstico da RSC (BACHERT *et al.*, 2020a; WANG; YAN; ZHANG, 2020).

A rinoscopia anterior pode ser usada para avaliar a cavidade nasal, mas a endoscopia nasal tornou-se o método de escolha, em função da sua melhor eficácia para avaliar o meato médio e o complexo ostiomeatal. A endoscopia nasal pode diferenciar RSCsPN da RSCcPN, uma vez que subgrupos de doenças divergem nos padrões de sintomas (**Quadro 2**). (BACHERT *et al.*, 2020a; WANG; YAN; ZHANG, 2020).

**Quadro 2 - Diferenças clínicas entre RSCsPN e RSCcPN.**

Características clínicas	RSCsPN	RSCcPN
Endoscopia nasal	Aspecto normal*, com um terço dos pacientes com edema em meato médio e mucopurulência.	Pólipos nasais bilaterais*, mas frequentemente com edema e sem pólipos após a cirurgia
Padrão de sintomas	Dor ou pressão facial*, gotejamento nasal anterior ou posterior*, congestão nasal e perda do olfato.	Perda do olfato e paladar*, congestão nasal*, secreção ântero-posterior e dor ou pressão facial.
Asma, como comorbidade	20-40% tipo 2, e <10% não tipo 2.	50-70%, grave tipo 2, 20-50% moderado tipo 2, e 0-20% não tipo 2.
Recorrência 12 anos após cirurgia	20% tipo 2, e <10% não tipo 2.	Até 80% tipo 2, E <10% não tipo 2.
Doença respiratória exacerbada por aspirina	Raramente	10-30%

RSCsPC: rinossinusite crônica sem polipose nasal; RSNcPN: rinossinusite crônica com polipose nasal; e \* sinais mais frequentes. **Fonte:** Bachert, *et al.*, 2020.

A prevenção da RSC perpassa pela promoção de um estilo de vida saudável para o desenvolvimento de imunidade do paciente. A redução da exposição a toxinas inaladas, tais como fumaça de cigarro, vapores irritantes ou poluentes ocupacionais, podem reduzir significativamente o risco de desenvolver a doença (BACHERT *et al.*, 2020a).

Os objetivos da farmacoterapia da RNC são reduzir a infecção e a inflamação, restaurar a função ciliar e melhorar a ventilação da mucosa. A seleção da terapia medicamentosa adequada baseia-se no histórico de prescrição individual do paciente, na duração dos sintomas, na gravidade e na presença de pólipos (HALAWI; SMITH; CHANDRA, 2013; MELTZER; HAMILOS, 2011).

Os corticosteroides intranasais (INCS, do inglês *intranasal corticosteroids*) e a irrigação salina constituem a terapia padrão de primeira linha para todas as formas de RSC, embora mais eficazes em pacientes com polipose. As doses administradas dos sprays intranasais não acessam o seio nasal e a quantidade de corticosteroide que atinge o tecido no local é desconhecido. Os INCS apresentam eficácia para redução do tamanho do pólipo nasal, desobstrução nasal e redução da rinorreia e da anosmia. As formulações contendo INCS com biodisponibilidade inferior a 1% (mometasona e fluticasona) são utilizadas com segurança a longo prazo. Os corticosteroides orais também são recomendados para o tratamento de curto prazo da RSC com pólipos

nasais e na ausência de resultados com o tratamento de primeira linha (BACHERT *et al.*, 2020a; HAN; KERN, 2019; MELTZER; HAMILOS, 2011; ORLANDI *et al.*, 2016; POETKER; REH, 2010; YU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

A cirurgia endoscópica funcional dos seios paranasais (FESS, do inglês *functional endoscopic sinus surgery*) é um método eficaz para o tratamento da RSCcPN, pela desobstrução das vias e pela administração tópica de soluções contendo anti-inflamatórios e antibióticos ao final do procedimento cirúrgico. No procedimento, a mucosa inflamada é removida das paredes dos seios da face, permitindo a reepitelização da cavidade nasal, a melhoria na ventilação nasossinusal e o restabelecimento do *clearance* mucociliar (BACHERT *et al.*, 2020a; MARPLE *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2016; WEI; KENNEDY, 2012).

Os fatores relacionados ao paciente, ao procedimento cirúrgico e ao pós-operatório influenciam significativamente o resultado da cirurgia nasossinusal. A FESS é indicada em pacientes com RSC e pólipos nasais, tumores nasais benignos ou malignos. Complicações no pós-operatório, incluindo cicatrizes dos óstios dos seios, o desenvolvimento de aderências das mucosas, a lateralização da concha média, a inflamação persistente da mucosa, alterações da mucosa polipóide ou persistência de pólipos contribuem para o insucesso do tratamento (BACHERT *et al.*, 2020a; MARPLE *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2016; WEI; KENNEDY, 2012).

Os sistemas Propel® e Sinuva® são os primeiros implantes auto-expansíveis que são inseridos cirurgicamente e liberam corticosteroides diretamente no sítio da inflamação. A disponibilidade desses tipos de implantes representa um avanço significativo no tratamento pós-cirúrgico da RSC (KENNEDY, 2012; MELTZER; HAMILOS, 2011; PARIKH *et al.*, 2014; POETKER; REH, 2010).

Os sistemas Propel® contém 370 µg de FM e são fabricados pela empresa Intersect®. O Propel®, Propel Mini®, Propel Mini® com SDS e Propel Contour® apresentam variações dimensionais e no local de administração, que são, respectivamente, o seio etmoidal, seio etmoidal ou frontal, seio etmoidal e seio frontal ou maxilar. O sistema implantável Sinuva® é fabricado também pela Intersect®, com uma dose de 1350 µg de FM, para ser administrado endoscopicamente no seio etmoidal. O fármaco pode

ser liberado por 90 dias, que é o tempo limite para sua remoção (accessdata.fda.gov; WEI; KENNEDY, 2012).

O Sinuva® possui registro nos Estados Unidos, sob o número N209310, entretanto, os produtos da linha Propel® não estão registrados no *Food and Drug Administration* (FDA), até a presente data. Os efeitos adversos reportados nos estudos clínicos de fase 3 foram a presença de infecção e formação de crostas, com a necessidade da remoção do *stent* (accessdata.fda.gov; WEI; KENNEDY, 2012).

Dados anteriores demonstram que os implantes contendo FM são eficazes na redução da inflamação pós-operatória, polipose, aderências da mucosa e lateralização do corneto médio após cirurgia do seio nasal e reduz a necessidade do tratamento oral com corticosteroides (accessdata.fda.gov; HAN; KERN, 2019; WEI; KENNEDY, 2012).

O mercado de sistemas de liberação controlada de fármacos para administração nasal tem a expectativa de ultrapassar US\$ 64 bilhões até o ano de 2021 (MAHER; CASETTARI; ILLUM, 2019).

Estudos recentes com medicamentos biológicos foram conduzidos como alternativas no tratamento da RSC. Os anticorpos monoclonais mepolizumabe, omalizumabe e dupilumab estão entre os mais promissores e resultados preliminares foram reportados para o omalizumabe (BACHERT *et al.*, 2020b).

O **Quadro 3** apresenta os sistemas implantáveis em estudo clínico (em andamento e concluídos) aprovados pelo FDA para o tratamento de RSC (clinicaltrials.gov/).

**Quadro 3 - Sistemas de liberação prolongada para o tratamento da RSC em estudos clínicos aprovados (em andamento/concluídos) pelo FDA.**

Sistema implantável	Status	Desenho	Doenças	Período
FM, 1350 µg disperso em blenda PLGA (Sinuva®)	Fase 3 concluída	Ensaio clínico prospectivo, não randomizado, aberto e multicêntrico com 50 pacientes ≥ 18 anos	RSC Pólipos nasais	2017-2019
FM, 370 µg disperso em blenda PLGA (Propel®)	Fase 4 concluída	Ensaio clínico randomizado, controlado e cego com 50 pacientes ≥ 18 anos	RSC Etmoidal	2015-2018
FM, 1350 µg disperso em blenda PLGA (Sinuva®)	Fase 3 concluída	Ensaio multicêntrico, controlado duplo-cego conduzido com 300 pacientes ≥ 18 anos	RSC Pólipos nasais	2014-2018
FM, 1350 µg disperso em blenda PLGA (Sinuva®)	Fases 2 e 3 concluídas	Ensaio multicêntrico, randomizado, controlado por placebo, duplo-cego com 100 pacientes ≥ 18 anos, FESS prévia e polipóse recorrente	RSC Pólipos nasais	2013-2018
FM, 370 µg disperso em blenda PLGA (Propel Mini®, Propel Nova®), administrados no seio frontal.	Fase 3 concluída	Estudo multicêntrico prospectivo, randomizado, cego, controlado, em 160 pacientes ≥ 18 anos, no seio frontal	RSC	2014-2018
Implante contendo 7500 mcg de LYR-210 (FM), administrados bilateralmente.	Fase 2 em andamento	Estudo randomizado, cego, controlado por placebo, em 110 pacientes ≥ 18 anos	RSC Diagnóstico da RSC	2019-2021

Fonte: [clinicaltrials.gov/](http://clinicaltrials.gov/)

Todos estão sendo conduzidos com o mesmo princípio ativo. No Brasil, não há registro de estudo clínico sendo conduzido para sistemas de liberação prolongada para tratamento da RSC, de acordo com pesquisa realizada na plataforma de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC), até a presente data ([ensaiosclinicos.gov.br](http://ensaiosclinicos.gov.br); [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

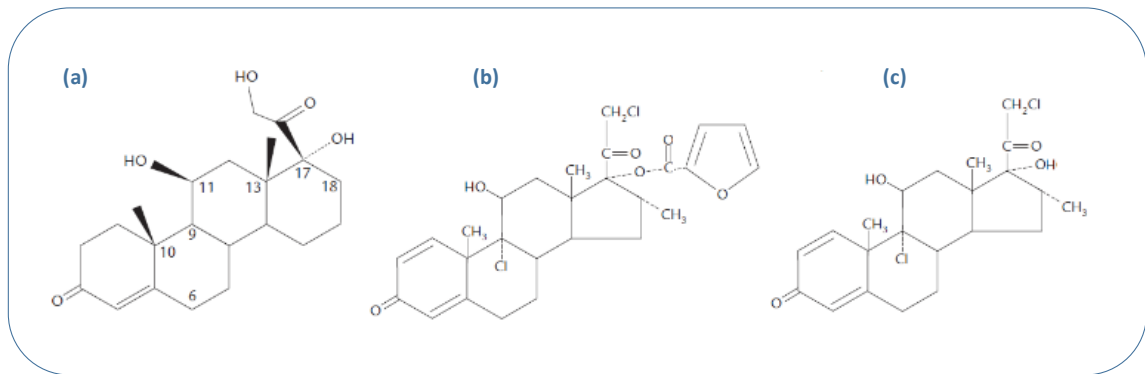
### 3.1.2 Furoato de mometasona

Os esteroides são classificados em glicocorticoides (possuem atividade imunoduladora), mineralocorticoides (controle hidroeletrolítico) e esteroides sexuais (os que exercem atividade androgênica ou estrogênica). Os glicocorticoides apresentam atividade anti-inflamatória, reconhecida desde a década de 1940 e, em 1973, começaram a ser utilizados no tratamento da rinite alérgica. Houve um avanço

terapêutico significativo no tratamento, com a aplicação dos INCS diretamente sobre a mucosa nasal, com a redução dos efeitos adversos (DAVIES; NELSON, 1997; ERICSON-NEILSEN; KAYE, 2014).

O furoato de mometasona (**Figura 4**),  $9\alpha$ -21-dicloro- $11\beta$ - $17\alpha$ -diidroxi- $16\alpha$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20diona 17-(2'-furoato), é um glicocorticoide sintético, descoberto por Shapiro&Grove no Instituto de Pesquisa da *Schering Plough* em Nova Jersey, na década 1980 (BUSILLO; CIDLOWSKI, 2013; DAVIES; NELSON, 1997; DRAPER *et al.*, 1998; ERICSON-NEILSEN; KAYE, 2014; SHAPIRO; GROVE, 1984).

**Figura 4 - Fórmulas estruturais do cortisol (a), furoato de mometasona (b) e mometasona (c).**



**Fonte:** Adaptado de BARTON *et al.*, 1991; HOCHHAUS, 2008.

A patente relativa à sua síntese e aplicações farmacológicas foi depositada nos Estados Unidos, sob o número 4.472.393 e codificado como SCH32088 (Elocon®) (BUSILLO; CIDLOWSKI, 2013; DAVIES; NELSON, 1997; DRAPER *et al.*, 1998; ERICSON-NEILSEN; KAYE, 2014; SHAPIRO; GROVE, 1984).

O FM (**Figura 4,b**) apresenta grupamentos químicos que aumentam a afinidade pelo receptor glicocorticoide e foi originalmente desenvolvido para o tratamento de dermatoses responsivas aos corticosteroides. Apresenta eficácia comprovada no tratamento da psoríase e dermatite atópica, com baixa incidência de supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (DAVIES; NELSON, 1997; DRAPER *et al.*, 1998; PRAKASH; BENFIELD, 1998).

O cortisol é um esteroide endógeno, produzido pelo córtex adrenal com afinidade aos GR e com potência inferior às dos glicocorticoides sintéticos. Avaliações da relação

da estrutura-atividade do FM (**Quadro 4**) demonstraram que o grupamento furoato, na posição C-17- $\alpha$  do anel esteroide aumenta seu caráter lipofílico e a sua afinidade aos GR. A presença do átomo de halogênio na posição 21, o torna resistente às esterases presentes na epiderme (CRIM; PIERRE; DALEY-YATES, 2001; HE *et al.*, 2014; HOCHHAUS, 2008; PRAKASH; BENFIELD, 1998).

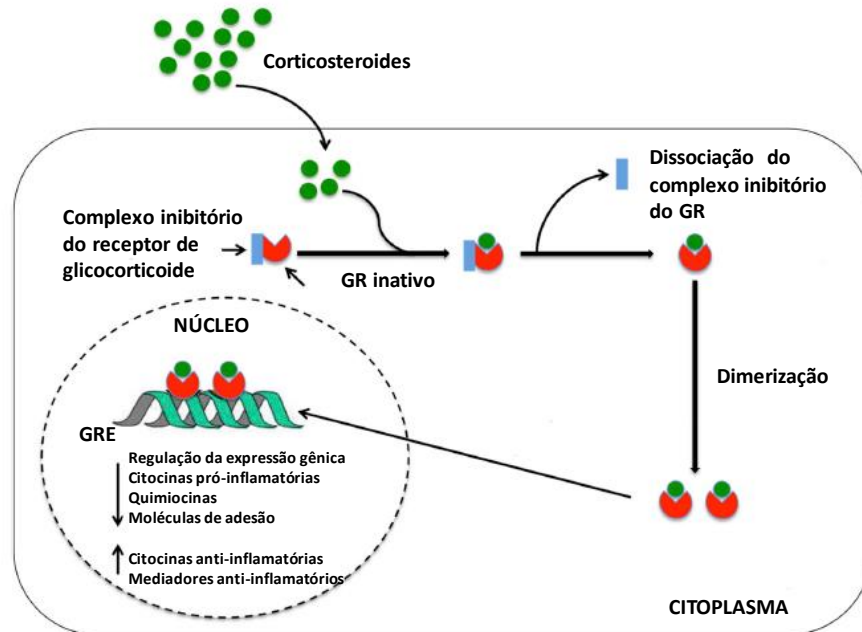
**Quadro 4 - Características físico-químicas de furoato de mometasona.**

Característica	Furoato de mometasona (DCB: 06061)
Fórmula molecular	$C_{27}H_{30}Cl_2O_6$
Massa molar (g/mol)	521,43
Características físicas	Pó branco ou quase branco, funde em aproximadamente 220 °C, com decomposição.
pKa (0 -14)	13,79
Log P	5,06

**Fontes:** ANVISA,2021; pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

As propriedades anti-inflamatórias do FM, comuns aos demais glicocorticoides, estão relacionados à cadeia do ácido araquidônico, pela inibição direta e indireta da enzima fosfolipase A2, uma enzima crítica para a produção dos mediadores inflamatórios. O fármaco inibe a expressão de histamina, leucotrienos, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, interferon- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , *in vivo* e *in vitro*. Os esteroides podem afetar a expressão e tradução genética (**Figura 5**), bem como a atividade enzimática por meio de uma multiplicidade de vias bioquímicas (BARTON *et al.*, 1991; ERICSON-NEILSEN; KAYE, 2014; HÜBNER; HOCHHAUS; DERENDORF, 2005; LUMRY, 1999; PRAKASH; BENFIELD, 1998).

**Figura 5 - Mecanismo de sinalização dos corticosteroides.**



GR: receptor de glicocorticoide; GRE: elementos dos receptores de glicocorticoide. **Fonte:** (MATERA *et al.*, 2019).

Estudos comparativos demonstraram que o FM apresentou maior potência e inibição da síntese de IL-1, IL-6 e TNF  $\alpha$  (**Quadro 5**) (BARTON *et al.*, 1991; HÜBNER; HOCHHAUS; DERENDORF, 2005; LUMRY, 1999; PRAKASH; BENFIELD, 1998).

O FM apresenta a taxa de ligação a proteínas de 99,5%, *clearance* de 54 L/h, volume de distribuição de 332 L e meia vida (I.V.) de 5,0. Nos microsossomos hepáticos humanos, a formação de metabólitos é regulada pelo citocromo P-450 e sua excreção ocorre, em maior extensão, na bile (HOCHHAUS, 2008; MATERA *et al.*, 2019).

**Quadro 5 - Afinidade de ligação ao GR relativa dos glicocorticoideis tópicos.**

Fármaco	Afinidade de ligação ao GR relativa(*)
Furoato de mometasona	1235
Propionato de fluticasona	831
Budesonida	258
Acetonido de triancinolona	164
Dexametasona	100
Progesterona	NA

GR: receptor glicocorticoide; (\*) quantidade relativa necessária para substituir 50% da dexametasona tritriada ligada (controle positivo) **Fonte:** Adaptado de LUMRY, 1999; VALOTIS; HÖGGER, 2004.



O FM, quando administrado na cavidade nasal, é praticamente indetectável no plasma, utilizando método analítico com limite de quantificação equivalente a 50 pg/mL. Estudos randomizados, duplo-cego e controlados por placebo, realizados em adultos, comprovaram que a administração inalatória de 1600 mg de FM não apresenta efeitos sistêmicos (HOCHHAUS, 2008; MATERA *et al.*, 2019).

No Brasil, os medicamentos contendo FM registrados junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são comercializados nas formas farmacêuticas de uso tópico (creme e pomada) para tratamento da inflamação e prurido como psoríase e doenças alérgicas da pele, suspensão nasal para tratamento da rinosinusite aguda e pó inalatório para tratamento da asma. Nos Estados Unidos, após a consulta ao Orange Book, além dos registros das mesmas formas farmacêuticas disponíveis no Brasil, há o registro de um implante de liberação prolongada contendo 1,35 mg de FM, utilizado no tratamento pós-cirúrgico da RSC, o Sinuva® ([accessdata.fda.gov](https://accessdata.fda.gov), 2021; [gov.br/anvisa](http://gov.br/anvisa), 2021; HAN; KERN, 2019). (HAN; KERN, 2019)

### **3.1.3 Administração nasal de fármacos**

O nariz está situado no segmento anterior do trato respiratório e pode ser dividido em nariz externo e cavidade nasal. Seu arranjo anatômico permite que a via aérea permaneça aberta pelo vestíbulo nasal. Cada cavidade nasal é delimitada pelo septo nasal e parede lateral, localizados lateralmente, e abaixo, encontram-se os meatos inferiores, meio e superiores. A cavidade nasal apresenta área superficial total de, aproximadamente, 150 cm<sup>2</sup> e um volume total de 15 mL (MYGIND *et al.*, 2001; WATELET; VAN CAUWENBERGE, 1999).

A cavidade nasal é complexa e apresenta as funções de umidificação, filtração e condicionamento do ar inalado, além de permitir uma resposta imunológica a partículas inspiradas. O tecido epitelial da cavidade nasal é constituído de células colunares ciliadas e não ciliadas, células caliciformes e células basais, com proporções diferentes em cada região da cavidade nasal. As células caliciformes possuem grânulos secretores de mucina, componente que representa

aproximadamente 2% do muco nasal (MYGIND *et al.*, 2001; PARIKH *et al.*, 2014; WATELET; VAN CAUWENBERGE, 1999).

A mucosa nasal é uma via potencial para a administração de medicamentos, sendo uma alternativa para ação local ou sistêmica, apresentando absorção mais rápida e em maior grau quando comparado ao trato gastrointestinal. O pH da mucosa nasal é entre 5,5 e 6,5 e sua temperatura entre 32 e 34 °C. A mucosa nasal apresenta elevada área superficial, elevada vascularização, ausência do metabolismo de primeira passagem com o aumento da biodisponibilidade e a possibilidade da aplicação de sistemas com liberação *nose to brain* (ARORA; SHARMA; GARG, 2002; COSTANTINO *et al.*, 2007; ENGLAND *et al.*, 1999; KECK *et al.*, 2000).

O muco é uma secreção viscoelástica aderente e complexa, produzida pelas células caliciformes especializadas do epitélio. A sua composição é de aproximadamente 95% de água, 2% de glicoproteínas, 1% de outras proteínas e 1% sais inorgânicos e a quantidade de lipídios é inferior a 1%. Os líquidos da superfície são constituídos de fluido periciliar (fase sol, próximo à superfície celular) e a camada de muco (fase de gel, sobre a fase sol) com comportamento não newtoniano (BANSIL; TURNER, 2018; COSTANTINO *et al.*, 2007; LECHANTEUR; NEVES; SARMENTO, 2018; MARTTIN *et al.*, 1998; MYGIND *et al.*, 2001; WANNER; SALATHÉ; O'RIORDAN, 1996).

O tempo do trânsito mucociliar normal em humanos é entre 12 a 15 minutos. A composição e as propriedades reológicas do muco nasal podem ser alteradas pela interação das glicoproteínas aos fragmentos de neutrófilos e eosinófilos (BANSIL; TURNER, 2018; COSTANTINO *et al.*, 2007; LECHANTEUR; NEVES; SARMENTO, 2018; MARTTIN *et al.*, 1998; MYGIND *et al.*, 2001; WANNER; SALATHÉ; O'RIORDAN, 1996).

Um das limitações mais relevantes dos medicamentos de administração intranasal é a ocorrência de *clearance* mucociliar, que é influenciado por condições patológicas, exposição a alérgenos e poluentes. O *clearance* mucociliar pode alterar a velocidade e a extensão de liberação de fármacos no sítio de ação (UGWOKE *et al.*, 2005; WEI; KENNEDY, 2012).

As principais barreiras que limitam a absorção dos fármacos na mucosa nasal são a degradação enzimática no tecido ou na cavidade nasal, a espessura da mucosa e os fatores relacionados à massa molecular e à lipofilicidade. Os fármacos ideais para administração nasal devem apresentar massa molecular inferior a 1000 Da e serem lipofílicos. O desenvolvimento de formulações que aumentam o tempo de residência dos fármacos na cavidade nasal pode minimizar os efeitos cinéticos relacionados ao *clearance* mucociliar (ARORA; SHARMA; GARG, 2002; DAVIS; ILLUM, 2003; SOFI *et al.*, 2020; UGWOKÉ *et al.*, 2005; WEI; KENNEDY, 2012).

Quando administrados topicamente, os INCS apresentam um potencial mínimo para ocorrência de efeitos adversos sistêmicos, contrário ao observado na terapia oral, uma vez que doses relativamente baixas são efetivas quando aplicadas topicamente. O local de deposição do fármaco na cavidade nasal pode influenciar a sua absorção, e quando for o caso, a ação local (COSTANTINO *et al.*, 2007; DJUPESLAND, 2013).

Para o tratamento mais eficaz da RSNcPN, a distribuição do glicocorticoide na superfície da mucosa é extremamente desejável especialmente nos meatos médio e superior, nos quais se espera uma ação tópica (COSTANTINO *et al.*, 2007; DJUPESLAND, 2013).

Os INCS utilizados no tratamento da RSNcPN apresentam deposição típica na região anterior e inferior da cavidade nasal e, conseqüentemente, não há uma entrega eficaz dos fármacos nos meatos e seios da face, nos quais predomina o processo inflamatório (DJUPESLAND, 2013).

Estudos sugerem que a farmacocinética e a farmacodinâmica de fármacos administrados pela via intranasal não são afetadas pela presença da rinossinusite. Os tempos de início da ação dos INCS são variáveis (**Quadro 6**), variando entre 12 horas a dias, sendo que o FM e o propionato de fluticasona oferecem alívio relativamente rápido dos sintomas, quando comparados aos demais corticosteroides (COSTANTINO *et al.*, 2007; LUMRY, 1999).

**Quadro 6 - Fatores clínicos dos INCS intranasais.**

Medicamento	Tempo para início dos efeitos	Biodisponibilidade sistêmica (%)
Dipropionato de beclometasona	Em 3 dias	17
Budesonida	Em 24 h, geralmente em poucos dias	11
Flunisolida	4 a 7 dias	20 - 50
Propionato de Fluticasona	12 h a alguns dias	<2
Furoato de mometasona	Início com 12 h, média de 36 h	<0,1
Acetonido de triancinolona	Antes de 24 h	22

**Fonte:** Adaptado de LUMRY, 1999.

Métodos de tratamento com base nanotecnológica para RSC têm a perspectiva de um amplo crescimento de mercado para agentes tópicos novos e existentes, bem como novas vias e locais de administração, mais eficazes, visando aumentar a adesão do paciente e biodisponibilidade do fármaco (KUMAR; PANDEY; JAIN, 2016).

### 3.1.4 Nanofibras poliméricas

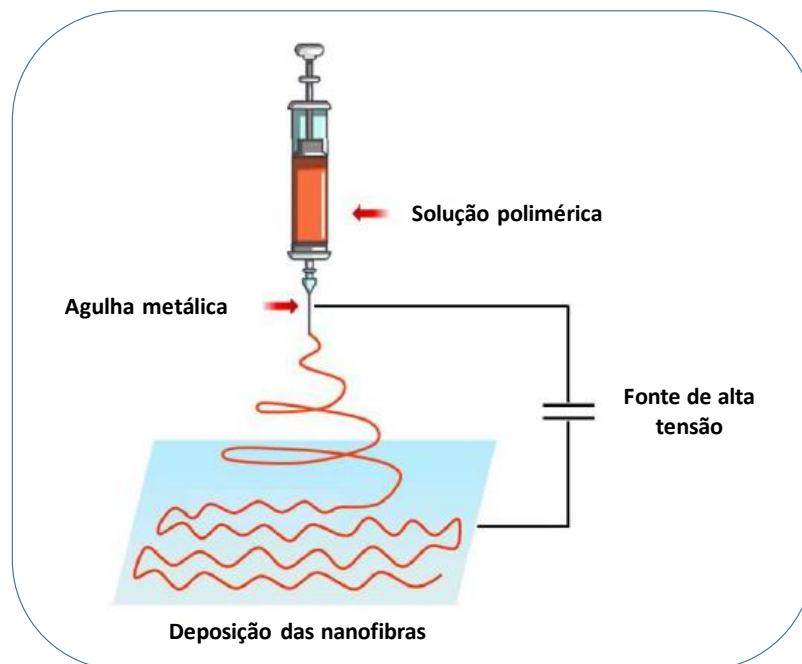
Os primeiros registros de patentes relacionados ao processo de obtenção de nanofibras ocorreram no início do século XX. Entretanto, apenas no início da década de 1990 que os grupos de pesquisa de Reneker & Rutledge reinventaram a técnica de eletrofiação (HUANG *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2019).

O processo de eletrofiação (em inglês *electrospinning*) ocorre quando um campo elétrico é aplicado em uma solução viscoelástica e sua gotícula, na ponta de uma agulha, que se desloca para um suporte. Durante o deslocamento da solução, ocorre a evaporação do solvente e a deposição das nanofibras interconectadas no suporte. A eletrofiação permite produzir fibras em malhas, mantas ou membranas poliméricas com diâmetros variando entre 10 nm a 10 µm (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; HUANG *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2019).

A eletrofiação consiste das principais etapas descritas a seguir (**Figura 6**) (HUANG *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2019):

- 1) uma solução contida em um pequeno capilar/agulha é submetida a uma vazão controlada;
- 2) a gotícula gerada na ponta do capilar carregada eletricamente sofre uma repulsão eletrostática gerando uma deformação no formato de um cone (cone de *Taylor*);
- 3) formação de um jato estendido que, ao ser acelerado pelo campo elétrico na direção do suporte coletor, tem suas dimensões reduzidas num processo de alongação;
- 4) solidificação do jato em decorrência da evaporação do solvente, com a formação das fibras. As cargas podem estar aprisionadas na superfície das fibras após a evaporação do solvente; e
- 5) deposição das fibras em um coletor aterrado, com a dissipação das suas cargas aprisionadas

**Figura 6 - Diagrama do processo de eletrospinning.**



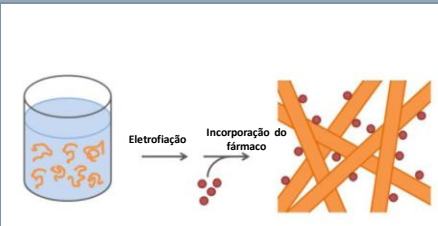

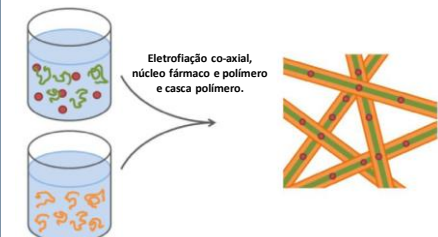
Fonte: Adaptado de FENG *et al.*, 2019.

A redução do diâmetro para escala nanométrica durante o processo de eletrospinning favorece o aumento da relação superfície-volume, alteração na molhabilidade, controle da cinética de liberação e redução das imperfeições na morfologia (RENEKER *et al.*, 2007).

As técnicas de eletrospinning podem ser classificadas em eletrospinning de misturas, coaxial, emulsão, por fusão e a jato de gás (SHAHRIAR *et al.*, 2019).

A incorporação de fármacos em nanofibras pode ocorrer por diferentes técnicas (**Quadro 7**), incluindo modificações pós-eletrofiação, eletrofiação de misturas da solução polimérica com fármacos, nanopartículas ou emulsões, bem como a eletrofiação coaxial com estrutura casca-núcleo (do inglês *core-shell*) (MEINEL *et al.*, 2012).

**Quadro 7 - Técnicas de preparo de nanofibras por eletrofiação e seus benefícios.**

Esquema de processamento	Técnica de incorporação do fármaco	Benefícios
 <p>Modificação pós-eletrofiação</p>	<p>Eletrofiação do polímero seguida da adsorção do fármaco.</p>	<p>Sistema versátil para liberação de fármacos, sem a exposição do fármaco ao processo de eletrofiação. Perfil de liberação do fármaco definida pelo seu grau de interação com a matriz.</p>
 <p>Eletrofiação da blenda polimérica</p>	<p>Eletrofiação da solução polimérica, contendo: fármaco, emulsão, ou suspensão.</p>	<p>Liberação modificada ou prolongada de fármacos.</p>
 <p>Coaxial com estrutura casca núcleo</p>	<p>Eletrofiação da mistura de fármaco/polímero como núcleo aprisionado dentro de um invólucro de uma segunda solução polimérica.</p>	<p>Liberação modificada.</p>

Fonte: Adaptado de MEINEL *et al.*, 2012.

Os parâmetros críticos que afetam a formação, a morfologia e as dimensões das nanofibras eletrofiadas estão relacionadas a: **(1)** parâmetros do sistema que compreendem as características do polímero (massa molecular, distribuição de massa molecular e arquitetura) e propriedades reológicas da solução (solvente, viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica); **(2)** parâmetros do processo (diferença de potencial elétrico aplicada, vazão, temperatura, diâmetro da agulha, suporte e a distância entre a ponta da agulha e o coletor); e **(3)** parâmetros ambientais (umidade relativa do ar, temperatura do ambiente e a composição atmosférica) (GOH; SHAKIR; HUSSAIN, 2013; HUANG *et al.*, 2003; THAKKAR; MISRA, 2017; XUE *et al.*, 2019).

Os efeitos relacionados ao aumento da concentração do polímero na solução são a formação de nanofibras com diâmetros maiores e com a presença de partículas (do inglês, *beads*) (HUANG *et al.*, 2003; THAKKAR; MISRA, 2017).

A viscosidade da solução é um dos parâmetros mais críticos que influenciam no diâmetro das fibras, sendo que valores maiores ocasionam a formação de nanofibras com diâmetros maiores. A avaliação do parâmetro é determinante, já que uma solução polimérica deve ter uma concentração alta o suficiente para formação da matriz polimérica, entretanto não tão alta que a viscosidade reduza ou impeça o movimento do polímero induzido pelo campo elétrico (THAKKAR; MISRA, 2017).

O aumento da condutividade do solvente reduz a possibilidade de formação de partículas e geram nanofibras com diâmetros menores (FRENOT; CHRONAKIS, 2003). O aumento na diferença de potencial elétrico aplicada ocasiona a formação de nanofibras com menor diâmetro e com menor formação de partículas. O aumento na vazão da solução está associada ao aumento do diâmetro das fibras (THAKKAR; MISRA, 2017).

O coletor é geralmente uma folha de metal plana ou uma grade que pode ser revestida com um tecido e à medida que a distância entre a ponta da agulha e o coletor é reduzida, há uma tendência em uma maior adesão das nanofibras ao coletor e entre si, com um aumento do diâmetro das mesmas (FRENOT; CHRONAKIS, 2003; THAKKAR; MISRA, 2017). As condições ambientais podem refletir na formação de poros, tais como a formação de poros circulares com o aumento da umidade relativa no ar (HUANG *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2019).

As nanofibras são utilizadas como sistemas de liberação controlada de fármacos e, a cinética de liberação depende da natureza química do polímero e da interação entre o fármaco e a matriz polimérica. Os mecanismos de liberação do fármaco envolvem processos de desorção, difusão e/ou degradação da matriz. A cinética de liberação dos fármacos é diretamente afetada pela escolha do polímero, da porosidade, morfologia e geometria das nanofibras. Geralmente, diâmetros menores apresentam maior velocidade de liberação, pela correlação com maior área superficial. Estudos

demonstraram ainda, que nanofibras com diâmetros maiores e com elevada porosidade liberam o fármaco mais rapidamente quando comparadas às mais finas e com menor porosidade (THAKKAR; MISRA, 2017).

Os parâmetros relacionados ao fármaco que interferem no seu perfil de liberação são a massa molecular, o estado físico, solubilidade, interações entre o fármaco e a matriz polimérica, bem como a proporção fármaco-polímero. Quanto maior a proporção de fármaco na composição e menor massa molecular do fármaco, há uma tendência a sua liberação imediata. Dessa forma, o uso de nanofibras poliméricas é uma estratégia promissora para o tratamento de doenças inflamatórias tanto agudas quanto crônicas, em função de sua versatilidade em proporcionar liberação controlada de fármacos (MEINEL *et al.*, 2012; THAKKAR; MISRA, 2017).

A capacidade de carreamento de fármacos, biocompatibilidade, biodegradabilidade das nanofibras são atributos que permitem a administração em diferentes vias, tais como oral, parenteral, sublingual, retal, vaginal, ocular, nasal, inalatória e transdérmica. Esses sistemas de liberação permitem a entrega do princípio ativo diretamente no local esperado para a ação farmacológica, colaborando para a redução da toxicidade pela possibilidade da diminuição da dose (SHAHRIAR *et al.*, 2019).

No Brasil, não há estudo clínico sendo conduzido com nanofibras, de acordo com pesquisa realizada na plataforma REBEC, até a presente data. Nos EUA, estão registrados 6 estudos clínicos, até a presente data: antibióticos em ortodontia, curativos de feridas, compósitos em resinas dentárias, reparo de manguito rotator em pacientes acima de 55 anos e enxerto em feridas ([ensaiosclinicos.gov.br](http://ensaiosclinicos.gov.br), 2021; [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), 2021).

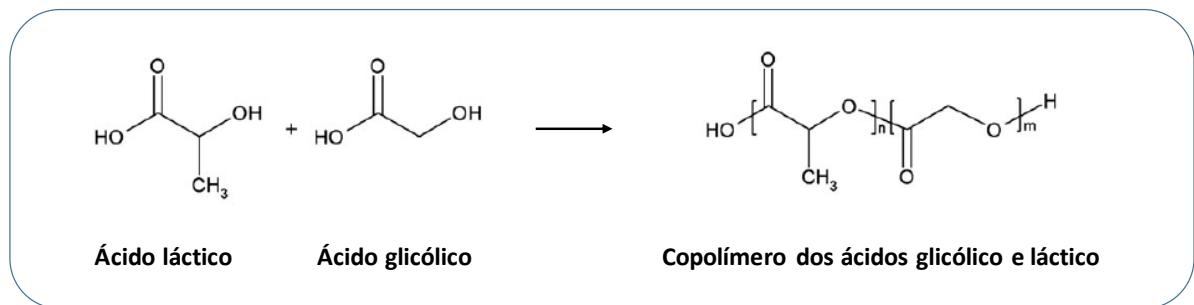
Os sistemas poliméricos podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis, baseado nas características do polímero utilizado. Sistemas não-biodegradáveis são principalmente compostos de derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, que quando administrados requerem intervenção cirúrgica para remoção. As formas farmacêuticas que possuem polímeros biodegradáveis não precisam ser removidos após a



administração já que os produtos de sua degradação são absorvidos pelo organismo, diminuindo a necessidade de uma abordagem invasiva (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005; NAVES *et al.*, 2017). Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli( $\epsilon$ -caprolactona), o ácido poli-láctico (PLA) e os diferentes tipos poli láctico-co-glicólico (PLGA) (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005; GENTILE *et al.*, 2014).

O PLGA é um copolímero linear que pode ser sintetizado em diferentes proporções entre seus monômeros constituintes: o ácido láctico e ácido glicólico (**Figura 7**).

**Figura 7- Estrutura química do copolímero dos ácidos glicólico e láctico e seus respectivos monômeros.**



Fonte: Adaptado de (GENTILE *et al.*, 2014).

Mecanismos diversos de síntese são usados na obtenção do PLGA e os parâmetros de processo influenciam em suas características físico-químicas. O PLGA é um insumo sólido branco amorfo, solúvel em solventes orgânicos clorados, tetraidrofurano, acetona e acetato de etila (GENTILE *et al.*, 2014).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos copolímeros de PLGA se encontra acima da fisiológica (37 °C) e, nessa condição, o polímero apresenta uma estrutura rígida. Essa característica é um fator determinante para sua utilização em sistemas de liberação de fármacos e na velocidade de degradação dos polímeros, já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta maior  $T_g$ , geralmente se degrada mais lentamente (JAIN, 2000).

A degradação do PLGA *in vivo* ocorre por erosão, com a clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos láctico e glicólico. Inicialmente a água penetra na região amorfa e cliva as interações do tipo *Van der Waals* e as ligações de hidrogênio, causando uma diminuição na *Tg*. Sequencialmente, há clivagem das ligações covalentes da cadeia polimérica, com diminuição da massa molecular e dá-se o início de um processo autocatalítico na presença dos carboxilatos terminais. Ao final do processo, ocorre a degradação massiva em moléculas hidrossolúveis com a liberação dos ácidos láctico e glicólico. Esses ácidos são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água. A presença dos ácidos, provenientes da degradação do PLGA, acarretam o aumento da acidez no local de administração, com a possibilidade da irritação do tecido circundante, bem como da degradação dos fármacos dispersos na matriz polimérica (GENTILE *et al.*, 2014; KAPOOR *et al.*, 2015; NAVES *et al.*, 2017).

A preparação de sistemas biodegradáveis requer o controle de diversas variáveis para que a cinética de degradação do polímero *in vivo* seja constante com a liberação controlada do fármaco. A cinética de degradação varia em função da massa molecular, da razão entre os ácidos glicólico e láctico, da estereoquímica, da morfologia do sistema, da cristalinidade e do tipo do grupo funcional terminal. O polímero com maior proporção de ácido láctico é menos hidrofílico e se degrada mais lentamente, o que ocorre pela presença do grupamento metila lateral presente na molécula (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005; GENTILE *et al.*, 2014; JAIN, 2000; NAVES *et al.*, 2017).

O PLGA, em suas diferentes razões molares, é o polímero mais utilizado no processo de obtenção de nanofibras por eletrospinning em função de suas propriedades mecânicas. O PLGA demonstrou segurança em estudos toxicológicos, quando utilizados em sistemas obtidos por nanotecnologia, com a ocorrência de reações locais leves (MAKADIA; SIEGEL, 2011; NAVES *et al.*, 2017).

### **3.1.5 Planejamento e otimização de experimentos**

O planejamento de experimentos (DoE, do inglês *Design of Experiments*) é uma ferramenta utilizada para triagem de parâmetros críticos em processos de produção,

em otimização e identificação do ponto ideal, bem como na determinação da robustez de métodos e processos. A metodologia, desenvolvida por Ronald A. Fisher nos anos 30, pode ser aplicada a sistemas, processos ou produtos. É utilizada para planejar e conduzir experimentos bem como analisar e interpretar os dados obtidos dos experimentos. Fundamenta-se na aplicação da estatística em experimentos, nos quais variáveis estabelecidas (X) são racionalmente modificadas, de forma a investigar os seus respectivos efeitos nas respostas de interesse (Y). A metodologia deve ser estatisticamente avaliada por regressão e Análise de Variância (ANOVA) (DURAKOVIC, 2017; SCHLINDWEIN; GIBSON, 2018) .

A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) foi desenvolvida por Box e Wilson em 1951, para otimizar os processos de fabricação na indústria química. O objetivo era, inicialmente, aumentar o rendimento e pureza de reações de síntese, bem como a redução dos custos. A RSM é um tipo de DoE amplamente utilizado em vários segmentos e consiste em um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas, baseada no ajuste de modelos empíricos aos dados experimentais obtidos, quando analisados frente ao desenho experimental (DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017).

Podem ser aplicadas funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, explorar diversas condições experimentais visando a sua otimização. As etapas da RSM como ferramenta para otimização são: (a) seleção de variáveis independentes, (b) escolha do desenho experimental e execução de ensaios, (c) tratamento matemático e estatístico necessário ao ajuste da função, (d) avaliação da adequação do modelo, (e) deslocamento para a região ótima, e (f) obtenção dos valores para cada variável estudada (DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017).

Entre os tipos de RSM, o planejamento de composto central (CCD, do inglês *central composite design*) é um dos mais utilizados, sendo capaz de gerar modelos quadráticos completos. O CCD consiste na combinação de um planejamento fatorial com, no mínimo, dois pontos axiais e um ponto central (BEZERRA *et al.*, 2008; DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017; DURAKOVIC, 2017) .

O CCD é constituído de planejamento fatorial completo ou fatorial fracionário; planejamento adicional, geralmente em que os pontos experimentais estão a uma distância  $\alpha$  de seu centro; e ponto central. A quantidade e posições dos pontos axiais são definidos em função do número de variáveis. Os pontos axiais posicionam-se a uma distância de  $-\alpha$  a  $+\alpha$  em relação ao centro, sendo que  $\alpha$  pode variar de 1 a  $\sqrt{k}$ . Usualmente,  $\alpha$  pode ser calculado utilizando  $\alpha = \sqrt{k}$  para a condução de um delineamento esférico e a avaliação de uma faixa mais ampla (BEZERRA *et al.*, 2008; DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017; DURAKOVIC, 2017);

Cada variável é avaliada em 5 níveis ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ) com número total de experimentos calculado conforme a **Equação 1** (BEZERRA *et al.*, 2008; DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017; DURAKOVIC, 2017):

$$\text{Número de experimentos} = 2^k + 2k + C_0$$

**Equação 1**

Em que:

$k$ : número de variáveis e

$C_0$ : número de replicatas do ponto central.

É aconselhável adotar entre 3 e 5 replicatas do ponto central, para que se estime o erro puro e com variância homogênea das respostas, bem como a avaliação das propriedades de rotabilidade, ortogonalidade e bloqueio ortogonal (BEZERRA *et al.*, 2008; DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017; DURAKOVIC, 2017).

O **Quadro 8** relaciona a utilização do DoE em obtenção de sistemas, otimização de processo e desenvolvimento de modelo matemático nas áreas de alimentos, síntese química, química inorgânica e química de materiais, com pesquisa na base de dados Web of Science®, utilizando como termos e combinações booleanas: *nanofiber AND ccd and "response surface" and pol\** (webofknowledge.com).

**Quadro 8 - Aplicação de CCD na otimização e desenvolvimento de nanofibras.**

Objetivo do estudo	Composição	Número de experimentos	Fatores, níveis e resposta	Referência
Predizer parâmetros de eletrofiiação para poliamida.	Nanofibras de PA6	26	4 fatores: campo elétrico, concentração do polímero, vazão e distância do coletor. 3 níveis: -1, 0, +1. Resposta: diâmetro.	(NADERI <i>et al.</i> , 2008)
Investigação experimental de 6 fatores simultaneamente.	Nanofibras de TiO <sub>2</sub>	53	6 fatores: distância, voltagem, vazão, concentração do polímero, percentual de TIIF e pH 5 níveis: - $\alpha$ , -1, 0, +1 e + $\alpha$ . Resposta: diâmetro da fibra e presença de partículas.	(SARLAK <i>et al.</i> , 2012)
Catalisador da oxidação da tetraciclina.	Nanofibras de TiO <sub>2</sub>	20	3 fatores: concentração de tetraciclina, tempo e pH da reação. 5 níveis: - $\alpha$ , -1, 0, +1 e + $\alpha$ . Resposta: eficiência de remoção de tetraciclina.	(JAVID <i>et al.</i> , 2013)
Predizer parâmetros de eletrofiiação para PVP.	Nanofibras de PVP	38	4 fatores: concentração de PVP, voltagem aplicada, distância e tipo de solvente. Níveis: variável. Resposta: diâmetro médio e coeficiente de variação.	(NASOURI; SHOUSHARI; MOJTAHEDI, 2015)
Adsorção de fenol em água.	Nanofibras de CS/PVA	26	4 fatores: proporção entre CS e PVA, voltagem, vazão e distância. 3 níveis: -1, 0, +1. Resposta: adsorção de fenol.	(YOUSEFI ABDOLMALEKI <i>et al.</i> , 2017)
Estabelecer relação entre variáveis da eletrofiiação e o diâmetro das nanofibras.	Nanofibras de PAA	30	4 fatores: concentração, voltagem, distância entre agulha e coletor e vazão. 5 níveis: - $\alpha$ , -1, 0, +1 e + $\alpha$ . Resposta: diâmetro das nanofibras.	(EBADI; FAKHRALI; SEMNANI, 2019)
Precursor inorgânico.	Nanofibras de PVP-BHf	50	5 fatores: concentração do polímero, vazão, distância entre agulha e coletor, e razão molar (B/Hf). 5 níveis: - $\alpha$ , -1, 0, +1 e + $\alpha$ . Respostas: diâmetro médio, qualidade e uniformidade das nanofibras.	(GHELICH <i>et al.</i> , 2019)

PA: poliamida; TiO<sub>2</sub>: dióxido de titânio; PAN: poliácridonitrila; PAA: ácido poliácrico; CS: quitosana; PVA: álcool polivinílico; PVP: polivinilpirrolidona; B: boro; Hf: Háfio; TIIF: tetraisopropóxido de titânio. **Fonte:** Web of Science®, 2021.

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1 Material

Acetato de sódio triidratado (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Acetonitrila grau cromatográfico (Tedia - Fairfield, OH, USA).

Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Ácido clorídrico (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Água ultrapura, obtida de um sistema de purificação de água RiOs® Essential Water Purification System (Bedford, MA, USA).

Álcool etílico absoluto (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Álcool etílico grau cromatográfico (Tedia - Fairfield, OH, USA).

Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.

Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.

Bomba de vácuo LABOPORT KNF N842.

Cloreto férrico (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Clorofórmio grau cromatográfico (Tedia - Fairfield, OH, USA).

Coluna Acquity C<sub>18</sub> 2,1 µm, 50 mm e 1,7mm.

Diclorometano grau cromatográfico (Tedia - Fairfield, OH, USA).

Filtros de seringa de PVDF com tamanho de poro de 0,22 µm.

Fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Frascos tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone.

Furoato de mometasona substância química de referência (SQR) USP lote I0L395, e teor de 99,30%.

Furoato de mometasona, Lote MTF/1115005M2, validade 06/2020, Fabricante Unimax Laboratories Ltd. Índia.

Hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

N-N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Polímero dos ácidos (D,L-láctico-co-glicólico) 75:25 Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha (RESOMER® RG 755 S, viscosidade: 0.50-0.70 dL/g, terminação éster).

Tetraidrofurano (Sigma-Aldrich - São Paulo, SP, Brasil).

Vidraria e instrumentação laboratorial.

### 3.2.2 Métodos

#### 3.2.2.1 Preparo das nanofibras contendo furoato de mometasona

As nanofibras de PLGA contendo o FM foram obtidas por eletrofiação tradicional com uma única agulha (CHEW *et al.*, 2006; THAKKAR; MISRA, 2017; XUE *et al.*, 2019).

Quantidades exatas para o preparo de 5 mL das soluções de FM e PLGA (na proporção de 1:9) de PLGA 75:25 e furoato de mometasona foram dissolvidas em solução de tetraidrofurano e N,N-dimetilformamida, com o auxílio de um agitador magnético. Após a completa solubilização, as soluções foram mantidas sob agitação, em temperatura ambiente, por 12 horas.

A eletrofiação da solução foi realizada utilizando o equipamento específico (INSTOR - Sistemas de Inspeção Robótica, instalado no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) da UFMG.

A solução foi inserida em uma seringa de vidro de 5 mL (Arti Gass CE, Italy) com agulha metálica sem bisel (23G) e acoplada ao sistema de ejeção. Esse sistema com velocidade regulável e controlada, foi configurado para uma vazão de 12,5 mL/h e uma diferença de potencial elétrico equivalente a + 25/0 kV foi aplicada entre a agulha e o coletor. O terminal positivo da fonte de alta tensão foi conectado à ponta da agulha, e o terminal negativo foi conectado ao coletor giratório automatizado (8 cm de diâmetro), posicionados a uma distância de 15 cm.

Durante o processo, garantiu-se que toda solução preparada fosse consumida para a formação das nanofibras. As nanofibras foram cortadas nas dimensões 0,5 cm × 0,5 cm para garantir uma dose de 100 µg, em cada.

As nanofibras de PLGA (sem furoato de mometasona) foram processadas nas mesmas condições das nanofibras contendo FM, após a determinação da concentração do polímero e proporção dos solventes ideais, na otimização pelo planejamento experimental.

### 3.2.2.2 Estudos de otimização das nanofibras contendo furoato de mometasona

A composição das nanofibras foi otimizada com o planejamento de composto central. Os fatores (variáveis), composição do solvente e concentração do PLGA, foram avaliados em 3 níveis e com o ponto central em triplicata. As nanofibras foram preparadas e processadas conforme descrito na **Tabela 1** e no item **3.2.2.1**. Durante o preparo, as nanofibras foram preparadas com o FM, na proporção de 1:9, em relação ao PLGA.

**Tabela 1 - Níveis e fatores empregados nos estudos de otimização.**

Fatores	Níveis ( $\alpha = 1$ )		
	-1	0	+1
Concentração do PLGA (%)	20	25	30
Proporção dos solventes (THF:DMF)	1:3	1:1	3:1

THF: tetraidrofurano; DMF: N,N-dimetilformamida.

As melhores condições do processo de eletrofiação foram selecionadas a partir dos diâmetros médios das nanofibras, utilizando o software Design-Expert® Versão 12 (DEAN; VOSS; DRAGULJIC, 2017). A partir disso, foram determinadas a concentração de polímero e da razão entre os solventes da mistura binária para o processamento do sistema ideal.

O processo de esterilização do produto foi realizado por radiação gama. As nanofibras obtidas com o FM e o placebo, foram submetidas à radiação gama, dose de 10 kGy utilizando uma fonte de energia de cobalto 60 em temperatura ambiente e mesa giratória por um tempo de 133 min.

### 3.2.2.3 Caracterização das nanofibras contendo furoato de mometasona

#### 3.2.2.3.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanofibras (**Tabela 2**) foi obtida por MEV (FEI Quanta 200 FEG). As amostras foram montadas, individualmente, em um *stub* metálico e revestidas com



ouro usando um aplicador de pulverização catódica. As imagens foram obtidas, após a aplicação de uma voltagem de aceleração de 10 kV.

**Tabela 2 - Condições de processamento das nanofibras contendo FM-PLGA.**

Experimento	Proporção dos solventes (THF:DMF)	Concentração de PLGA (% p/v)
a	75:25	30
b	50:50	30
c	25:75	30
d	75:25	25
e (*)	50:50	25
f	25:75	25
g	75:25	20
h	50:50	20
i	25:75	20

THF: tetraidrofurano; DMF: N,N-dimetilformamida; e (\*) ponto central, em triplicata.

O diâmetro médio das nanofibras foi determinado utilizando o software de análise de imagem (ImageJ, *National Institutes of Health*, EUA) pela medida de 50 fibras do produto obtido em cada experimento (DA SILVA *et al.*, 2019).

As fibras foram selecionadas aleatoriamente e medidas nas imagens ampliadas em 1800 vezes e barra de escala 10  $\mu\text{m}$ , e a partir delas, foram calculados os valores médios, o desvio padrão e elaborado os histogramas com o perfil de diâmetro.

### 3.2.2.3.2 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG das nanofibras contendo FM-PLGA, nanofibras de PLGA, do PLGA e do FM foram obtidas usando um DTG-60 Shimadzu® para avaliação da interação do fármaco com a matriz polimérica. Foram pesadas com exatidão, 2 mg de cada amostra em suporte de alumínio. As medições foram realizadas entre 25 e 600 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de N<sub>2</sub> com fluxo de 50 mL/min. As curvas obtidas foram construídas com o software OriginPro 2021® (versão 9.8.0.200).

### 3.2.2.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O comportamento térmico das nanofibras contendo FM-PLGA, nanofibras de PLGA, PLGA e do FM foi investigado utilizando um analisador térmico DSC-60 Shimadzu®. Foram pesadas, com exatidão, 1 mg de cada amostra em suporte de alumínio.

As análises foram processadas com uma razão de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 25 a 350 °C, sob atmosfera de nitrogênio inerte com fluxo de 50 mL/min. Após a conclusão das análises, as curvas foram traçadas utilizando o software OriginPro 2021® (versão 9.8.0.200).

### 3.2.2.3.4 Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas das nanofibras contendo FM-PLGA, nanofibras de PLGA, PLGA e do FM foram coletados em um difratômetro Miniflex 300®, Rigaku. O Equipamento foi parametrizado com uma voltagem de 30 KV, 10 mA, usando filtro de níquel  $k\beta$  0,03, faixa de 4 - 40° (2 $\theta$ ), largura de 0,02° (2 $\theta$ ) e velocidade de 5 graus/min, que é equivalente a 100 etapas/min. Os resultados obtidos foram traçados em um gráfico usando o software OriginPro 2021® (versão 9.8.0.200).

### 3.2.2.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para doseamento e perfil de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona por CLUE

O desenvolvimento e a validação do método analítico para quantificação do FM nas nanofibras e no perfil de liberação foram realizados por cromatografia a líquido de ultra performance (CLUE) em um sistema Agilent 6540 Accurate Mass Q-TOF/MS (EUA).

O cromatógrafo é equipado com uma fonte ESI, uma bomba quaternária, amostrador automático, detector de arranjos de diodos (DAD) e Mass Hunter Workstation Software®. As condições experimentais estão relacionadas no **Tabela 3**.

O tempo morto ( $t_0$ ) foi determinado injetando-se, no cromatógrafo, solução de uracila a 10 µg/mL em fase móvel.

**Tabela 3 - Condições cromatográficas.**

Parâmetros	Especificação
Fase estacionária	C <sub>18</sub> , 2,1 x 50 mm, 1,7 µm
Fase móvel	Acetonitrila e água (50:50; v/v)
Eluição	Isocrática
Concentração da solução padrão e da amostra (100%)	50 µg/mL
Vazão	0,55 mL/minuto
Volume de injeção	1,3 µL
Temperatura da coluna	35 °C
Comprimento de onda de detecção	254 nm
Assimetria	≤ 2

O preparo das soluções padrão e amostra foram realizados conforme descritos a seguir:

*Solução padrão de furoato de mometasona:* aproximadamente 5 mg de FM SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 500 µg/mL. Transferiu-se 1 mL da solução preparada anteriormente para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi ajustado, obtendo-se concentração de 50 µg/mL.

*Solução amostra de nanofibras contendo furoato de mometasona 100 µg:* 5 unidades das nanofibras cortadas nas dimensões 0,5 cm x 0,5 cm, com dose de 100 µg, em cada, foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi ajustado com acetonitrila e submetido a banho ultrassônico por dez minutos, obtendo-se concentração teórica de 50 µg/mL de furoato de mometasona.

Os parâmetros avaliados na validação do método de doseamento e do perfil de liberação das nanofibras contendo FM foram exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), seletividade, linearidade, intervalo e robustez (ANVISA, 2017; FDA, 2015; ICH, 2005).

A linearidade do método foi demonstrada pela avaliação das respostas analíticas em função das concentrações de furoato de mometasona, no intervalo de 5,0 a 65,0 µg/mL. As soluções padrão estoque (SPE) foram preparadas em triplicata e diluídas para se obter treze níveis de concentração, igualmente espaçados (**Tabela 4**) para

validação dos métodos de doseamento e de perfil de liberação *in vitro* (ANVISA, 2017; EURACHEM, 1998; FDA, 2015).

**Tabela 4 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade**

Intervalo (%)	Volume da SPE (mL)	Fase móvel q.s.p (mL)	Concentração de furoato de mometasona (µg/mL)
10,0	0,1	10	5,00
20,0	0,2	10	10,00
30,0	0,3	10	15,00
40,0	0,4	10	20,00
50,0	0,5	10	25,00
60,0	0,6	10	30,00
70,0	0,7	10	35,00
80,0	0,8	10	40,00
90,0	0,9	10	45,00
100,0	1,0	10	50,00
110,0	1,1	10	55,00
120,0	1,2	10	60,00
130,0	1,3	10	65,00

Preparo da SPE: Foram transferidos 5,0 mg de furoato de mometasona, exatamente pesados, para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel.

As soluções diluídas foram preparadas a partir das soluções padrão estoque utilizando-se uma micropipeta 1,0 µL. Cada solução padrão estoque deu origem a treze soluções totalizando trinta e nove soluções. As soluções foram preparadas, filtradas, transferidas para *vials* e injetadas cinco vezes, aleatoriamente no equipamento.

Os resultados de área em função da concentração obtidos nos cromatogramas e a presença de valores dispersos (*outliers*) foram avaliados pelo teste de resíduo padronizado de *Jackknife*. É permitida a exclusão de 22% dos dados da curva original. Para avaliar a correlação linear entre as área e concentrações dos analitos, foi empregada a regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) (ANVISA, 2017).

O MMQO parte das premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, possuem variância constante ao longo do eixo das abscissas e são independentes. Para avaliação das premissas, foram realizados os testes estatísticos *Ryan-Joiner* para avaliação da normalidade, *Levene modificado por Brown e Forsythe* para avaliar homocedasticidade e *Durbin-Watson* para avaliação da independência

dos resíduos da regressão. Foi aplicada a Análise de variância (ANOVA) para avaliar se a regressão é significativa (5%) utilizando o software Origin Pro 2021® (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A curva analítica foi construída correlacionando os valores das áreas médias sob o pico do FM com cada nível de concentração após tratamento de *outliers*, em função da concentração. Foram avaliados o gráfico de dispersão dos resíduos, a equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo MMQO, avaliação dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r<sup>2</sup>), sendo que o valor obtido de “r” deve estar acima de 0,990. Para a avaliação da significância do coeficiente angular foi aplicado o teste F de ANOVA. (ANVISA, 2017; FDA, 2015; ICH, 2005).

O parâmetro precisão foi avaliado por meio da repetibilidade e da precisão intermediária. Foram realizadas seis determinações em dois dias diferentes e executadas por dois analistas diferentes em 100% (cem por cento) equivalente a 50 µg/mL de furoato de mometasona em solução (padrão e amostra) preparadas de forma independente (ANVISA, 2017).

Após a avaliação das áreas dos cromatogramas, foi avaliada a dispersão dos resultados, pelo cálculo do desvio padrão relativo, utilizando a **Equação 2**:

$$C.V. = \frac{DM}{CMD} \times 100$$

**Equação 2**

Onde:

C.V. é desvio padrão relativo (%),

DM é o desvio padrão, e

CMD é a concentração média determinada.

Para a demonstração da precisão intermediária, foi utilizado o teste *t* de *Student*, para a avaliação das diferenças estatísticas das médias para cada nível. De acordo com a RDC 166/2017, os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e do analito na amostra (ANVISA, 2017). O critério de aceitação é o valor de

C.V. calculado inferior a 7,3%, estabelecido em função da concentração do analito em solução, de acordo com *AOAC INTERNATIONAL and Official Methods of Analysis - Guidelines for Standard Method Performance Requirements* (AOAC, 2016).

No parâmetro exatidão, a análise para doseamento foi conduzida pelo método de adição de solução padrão estoque de FM (SQR) à solução as amostras de placebo em três concentrações: baixa (80,0%), média (100,0%) e alta (120,0%), preparadas em triplicata. Para avaliar a exatidão do método de perfil de liberação, foram analisadas em três concentrações: baixa (5,0 µg/mL), média (15,0 µg/mL) e alta (25,0 µg/mL), preparadas em triplicata. Foram avaliadas as concordâncias entre os resultados individuais a partir dos valores das áreas sob o pico atribuído ao FM (ANVISA, 2017).

A relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra e a concentração teórica correspondente foi calculada (ANVISA, 2017), conforme **Equação 3**.

$$R = \frac{CME}{CT} \times 100$$

### Equação 3

Onde,

R é a recuperação do fármaco em %,

CME é a concentração média experimental, obtidas pelas áreas de cada nível de concentração (µg/mL), e

CT é a concentração teórica (µg/mL).

Para que o método seja considerado exato, os valores para a recuperação média em cada nível de concentração devem estar entre 80,0% e 110,0% (ANVISA, 2017; AOAC, 2016).

A seletividade do método foi demonstrada pela avaliação das purezas espectrais dos picos de interesse relativos ao FM, obtidos nos cromatogramas com auxílio do detector DAD, na presença de componentes presentes nas amostras degradadas.

As análises foram realizadas com as soluções padrão e amostra a 50,00 µg/mL, fase móvel, nanofibras de PLGA e fluido nasal simulado. As condições de degradação forçada foram hidrólise ácida (ácido clorídrico M), hidrólise alcalina (hidróxido de sódio 0,1 M), oxidação (peróxido de hidrogênio 3% v/v), fotólise e íons metálicos durante 7 dias, misturadas em proporções iguais (**Tabela 5**) (ANVISA, 2015a, 2015b, 2017; ICH, 2003).

**Tabela 5 - Condições de degradação forçada**

Analitos	Condição de degradação	Procedimento em temperatura ambiente por 7 dias
(1) 0,5 mL da SPE de FM (2) 0,5 mL de solução amostra de nanofibras contendo FM-PLGA (3) 0,5mL de solução amostra de nanofibras de PLGA	Hidrólise alcalina	Adição de 0,5 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, protegido da luz.
	Hidrólise ácida	Adição de 0,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e protegido da luz.
	Oxidação	Adição de 0,5 mL de peróxido de hidrogênio a 3% e protegido da luz.
(4) 10 mg de furoato de mometasona SQR, controle e exposta (5) nanofibras contendo FM-PLGA, controle e exposta	Íons metálicos	Adição de 0,5 mL de cloreto férrico ao analito e protegido da luz.
	Fotólise	Armazenamento em câmara de fotoestabilidade

Decorrido o tempo especificado, as soluções degradadas foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com fase móvel e a análise foi realizada conforme procedimento descrito no item **3.2.2.1.4**.

A robustez foi avaliada utilizando planejamento fatorial fracionário de 5 variáveis ( $2^{5-1}$ ) com ponto central em triplicata. As variáveis estudadas foram a porcentagem de acetonitrila, o fluxo da fase móvel (mL/min), a temperatura do forno (°C), o comprimento de onda de detecção (nm) e tempo no banho ultrassônico (min). A análise estatística foi realizada para os 19 experimentos, utilizando o software *Design Expert®* Versão 12. As amostras preparadas foram injetadas em triplicata e obtiveram-se o tempo de retenção e área do pico (ANVISA, 2017; FERREIRA *et al.*, 2017; FDA, 2015).

**Tabela 6 - Planejamento fatorial da Robustez com valores codificados.**

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Percentual de acetonitrila na fase móvel	47	50	53
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,50	0,55	0,60
Temperatura do forno (°C)	30	35	40
Comprimento de onda de detecção (nm)	244	254	264
Tempo de solubilização no ultrassom (min)	5	10	15

### 3.2.2.5 Doseamento de furoato de mometasona nas nanofibras

O teor de FM foi avaliado em três lotes de nanofibras, empregando o método validado, descrito no item **3.2.2.1.4**. O ensaio foi realizado em triplicata, as soluções padrão e a amostra foram preparadas na concentração de 50 µg/mL.

### 3.2.2.6 Cinética de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona *in vitro*

A liberação *in vitro* de FM a partir das nanofibras foi realizada em incubadora TE-424 (Tecnal, Brasil). Foram utilizados seis frascos contendo 5 mL de fluido nasal simulado (FNS), preparado com cloreto de sódio 8,77 mg/mL, cloreto de potássio 2,98 mg/mL, cloreto de cálcio diidratado 0,59 mg/mL em água purificada, com uma faixa final de pH entre 5,5 e 6,0 (JUG *et al.*, 2018).

Após a adição de uma amostra das nanofibras (dimensões 0,5 cm x 0,5 cm e dose de 100 µg) em cada frasco, os sistemas ficaram sob agitação de 50 rpm e temperatura fixada em 32 ± 1 °C. Aos 15 e 30 minutos, 1, 2 e 12 horas, 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias, alíquotas de 500 µL de cada amostra foram retiradas com reposição de meio e filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm.

A quantidade de furoato de mometasona liberada foi determinada empregando-se o método validado, descrito no item **3.2.2.1.4**.



### 3.2.2.7 Teste de esterilidade e endotoxina bacteriana

As amostras de nanofibras de PLGA e contendo FM-PLGA foram submetidas ao teste de esterilidade utilizando a técnica de Filtração por Membrana. O meio de cultura fluido de tioglicolato foi incubado a  $32,5 \pm 2,5$  °C para avaliar a presença de bactérias anaeróbicas nas amostras. O meio de cultura caldo de caseína soja foi incubado, com a finalidade de avaliar a presença de leveduras, fungos e bactérias aeróbicas a  $22,5 \pm 2,5$  °C. Durante o período de incubação e após o seu término, as amostras foram avaliadas quanto às evidências macroscópicas de crescimento microbiano por 14 dias. Não havendo crescimento, a amostra sob exame cumpre com o requisito de esterilidade (FARMACOPEIA, 2019).

O teste de endotoxina bacteriana foi aplicado para quantificar endotoxinas de bactérias gram-negativas presentes em amostras, pelo método cinético turbidimétrico. O ensaio é baseado no tempo necessário para a mistura atingir uma absorvância pré-determinada ou turbidez. O teste foi realizado numa temperatura de incubação de  $37 \pm 1$  °C, conforme método estabelecido nas farmacopeias brasileira e americana (FARMACOPEIA, 2019).

### 3.2.2.8 Avaliação da segurança das nanofibras contendo furoato de mometasona *in vivo*

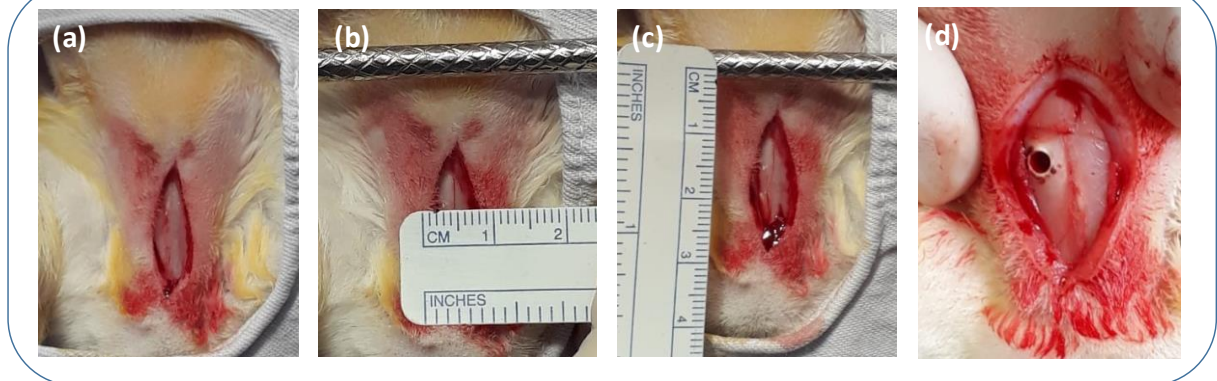
Foram utilizados 18 coelhos fêmeas, albinos, da raça Nova Zelândia, pesando entre 2,0 e 2,5 kg, mantidas no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente controlado com temperatura média de 25 °C, ar condicionado, exaustor de ar e com ciclos de claro/escuro de 12 horas. Não houve restrição de água e a alimentação foi ração animal própria para a espécie.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMRP-USP (Protocolo n° 228/2018 - **Anexo**), e todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o "Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório" (National, 2011).

Os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (20 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (10 mg/Kg). Antes de realizar o procedimento, o dorso nasal de cada animal foi limpo com iodo e, na sequência, a incisão sagital foi realizada a, aproximadamente, 5 cm da linha média do dorso nasal ao periósteo (**Figura 8a**). O periósteo de ambos os lados do dorso nasal foi descolado com descolador de microcirurgia otológica Paparella, expondo a sutura óssea na linha média e as paredes anteriores de ambos os seios maxilares (**Figura 8b**).

Uma osteotomia de 0,5 x 0,5 cm foi realizada com uma broca (**Figura 8c**) com o limite medial de 0,5 cm da sutura óssea na linha média e o limite superior de 1,5 cm abaixo da sutura frontal-maxilar (**Figura 8d**). O aspecto macroscópico da mucosa dos seios maxilares foi observado com o auxílio de um fotóforo.

**Figura 8 - Procedimento cirúrgico para acesso à cavidade nasal de coelhos.**

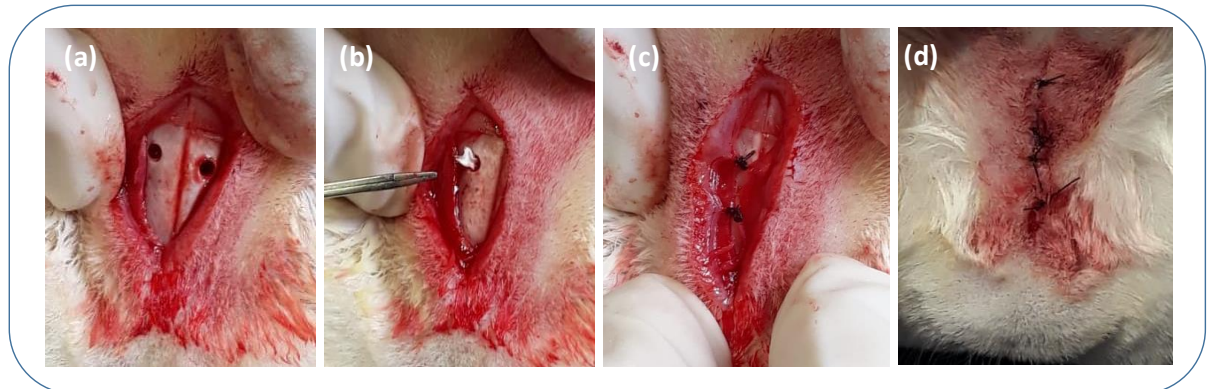


(a) Incisão sagital no dorso do coelho; (b) Incisão sagital de 5 cm até o periósteo; (c) Descolamento do periósteo expondo a sutura óssea na linha média e as paredes anteriores; e (d) Osteotomia no seio nasal direito. **Fonte:** elaborado pela autora.

No seio maxilar esquerdo dos coelhos foram inseridas nanofibras contendo FM-PLGA e no seio maxilar direito (**Figura 9a**) foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico, com a inserção de nanofibras de PLGA (**Figura 9b**).

Após esta etapa, o retalho mucoperiosteal foi suturado com *Vicryl 4.0* para diminuir a invasão dos tecidos no seio da face (**Figura 9c**). A pele foi suturada com fio de *Nylon 4-0* para fornecer abordagem hermética do periósteo e do tecido subcutâneo (**Figura 9d**). O local do procedimento foi limpo com iodo, e os coelhos foram submetidos a injeções intramusculares de cetoprofeno (10 mg/Kg) por dois dias e enrofloxacina (5 mg/Kg) por três dias.

**Figura 9 - Procedimento cirúrgico com a inserção das nanofibras.**



(a) Osteotomia no seio nasal esquerdo; (b) Inserção das nanofibras; (c) Retalho ósseo; e (d) Sutura cutânea. **Fonte:** elaborado pela autora.

Após 14, 30 e 60 dias, seis coelhos de cada grupo foram aleatoriamente escolhidos e eutanasiados sob anestesia geral. A mesoestrutura facial foi removida por ressecção e colocada em formaldeído a 10% para estudo histológico. Para o estudo histológico, as peças foram fixadas em solução de formaldeído (10% p/v), permanecendo por seis dias imersas em solução de ácido nítrico (5% p/v) para descalcificação. Cortes seriados foram feitos do nariz até o crânio a cada dois centímetros e depois desidratados, clarificados e imersos em parafina. As amostras foram cortadas em um micrótomo em fatias de 5  $\mu$ m de espessura e coradas em hematoxilina-eosina para avaliar os padrões inflamatórios da mucosa nasal. As lâminas foram analisadas pelo mesmo patologista por meio de abordagem semiquantitativa. O patologista desconhecia o grupo a que pertencia o espécime e, posteriormente, era classificado de acordo com os critérios de inflamação adotados (OZCAN *et al.*, 2011; PEREZ *et al.*, 2012):

0 = sem inflamação;

1 = inflamação leve (células inflamatórias dispersas, sem lesão epitelial evidente);

2 = inflamação moderada (infiltrado inflamatório difuso na lâmina própria, sem formação de agregados inflamatórios, presença de lesão de células epiteliais focais caracterizada por células epiteliais rompidas desorganizadas);

3 = inflamação grave (infiltrado inflamatório difuso denso com a formação de agregados inflamatórios e lesão de células epiteliais difusas caracterizada por células epiteliais rompidas desorganizadas). O software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*®) versão 19.0 foi usado para análise estatística, empregando um nível de significância estatística de 5%.

### 3.3 Resultados e discussão

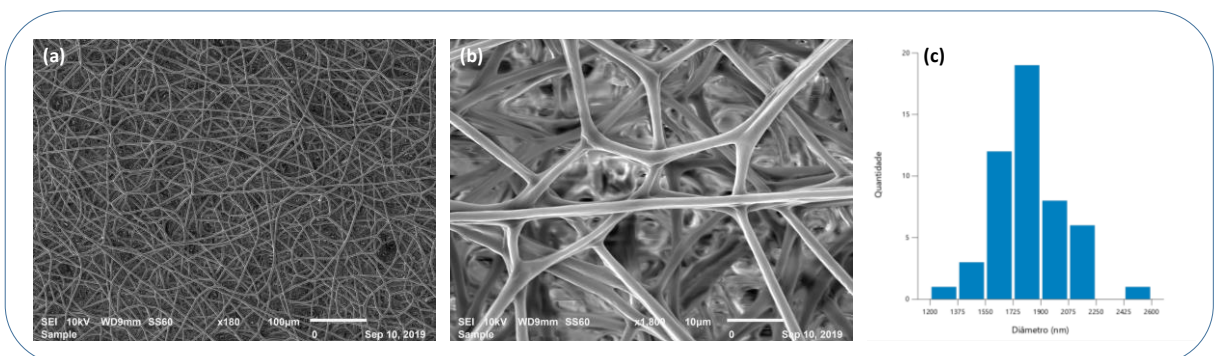
#### 3.3.1 Estudos de otimização das nanofibras contendo furoato de mometasona

A otimização da formulação das nanofibras foi realizada por planejamento de composto central. Foram selecionados dois fatores (concentração de polímero e proporção de solventes) e três níveis (-1, 0 e +1) para determinar a melhor condição com a realização de 11 experimentos, com as variáveis independentes.

A avaliação estatística do projeto experimental, considerando como resposta o valor do diâmetro médio das nanofibras, sugeriu um modelo quadrático pelo software Design-Expert® Versão 12. A morfologia das nanofibras foi analisada em duas magnitudes, tendo em vista a importância da avaliação de sua uniformidade. Os aumentos utilizados foram de 180x - barra de escala 100  $\mu\text{m}$  e em 1800x - barra de escala 10  $\mu\text{m}$ .

As imagens presentes na **Figura 10** foram obtidas com a solução de PLGA a 30% e 75% de THF na proporção dos solventes. Houve a formação de nanofibras com diâmetro médio de  $1816,36 \pm 221,26$  nm e C.V. de 12,18%, bem formadas e sem a ocorrência de partículas.

**Figura 10 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (a).**

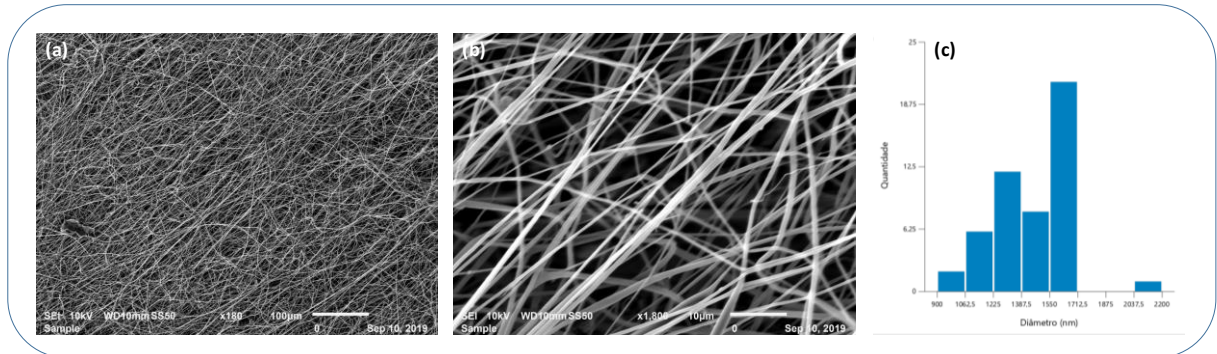


(a): 180x - barra de escala 100  $\mu\text{m}$ ; (b): 1800 x barra de escala 10  $\mu\text{m}$ ; (c) histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

A **Figura 11** apresenta nanofibras com diâmetro médio de  $1470,66 \pm 223,58$  nm e C.V. de 15,20%, preparadas pela eletrofiação da solução de PLGA a 30% e THF a 50% na

proporção dos solventes. As nanofibras apresentaram uma tendência ao alinhamento e não ocorreu a formação de partículas.

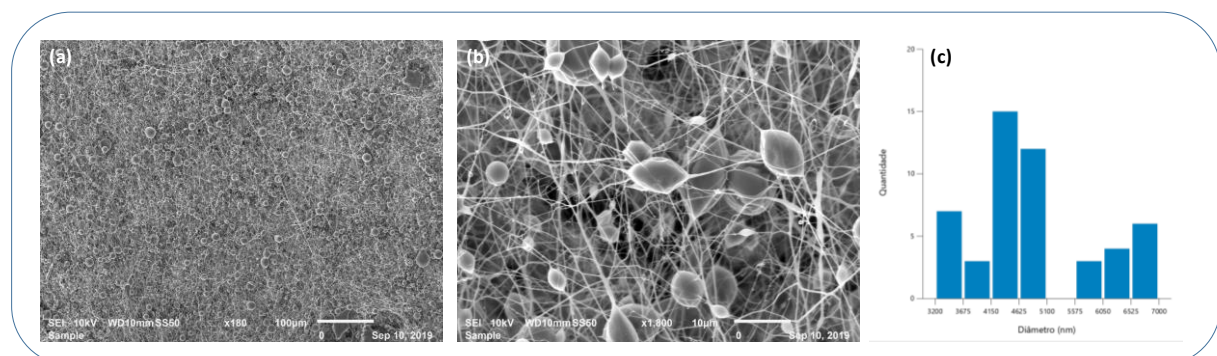
**Figura 11 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (b).**



(a): 180x - barra de escala 100 µm; (b): 1800 x barra de escala 10 µm; (c) histograma. **Fonte:** elaborado pelo autora.

As imagens presentes na **Figura 12** foram obtidas com a solução de PLGA a 30% e 25% de THF na proporção dos solventes. Foram observados diâmetros de partículas equivalentes a  $4,85 \pm 1,00 \mu\text{m}$  e C.V. de 20,66, interconectadas por nanofibras por toda a superfície da manta. Avaliando comparativamente os resultados dos experimentos (a), (b) e (c), que têm a mesma quantidade de polímero, observou-se que a redução da quantidade de tetraidrofurano da solução contribuiu substancialmente para o aumento do diâmetro da fibra e para a formação de partículas.

**Figura 12 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (c).**

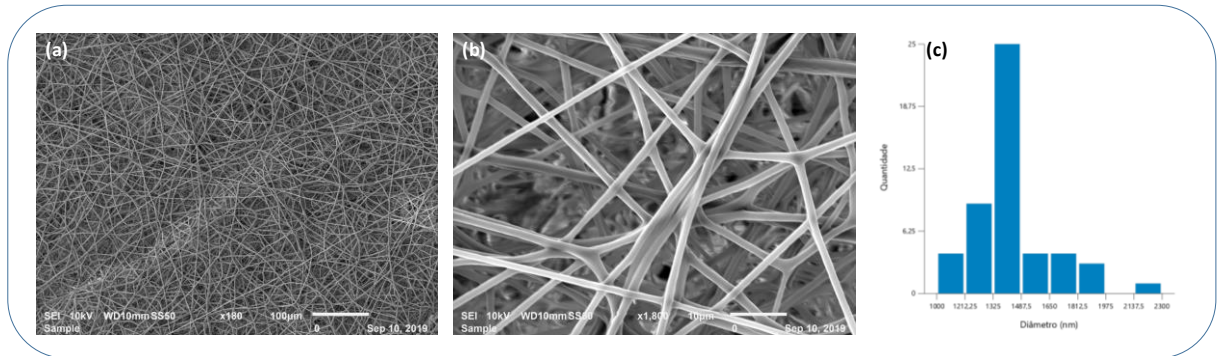


(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800 x barra de escala 10 µm; (c) histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

A **Figura 13** apresenta nanofibras com diâmetro médio de  $1441,94 \pm 221,00 \text{ nm}$  e C.V. de 15,33%, preparadas pela eletrofiação da solução de PLGA a 25% e THF a 75% na

proporção dos solventes. As nanofibras foram distribuídas uniformemente sobre o coletor com a ausência de partículas.

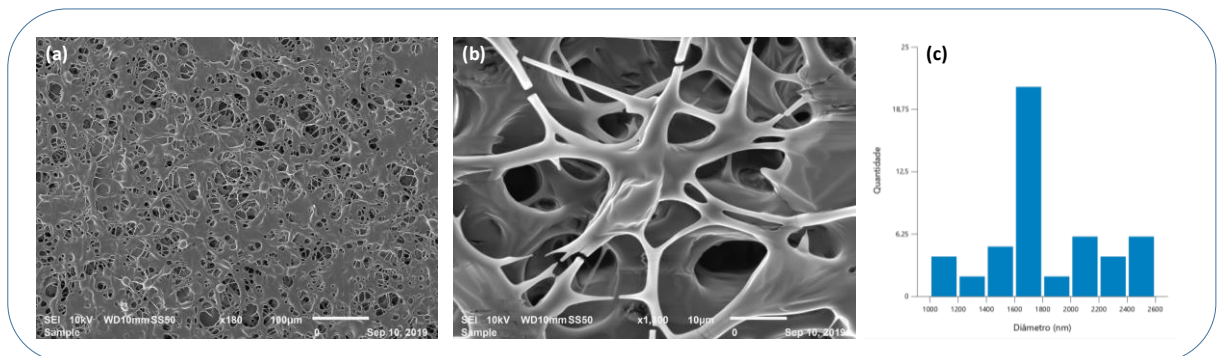
**Figura 13 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (d).**



(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800 x barra de escala 10 µm; e (c) histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

A **Figura 14** apresenta nanofibras com diâmetro médio de  $1839,87 \pm 394,87$  nm e C.V. de 21,47%, preparadas pela eletrofiação da solução de PLGA a 25% e THF a 50% na proporção dos solventes.

**Figura 14 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (e).**

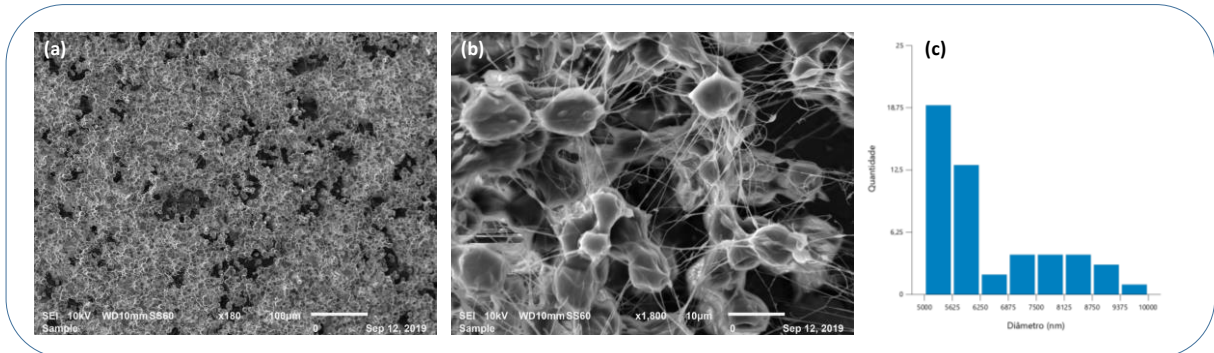


(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800 x barra de escala 10 µm; e (c) histograma. **Fonte:** elaborada pela autora.

As imagens presentes na **Figura 15** foram obtidas com a solução de PLGA a 25% e 25% de THF na proporção dos solventes. Foi observada a formação de partículas interconectadas por nanofibras, com diâmetro médio equivalente a  $6,43 \pm 1,30$  µm e C.V. de 20,30%.

Com redução da quantidade de tetraidrofurano nos experimentos (d), (e) e (f) com 25% de PLGA houve um aumento progressivo do diâmetro da nanofibras e na formação de partículas.

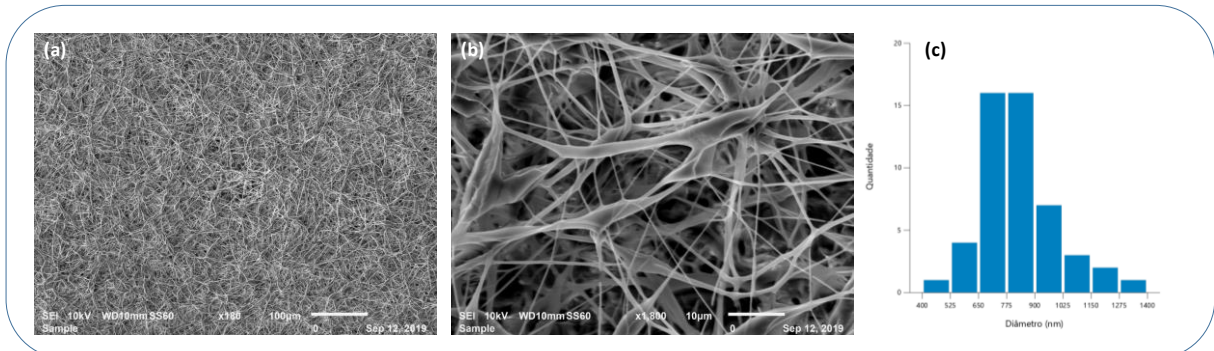
**Figura 15 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (f).**



(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800 x barra de escala 10 µm; e (c) histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

A **Figura 16** apresenta as nanofibras com diâmetro médio de  $818,04 \pm 165,24$  nm e C.V. de 20,20%, preparadas pela eletrofiação da solução de PLGA a 20% e THF a 75% na proporção dos solventes. As nanofibras foram distribuídas uniformemente, com diâmetro variável ao longo da mesma fibra, com ausência de partículas.

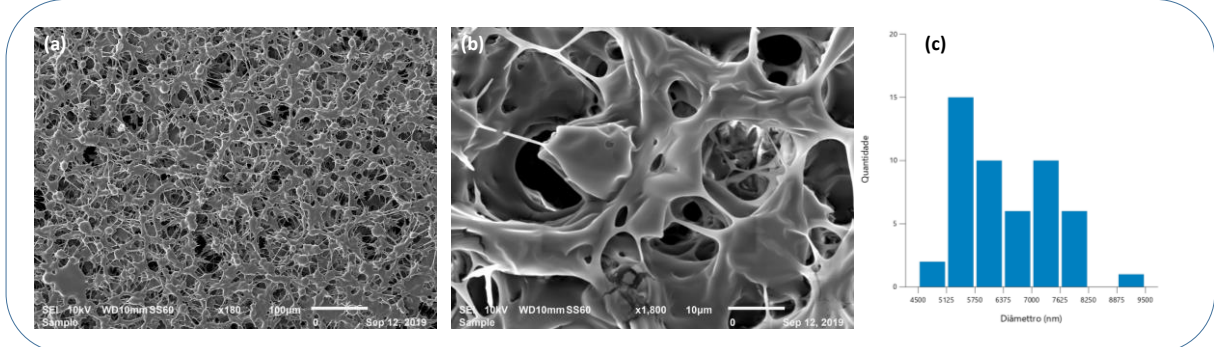
**Figura 16 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (g).**



(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800 x - barra de escala 100 µm; e (c) histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

A **Figura 17** apresenta as nanofibras com diâmetro médio de  $6449,18 \pm 1028,74$  nm e C.V. de 15,95%, preparadas pela eletrofiação da solução de PLGA a 20% e THF a 50% na proporção dos solventes. Observa-se a ocorrência de aglomeração das nanofibras com as partículas. O experimento (i) foi preparado e ao ser inserido na seringa não apresentou uma vazão constante, acarretando a não formação das nanofibras. Na concentração de 20% de polímero, a redução da concentração de tetraidrofurano reduz a possibilidade de formação das nanofibras.

**Figura 17 - Micrografias das nanofibras contendo FM-PLGA, experimento (h).**



(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800 - x barra de escala 10 µm; e (c) histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

Durante a análise estatística, utilizado o Software Design Expert 12®, o modelo ajustado ignorou dois pontos durante a análise estatística, cujos valores estão tachados na **Tabela 7**. Foi realizado a ANOVA para o modelo quadrático, sendo significativa (p-valor (0,0002) menor que 0,05) e os termos A, B, AB, A<sup>2</sup> e B<sup>2</sup> foram significativos para o modelo, com regressão significativa.

**Tabela 7 - Experimentos realizados no CCD das nanofibras contendo FM-PLGA.**

Experimento	Concentração de tetraidrofurano (%)	Concentração de PLGA (% p/v)	Diâmetro da nanofibra (nm)
†	25	20	-
‡	75	20	818,04
h	50	20	6449,18
f	25	25	6423,14
d	75	25	1441,94
e(*)	50	25	1839,52
e(*)	50	25	1735,30
e(*)	50	25	1694,26
c	25	30	4845,02
a	75	30	1816,36
b	50	30	1470,66

(\*) pontos centrais

O valor F de falta de ajuste (do inglês *Lack of Fit*) de 7,64 não foi significativo em relação ao erro puro, o que confirmou a aplicabilidade do modelo para descrever os dados. O  $r^2$  calculado foi igual a 0,9986 e o  $r^2$  ajustado, 0,9962, com uma relação sinal-ruído maior que 4, permitindo que este modelo estatisticamente adequado para predição, e consequentemente obter os melhores valores da concentração de



polímero e da proporção de solvente. O modelo propôs a **Equação 4** para prever os diâmetros de nanofibras contendo FM-PLGA, no qual:

Y é o diâmetro da nanofibra (nm)

A é a concentração de tetraidrofurano (%)

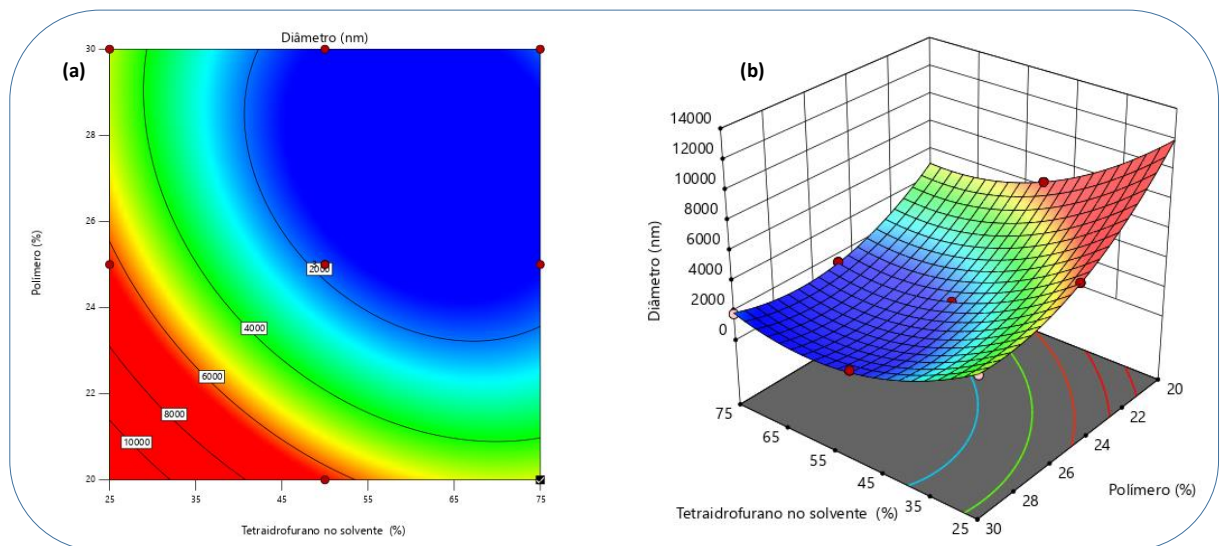
B é a concentração de polímero (%).

$$Y = 89.849,8 - 625,001 \times A - 5.083,21 \times B + 7,81016 \times AB + 3,30123 \times A^2 + 83,626 \times B^2$$

#### Equação 4

Dentre as variáveis independentes, a concentração de tetraidrofurano ocasiona efeito mais pronunciado do que a concentração de polímero na obtenção de nanofibras com diâmetros menores (**Figura 18**).

**Figura 18 - Superfícies de Resposta para o diâmetro das nanofibras contendo FM-PLGA.**



(a) contorno; e (b) superfície tridimensional. **Fonte:** elaborado pela autora.

Liu e colaboradores investigaram a morfologia de nanofibras de PLGA obtidas por eletrospinning, comparando as alterações de concentração de polímero e de solvente. Foram reportados resultados similares aos obtidos no CCD das nanofibras contendo FM-PLGA. A formação de nanofibras com diâmetros maiores ocorreu nas concentrações mais elevadas de polímero e maior percentual de DMF na mistura binária de solventes (LIU *et al.*, 2017). Podemos correlacionar esta elevação, ainda, com aumento da viscosidade na presença de uma concentração maior de polímero. A tensão superficial para formação da gotícula e cone de *Taylor* podem ser alteradas pela presença de forças elétricas e propriedades físico-químicas dos solventes. Ao se

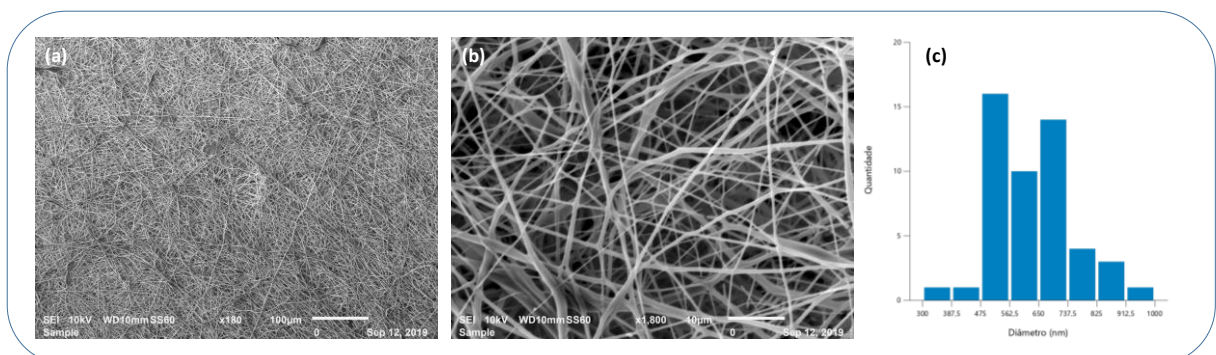
avaliar as características físico-químicas dos solventes, o THF apresenta menores valores de temperatura de ebulição (65 °C), tensão superficial (26,4 dinas/cm, a 25 °C) e constante dielétrica (7,4, a 25 °C) quando comparados à DMF (temperatura de ebulição de 153 °C; tensão superficial: 36,42 dinas/cm, a 25 °C; constante dielétrica, 36,71, a 25 °C).

Como conclusão desta etapa, é possível apontar que os resultados obtidos na RSM (**Figura 18**) relacionados às características físico-químicas do tetraidrofurano, demonstram que o aumento da sua concentração proporciona a fabricação de nanofibras com diâmetros menores (superfície azul do gráfico), decorrente da sua menor interferência no campo elétrico e sua velocidade de evaporação (FONG; CHUN; RENEKER, 1999; LIU *et al.*, 2017, pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.3.2 Preparo do lote ideal das nanofibras contendo furoato de mometasona

O software Design-Expert ® Versão 12 projetou 100 soluções para a fabricação de lotes de nanofibras com diâmetros contidos na faixa de 600 a 800 nm, com base na análise estatística. A composição com 26,66% de polímero e 60,63% de tetraidrofurano em solvente de mistura binária foi selecionada para preparar o lote otimizado. A análise morfológica por MEV, demonstrou a formação de nanofibras sem a formação de partículas e com diâmetro médio de  $620,92 \pm 121,71$  nm e C.V. 19,60% (**Figura 19**).

**Figura 19 - Micrografias das nanofibras otimizadas contendo furoato de mometasona.**



(a) 180x - barra de escala 100 µm; (b) 1800x - barra de escala 100 µm; e (c) respectivo histograma. **Fonte:** elaborado pela autora.

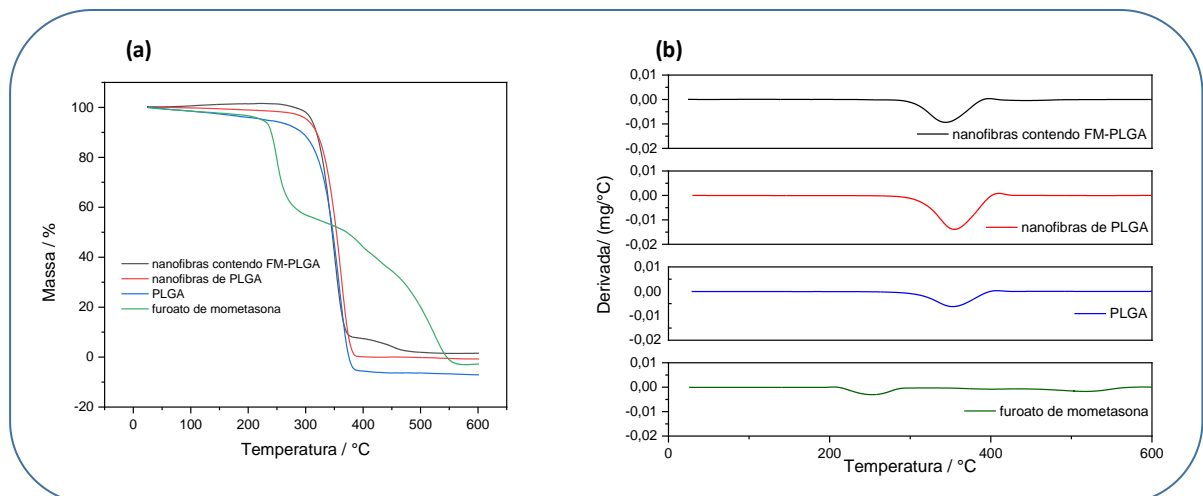
As nanofibras com furoato de metetasona foram codificadas como FM-PLGA e as sem o fármaco de nanofibras de PLGA (controle) e foram processadas com os mesmos parâmetros no processo de eletrofiação.

### 3.3.3 Caracterização das nanofibras

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica que permite avaliar as variações entálpicas de uma substância submetida à alteração controlada de temperatura. A termogravimetria avalia a variação de massa da amostra (perda ou ganho de massa) em função da temperatura e/ou tempo, quando a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Essas técnicas são amplamente utilizadas na avaliação de sistemas poliméricos pois fornecem informações relacionadas à estabilidade e comportamento térmico dos materiais. Os insumos e os produtos foram analisados por TG para avaliação da estabilidade, bem como para consolidar os resultados obtidos por DSC (CHEN; OAKLEY, 1995; FARMACOPEIA, 2019).

Os resultados das curvas termoanalíticas (**Figura 20**) demonstraram que as amostras de nanofibras PLGA e de PLGA possuem um evento endotérmico, relacionado à sua decomposição, enquanto o das nanofibras contendo FM-PLGA apresentaram dois eventos e do FM apresentou três eventos.

**Figura 20 - Curvas TG (a) e DTG (b) em razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.**



Fonte: elaborado pela autora.

As curvas TG/DTG demonstraram que o FM apresenta estabilidade térmica até 210 °C. Após atingir essa temperatura, ocorre a decomposição do fármaco. O processo de decomposição térmica do fármaco ocorre em três etapas, de acordo com as seguintes faixas de temperatura e perdas de massa: 211,0 - 313,0 °C ( $\Delta m = 40,58\%$ ), 313,0 - 425,2 °C ( $\Delta m = 16,81\%$ ) e 425,2 - 567,0 °C ( $\Delta m = 41,74\%$ ).

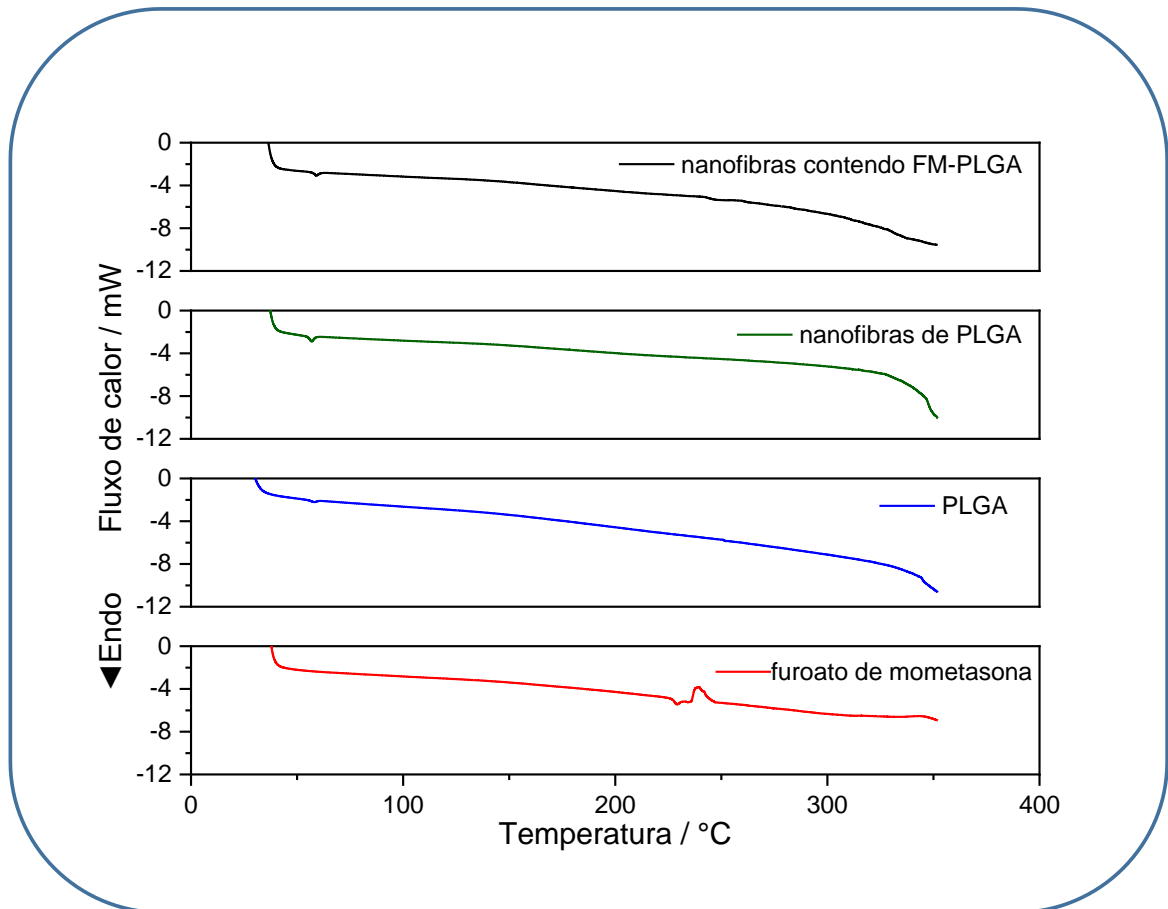
Visto que não houve perda de massa significativa em uma temperatura abaixo do ponto de fusão, o insumo utilizado encontra-se na forma anidra. As curvas do PLGA e das nanofibras de PLGA apresentaram único evento térmico, relacionado à decomposição do polímero: 258,0 a 393,0 °C ( $\Delta m = 99,91\%$ ) e 257,9 a 392,7 °C ( $\Delta m = 98,10\%$ ), respectivamente, que são características do polímero. As curvas TG/DTG das nanofibras contendo FM-PLGA apresentam dois eventos de decomposição 253,2 a 382,5 °C ( $\Delta m = 93,33\%$ ) e 382,5 a 474,8 °C ( $\Delta m = 6,25\%$ ).

A curva DSC de FM (**Figura 21**) mostra dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 229,1 °C e 234,5 °C, seguidos por um evento exotérmico a 238,9 °C. A substância se funde com degradação, na temperatura próxima a 229 °C. Resultados reportados por CHEN e colaboradores, relacionados à perda substancial de massa próxima dessa faixa de temperatura são coerentes com os avaliados neste estudo (CHEN *et al.*, 2005).

As curvas DSC do PLGA e das suas nanofibras apresentam um pico endotérmico em aproximadamente 58 °C associados a temperatura de transição vítrea do polímero. A ausência de mudanças relevantes nos valores de  $T_g$ , fornece subsídios que os solventes THF e DMF foram eliminados durante eletrospinação.

A ausência de evento térmico relacionado ao ponto de fusão do fármaco na curva DSC das nanofibras contendo FM-PLGA pode estar relacionada à internalização do fármaco nas cadeias poliméricas. De acordo com os resultados, sugere-se que ocorrem interações intermoleculares, como as forças de *Van Der Waals*, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre o FM e o PLGA nas nanofibras.

**Figura 21 - Curvas de DSC em razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.**

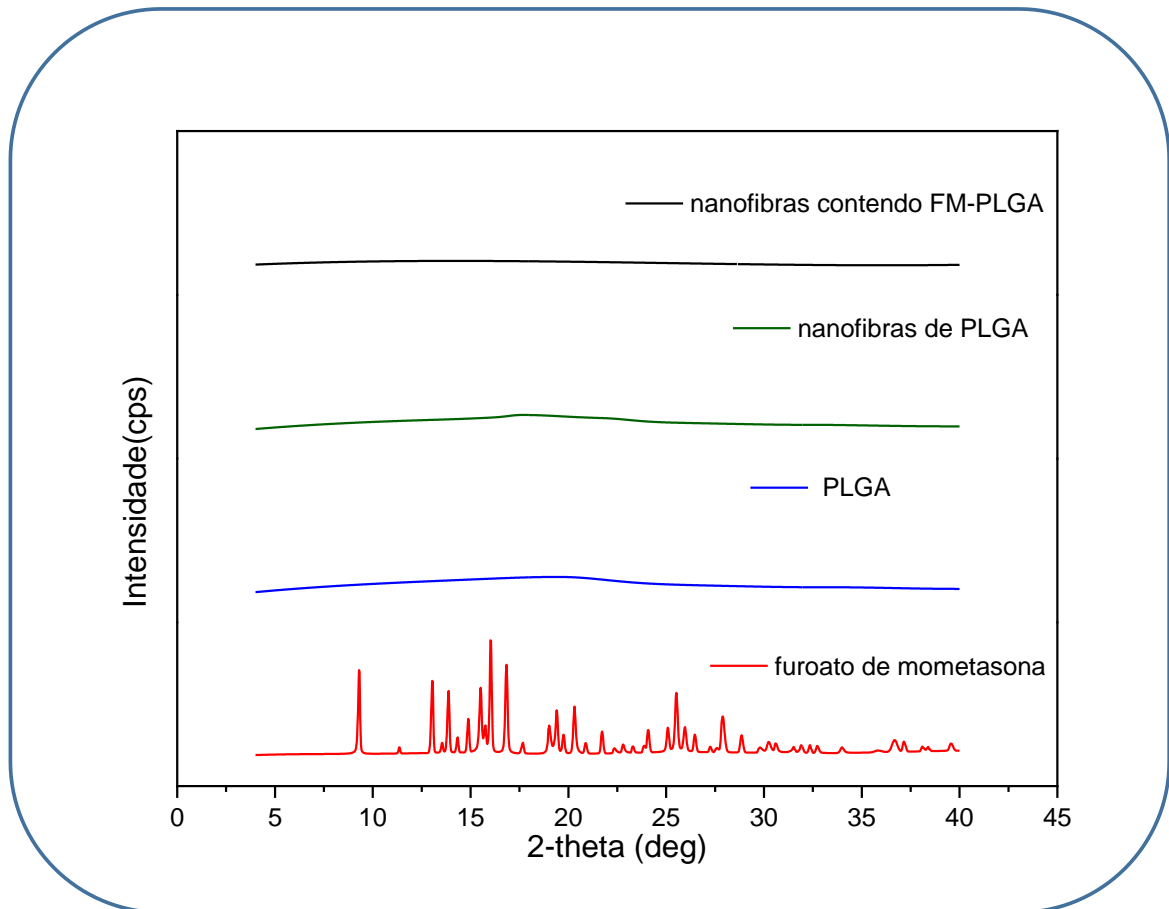


**Fonte:** elaborado pela autora.

A ocorrência das interações está intimamente relacionada ao aparecimento, desaparecimento e deslocamento de sinais nas curvas DSC, corroborando com os resultados obtidos. Os resultados de DSC, em conjunto com os de TG/DTG demonstram a incorporação do fármaco à cadeia polimérica, possivelmente durante o preparo da solução e mantidas durante o processo de eletrofiação (NAVES *et al.*, 2017).

Os difratogramas das nanofibras contendo FM-PLGA, nanofibras de PLGA, PLGA e FM são mostrados na **Figura 22**.

**Figura 22 - Difratomogramas das nanofibras contendo FM-PLGA, de PLGA, FM e do polímero.**



**Fonte:** elaborado pela autora.

O difratograma das nanofibras contendo FM-PLGA não apresentou picos, e sim uma linha de base característica de substâncias amorfas, sugerindo a ocorrência de uma dispersão das moléculas do fármaco entre as cadeias poliméricas. Correlacionando os resultados obtidos no doseamento por cromatografia a líquido com os de DRX, DSC e TGA, o FM incorporado nas nanofibras permaneceu estável.

### **3.3.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para doseamento e perfil de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona por CLUE.**

A linearidade do método de doseamento do FM foi avaliada com a análise de três curvas, no intervalo de 5,0 a 65,0 µg/mL (10,0 a 130,0% da concentração de trabalho). Os resultados de concentração de FM e respectivas áreas nos treze níveis (n=39) igualmente espaçados são mostrados na **Tabela 8**.

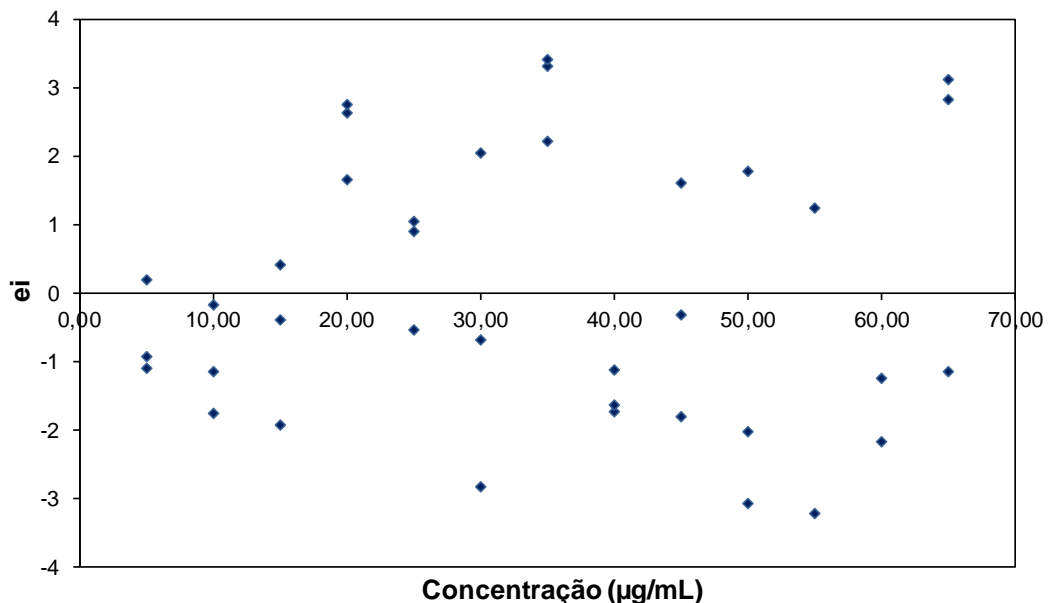
**Tabela 8 - Concentrações e média das áreas dos picos relativos ao FM do parâmetro linearidade.**

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) de furoato de mometasona	Média das áreas da 1ª pesagem	Média das áreas da 2ª pesagem	Média das áreas da 3ª pesagem
5,00 (10,0%)	19,49	20,79	19,66
10,00 (20,0%)	42,41	43,38	41,78
15,00 (30,0%)	66,90	66,10	64,58
20,00 (40,0%)	92,07	91,10	92,20
25,00 (50,0%)	113,43	111,86	113,30
30,00 (60,0%)	134,66	132,52	137,40
35,00 (70,0%)	160,50	161,60	161,70
40,00 (80,0%)	179,52	180,11	179,61
45,00 (90,0%)	205,79	203,86	202,38
50,00 (100,0%)	228,92	224,07	225,11
55,00 (110,0%)	251,34	244,64*	246,87
60,00 (120,0%)	278,28*	270,86	271,79
65,00 (130,0%)	294,84	298,80	299,10

(\*) *outliers*

Foram aplicados os testes estatísticos para avaliar as premissas da regressão linear simples. O diagnóstico de *outliers* foi realizado pelo resíduo padronizado de *Jackknife* (Figura 23), no qual se avalia o valor de  $J_{ei}$ . Foram detectados 2 (dois) *outliers*, mantendo-se 37 (trinta e sete) pontos, dentro do limite especificado de 22,2%.

**Figura 23 - Dispersão dos resíduos obtidos no teste de Jackknife relativo ao parâmetro linearidade do FM.**



Fonte: elaborado pela autora.

O teste de *Ryan-Joiner* foi aplicado para avaliar se os resíduos seguem a distribuição normal, pela correlação dos resíduos ordenados com os percentis da normal. Os resíduos seguem a normal se  $R_{eq} \geq R_{crítico}$ , sendo  $R_{eq} = 0,9790$  e o  $R_{crítico} = 0,9696$  para  $\alpha = 0,05$ , pode-se concluir que os resíduos seguem a distribuição normal (Tabela 9).

**Tabela 9 - Premissas necessárias à utilização dos MMQO.**

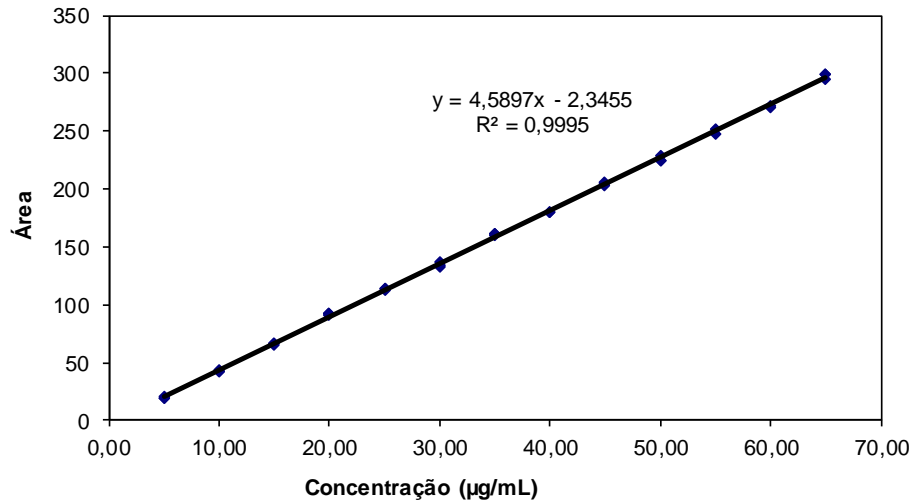
Premissa	Especificação	Resultado	Conclusão
Teste de <i>outliers</i> pelo método <i>Jackknife</i>	$ J_{ei}  > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Dois pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão de 2 pontos, considerados <i>outliers</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de <i>Ryan-Joiner</i>	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9790$ $R_{crítico} = 0,9696$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,5304$ $d_{cal} = 1,5707$ $4-d_u = 2,4696$	Não há correlação entre os resíduos
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i> ou <i>Levene modificado</i>	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha = 0,05$	$t_L = 1,0983$ $t_{crítico} = 2,030$	Há homocedasticidade.

O teste de *Brown-Forsythe* demonstrou que os resíduos são homocedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de  $X_i$  e  $t_L \leq t_{crítico}$ .

A regressão linear é estatisticamente significativa ( $\alpha = 0,05$ ) e não há desvio de linearidade, confirmado pelas premissas e ANOVA. O método é linear na faixa de concentração de 5,00 a 65,00  $\mu\text{g/mL}$ . O MMQO foi aplicado, utilizando-se o software Prism 7®, obtendo-se coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9995, coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,99974 e a equação da reta  $y = 4,5897 x - 2,3455$  (Figura 24).



**Figura 24 - Curva analítica do doseamento de furoato de mometasona por CLUE, no intervalo de 5,00 a 65,00 µg/mL.**



Fonte: elaborado pela autora.

A avaliação da significância do coeficiente angular da equação da reta demonstrou que o p-valor do teste F da ANOVA é menor que 0,05. Portanto, conclui-se que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero, conforme preconizado na RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017).

As análises estatísticas da precisão estão apresentadas na **Tabela 10**. Na precisão intra-dia, o valor de C.V. obtidos (n = 6) foi 0,51% para o FM. Para a precisão entre dias, o valor de C.V. (n = 12) foi de 0,56%. As médias das 12 determinações não apresentaram diferenças significativas em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Desta forma, conclui-se que o método apresenta precisão adequada.

**Tabela 10 - Precisão intermediária e repetibilidade do doseamento de FM por CLUE.**

Parâmetro	1ºD, A1	2ºD, A2
Média (%; n = 6)	100,18 ± 0,25	99,82 ± 0,21
Diferença entre as médias	0,36 ± 0,32	
C.V. (%)	0,60	0,50
A diferença é significativa ( $\alpha=0,05$ ) (teste <i>t</i> bicaudal)?	Não	
Dados seguem a normal (teste <i>Shapiro-Wilk</i> )?	Sim	

D: dia; e A: analista.

Para avaliar o parâmetro exatidão, foi utilizado o método de adição da SQR do FM ao placebo (nanofibras de PLGA). A recuperação do fármaco nas amostras variou entre 98,21 e 101,90% para o doseamento e entre 96,58 e 103,29% para o perfil de liberação *in vitro* (Tabelas 11 e 12). Esses resultados comprovaram que o método para o doseamento do FM nas nanofibras e no perfil de liberação *in vitro* é exato.

**Tabela 11 - Exatidão do doseamento de FM em nanofibras por CLUE.**

Nível	Replicata	CT (µg/mL)	CME (µg/mL)	Recuperação (%)	Médias (%)
80,0% (40,00 µg/mL)	1	39,37	39,90	101,35	100,42
	2	39,31	39,98	101,71	
	3	39,60	38,89	98,21	
100,0% (50,00 µg/mL)	1	49,21	50,03	101,67	101,59
	2	49,13	50,07	101,90	
	3	49,50	50,10	101,21	
120,0% (60,00 µg/mL)	1	59,05	59,40	100,59	99,84
	2	58,96	58,78	99,69	
	3	59,40	58,94	99,23	

CME: concentração média experimental; e CT: concentração teórica.

**Tabela 12 - Exatidão do perfil de liberação de FM em nanofibras por CLUE.**

Nível	Replicata	CT (µg/mL)	CME (µg/mL)	Recuperação (%)	Médias (%)
5 µg/mL	1	5,01	4,84	96,58	99,43
	2	5,00	5,11	102,11	
	3	5,02	5,00	99,60	
15 µg/mL	1	15,03	15,52	103,29	101,68
	2	15,00	15,32	102,17	
	3	15,06	15,00	99,60	
25 µg/mL	1	25,05	25,32	101,07	101,28
	2	25,00	25,80	103,19	
	3	25,10	25,00	99,60	

CME: concentração média experimental; e CT: concentração teórica.

Considerando-se que todos os valores de recuperação individuais e médios para os três níveis de concentração estão contidos no intervalo de 80,0 a 110,0%, pode-se concluir que o método para quantificação de FM nas nanofibras e no perfil de liberação por CLUE apresenta exatidão adequada.

A seletividade do método de doseamento foi demonstrada pela capacidade de quantificar o FM na presença de possíveis produtos de degradação obtidos no teste de degradação forçada (**Tabela 13**).

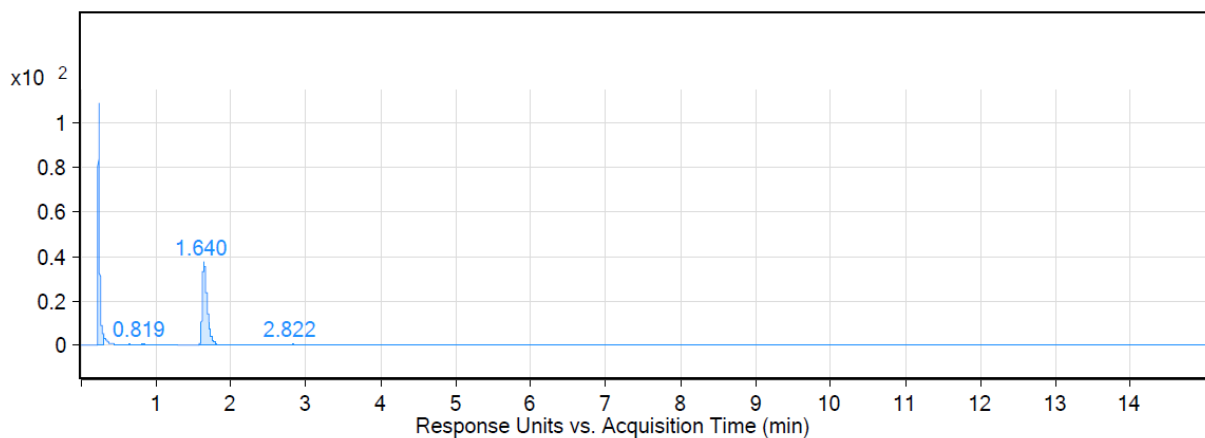
**Tabela 13 - Resultados percentuais do FM nas amostras degradadas.**

Analitos	Hidrólise alcalina	Hidrólise ácida	Oxidação	Luz	Ions metálicos
FM SQR	99,62	69,44	78,23	98,08	75,29
Nanofibras contendo FM-PLGA	98,80	67,99	74,43	97,21	77,24

Em todas as condições analisadas (**Figuras 25 a 29**), os resultados de pureza dos picos atribuídos ao FM foram superiores a 0,99 o que demonstra a seletividade do método. Os picos relacionados a produtos de degradação gerados pelas condições de estresse não são co-eluídos com FM e apresentaram resolução superior a 2,0. Uma degradação significativa foi observada nas condições de hidrólise ácida, oxidação e ainda na presença de ions metálicos.

Na hidrólise alcalina, foram observados dois picos de possíveis produtos de degradação com tempos de retenção relativos ao FM (tempo de retenção equivalente a 1,64) de 0,13 e 1,72, com resolução superior a 2 (**Figura 25**). O perfil de degradação foi semelhante nas amostras de SQR e das amostras de FM-PLGA

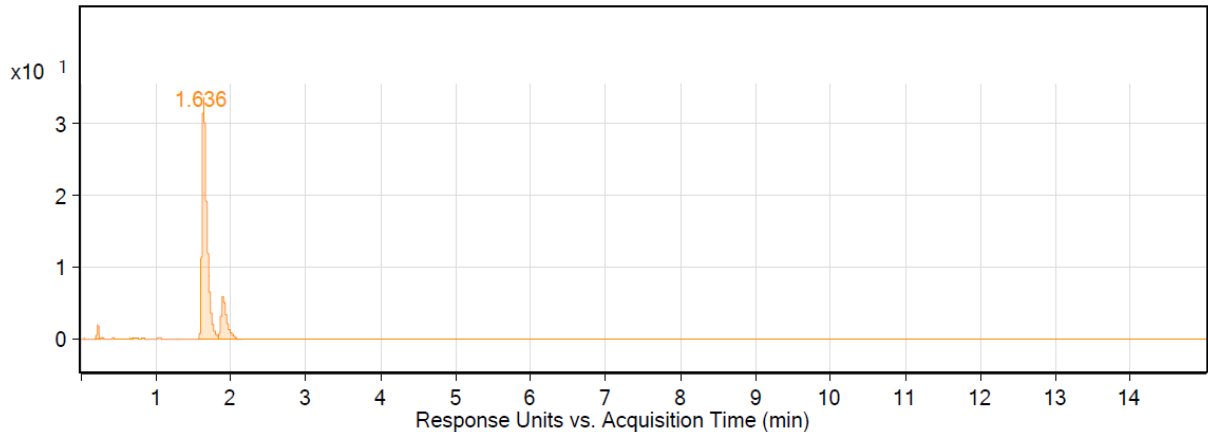
**Figura 25 - Cromatograma da hidrólise alcalina das nanofibras contendo FM-PLGA.**



Fonte: elaborado pela autora.

Na condição de degradação ácida (**Figura 26**), foi observada uma redução de, aproximadamente, 30% no teor de FM nas amostras de SQR e de nanofibras contendo FM-PLGA. Houve a formação de um pico apresentando tempo de retenção superior ao fármaco, com resolução superior a 2, garantindo assim uma qualidade na análise cromatográfica.

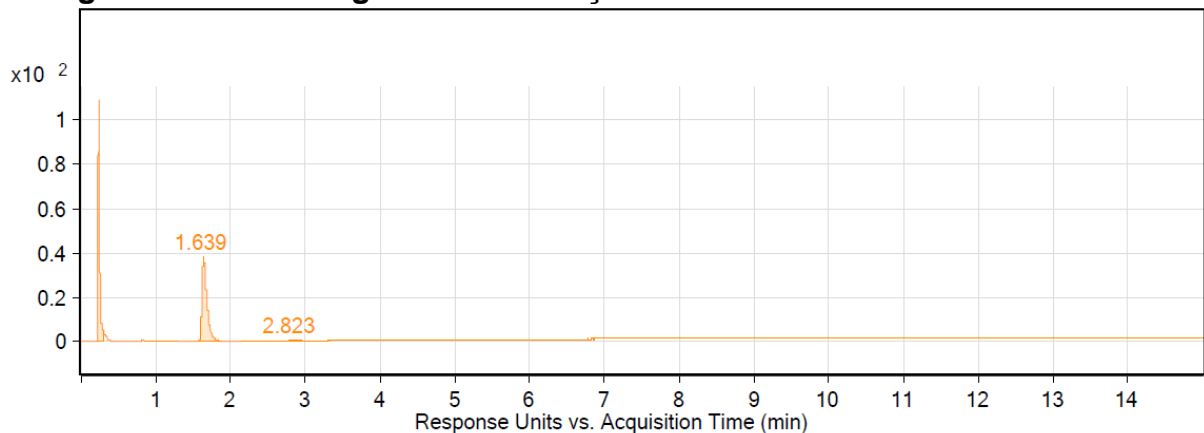
**Figura 26 - Cromatograma da hidrólise ácida das nanofibras contendo FM-PLGA.**



Fonte: elaborado pela autora.

Na degradação oxidativa, foi observado um pico de possível substância de degradação com tempos de retenção relativo ao FM (1,64) de 1,72 , com resolução superior a 2 (**Figura 27**). O perfil de degradação foi semelhante nas amostras de SQR e das amostras de FM-PLGA.

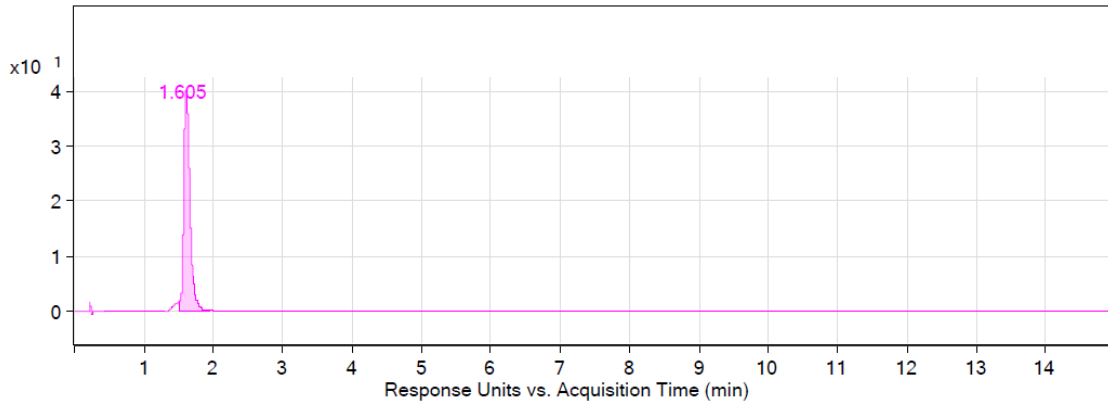
**Figura 27 - Cromatograma da oxidação das nanofibras contendo FM-PLGA.**



Fonte: elaborado pela autora.

Os cromatogramas obtidos pela degradação por luz analisados para as amostras de SQR e de FM-PLGA (**Figura 28**). Não foram observados picos relativos a produtos de degradação, apenas o relativo ao FM.

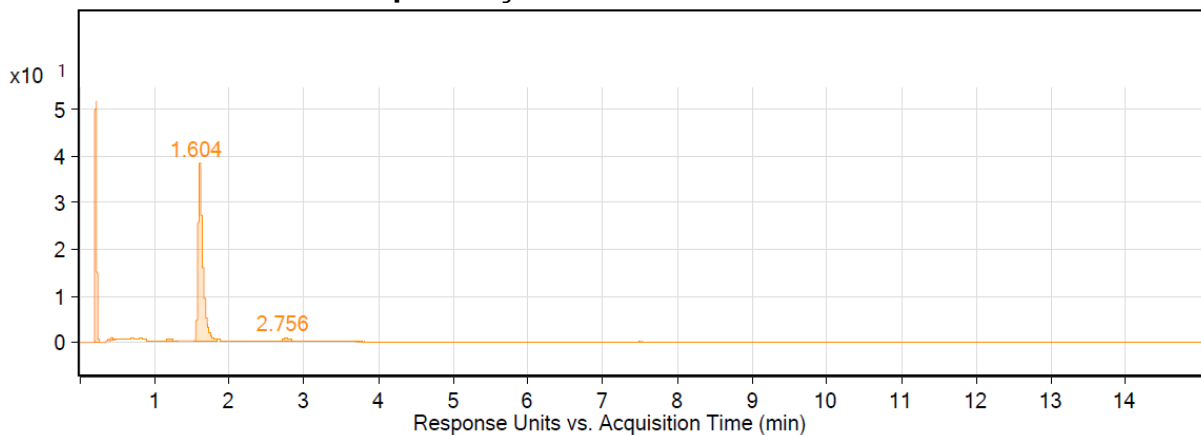
**Figura 28 - Cromatograma da fotólise das nanofibras contendo FM-PLGA.**



**Fonte:** elaborado pela autora.

Na presença de íons metálicos, foi observado pico relativo a um possível produto de degradação (tempo de retenção relativo ao FM de 1,72). Foi observada a redução do teor do FM de, aproximadamente, 25% nas amostras de SQR e FM-PLGA (**Figura 29**).

**Figura 29 - Cromatograma da degradação das nanofibras contendo FM-PLGA na presença de íons metálicos.**

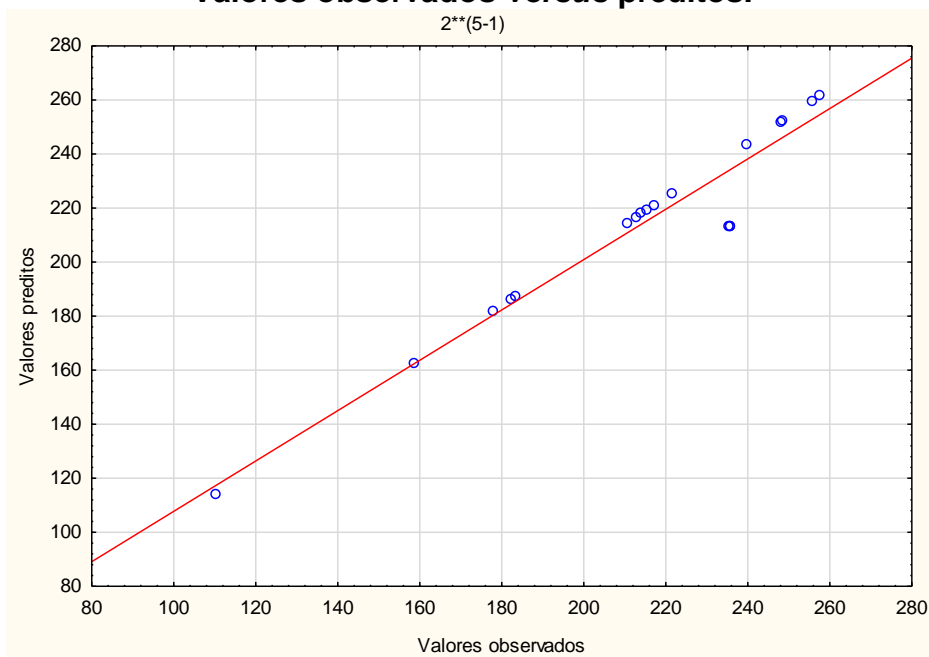


**Fonte:** elaborado pela autora.

Não foram observados picos relacionados ao FM nos cromatogramas da fase móvel, do FNS e do placebo. Portanto, o método é seletivo quando se utiliza fluido nasal simulado como meio no perfil de liberação das nanofibras contendo FM-PLGA.

No parâmetro robustez, foi avaliada a alteração da área relativa ao pico de FM para cada parâmetro delineado pelo planejamento fatorial. Os dados foram submetidos ao Software Statistica® e avaliados os gráficos de pareto, ANOVA, curva normal e se o modelo apresenta ajuste (**Figura 30**).

**Figura 30 - Avaliação da adequação do modelo matemático, Valores observados versus preditos.**



**Fonte:** elaborado pela autora.

Os resultados médios de área, na solução amostra de concentração de 50 µg/mL, não apresentam diferença significativa, quando comparados a condição nominal 24 horas. Os parâmetros relacionados a percentual de acetonitrila, vazão de fase móvel, temperatura, comprimento de onda para detecção e tempo para solubilização da amostra interferem significativamente nos resultados de área esperados, por ANOVA.

O gráfico de pareto demonstrou que a alteração do percentual de acetonitrila é o parâmetro que mais interfere nos resultados da área do analito. Desta forma, podemos concluir que o método não é robusto e se faz necessário o controle dos parâmetros cromatográficos, durante todas as análises.

### 3.3.5 Doseamento de furoato de mometasona nas nanofibras

O método de doseamento validado por cromatografia a líquido de ultra eficiência, descrito no item **3.2.2.1.4** e foi aplicado para quantificar o furoato de mometasona em três amostras distintas de nanofibras contendo FM-PLGA.

O valor declarado de FM ( $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$ ) é de 100 µg por unidade posológica. O teor de cada lote está descrito na **Tabela 14**. Os resultados obtidos foram de aproximadamente, 99%, com coeficientes de variação inferiores a 2%.

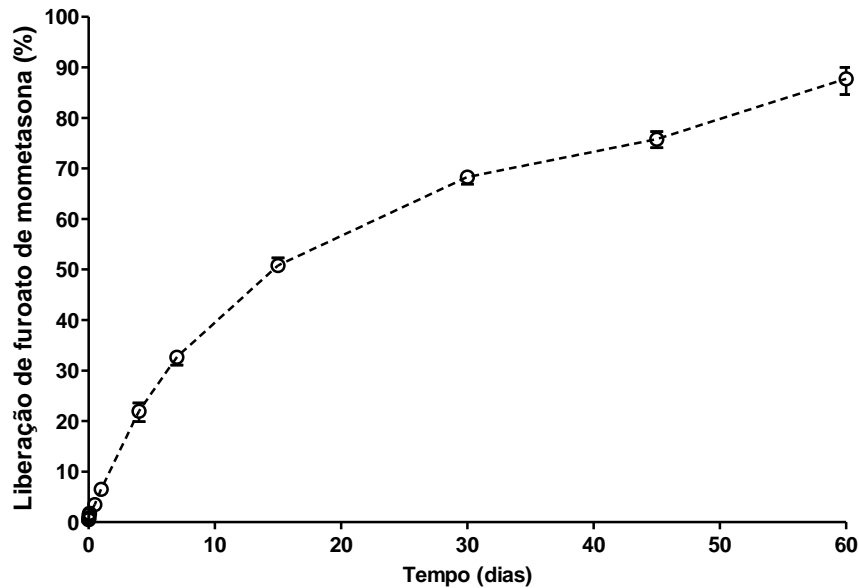
**Tabela 14 - Teor das nanofibras contendo FM-PLGA por CLUE.**

Replicatas	Teor de furoato de mometasona (%)		
	1	2	3
1	99,28	99,51	99,41
2	100,5	100,41	100,76
3	99,55	98,67	98,97
Média	99,78	99,53	99,71
C.V. (%)	0,64	0,87	0,93

### 3.3.6 Cinética de liberação das nanofibras contendo furoato de mometasona *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* das nanofibras contendo FM-PLGA foi avaliado em FNS a 32 °C, por 60 dias. A curva demonstrou um perfil de liberação sustentada com aproximadamente 20% da dose do fármaco liberada nos primeiros cinco dias (**Figura 31**). Ao final do estudo, no tempo de 60 dias, o valor médio de cedência do FM foi de aproximadamente 85%.

**Figura 31 - Perfil de liberação cumulativo de FM das nanofibras.**



Fonte: elaborado pela autora.

A liberação em meio biorrelevante *in vitro* do FM a partir das nanofibras foi ajustada nos modelos matemáticos de cinética de ordem zero, primeira ordem, *Higuchi*, *Korsmeyer-Peppas* e *Hixson-Crowell* (Tabela 15).

**Tabela 15 - Avaliação do modelo matemático da cinética de liberação das nanofibras contendo FM-PLGA.**

Modelo	Equação	r <sup>2</sup>
Ordem zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 \times t$	0,9221
Primeira ordem	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \frac{K_1 t}{2,303}$	0,9881
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \times \sqrt{t}$	0,9916
Korsmeyer-Peppas	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = n \log t + \log a$	0,7578
Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{M_0} = \sqrt[3]{M_t} + K_{HC} t$	0,9656

M: fração do fármaco dissolvido; t: tempo; K<sub>0</sub>: constante da cinética de ordem zero; K<sub>1</sub>: constante da cinética de primeira ordem; K<sub>H</sub>: constante da cinética de *Higuchi*; a: constante cinética de *Peppas*; n: expoente de liberação; K<sub>HC</sub>: constante da cinética de *Hixson-Crowell*. Fonte: adaptado de BRUSCHI, 2015; HIGUCHI, 1963; LAO *et al.*, 2011; SIEPMANN; PEPPAS, 2011.



Os resultados foram analisados com a função estatística MS-Excel® para seleção do melhor ajuste em valores de  $r^2$  (BRUSCHI, 2015; HIGUCHI, 1963; LAO *et al.*, 2011; SIEPMANN; PEPPAS, 2011).

A avaliação do modelo demonstra que o fármaco está incorporado no sistema nanoestruturado e é liberado da matriz por difusão, preferencialmente segundo a lei de *Fick*, uma vez que o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) que mais se aproxima de 1 foi o obtido com modelo de *Higuchi*.

### **3.3.7 Teste de esterilidade e endotoxina bacteriana**

Amostras de nanofibras contendo FM-PLGA e nanofibras PLGA foram analisadas quanto à esterilidade, conforme recomendado na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição. Não houve crescimento nos meios fluido tioglicolato e caseína soja após 14 dias de incubação em temperaturas controladas. Esse resultado é um forte indício da eficácia da esterilização, garantindo a ausência de microrganismos em ambas as nanofibras.

O ensaio de endotoxinas bacterianas foi realizado para detectar e quantificar endotoxinas de bactérias gram-negativas pela técnica turbidimétrica. As amostras de nanofibras contendo FM-PLGA e nanofibras de PLGA foram analisadas e ambas apresentaram resultados abaixo de 0,05 EU/mL. Assim, as amostras cumprem ao teste de endotoxinas bacterianas.

### **3.3.8 Avaliação da segurança das nanofibras contendo furoato de mometasona *in vivo***

A avaliação da segurança foi realizada na FMRP-USP em coelhos, segundo o procedimento descrito no item 3.2.2.6. No grupo que recebeu nanofibras contendo PLGA (controle, seio maxilar direito), no décimo quarto dia, foram observados cinco animais com inflamação leve da mucosa e um animal com inflamação moderada da mucosa.

No trigésimo dia, quatro animais não apresentaram inflamação da mucosa e dois animais apresentaram inflamação leve da mucosa. No sexagésimo dia, dois animais

não mostraram sinais de inflamação da mucosa, uma inflamação leve foi observada em dois casos e dois animais mostraram inflamação moderada da mucosa.

O grupo que recebeu nanofibras contendo FM-PLGA, nos seios maxilares esquerdos, não apresentou processo inflamatório grave em nenhum animal estudado em nenhum dos tempos avaliados.

No décimo quarto dia, quatro animais não apresentaram inflamação da mucosa, um animal apresentou inflamação leve da mucosa e um apresentou inflamação moderada da mucosa. No trigésimo dia, cinco animais não apresentaram inflamação da mucosa e um animal apresentou inflamação leve da mucosa. No sexagésimo dia, dois animais não tinham processo inflamatório na mucosa e quatro animais apresentaram a mucosa com inflamação leve (**Tabela 16**).

**Tabela 16 - Avaliação histológica da inflamação nas mucosas nasais de coelhos.**

<b>Animais</b>	<b>Seio maxilar direito Nanofibras de PLGA (controle)</b>	<b>Seio maxilar esquerdo Nanofibras contendo FM-PLGA</b>	<b>Tempo avaliado (dias)</b>
C9	1	0	14
C13	1	0	14
C14	1	1	14
C15	2	2	14
C17	1	0	14
C18	1	0	14
C1	0	0	30
C2	0	0	30
C3	0	0	30
C4	0	0	30
C5	1	1	30
C6	1	0	30
C7	2	1	60
C8	0	1	60
C10	2	1	60
C11	0	0	60
C12	1	1	60
C16	1	0	60

0 = sem inflamação; 1 = inflamação leve; 2 = inflamação moderada; e 3 = inflamação grave.

Um teste da razão de verossimilhança foi aplicado para avaliar as diferenças entre os três tempos de eutanásia dos coelhos e comparados concomitantemente às variáveis de interesse (**Tabela 17**).

**Tabela 17 - Padrão inflamatório nos seios nasais versus tempo de eutanásia.**

Produto	Tempo de Eutanásia	Padrão inflamatório (individuais e percentual)			Total
		Sem inflamação	Inflamação leve	Inflamação moderada	
Nanofibras de PLGA p = 0,037	14	0 (0,0)	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100,0)
	30	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0,0)	6 (100,0)
	60	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	6 (100,0)
	<b>Total</b>	<b>6 (33,3)</b>	<b>9 (50,0)</b>	<b>3 (16,7)</b>	<b>18 (100,0)</b>
Nanofibras contendo FM-PLGA p = 0,175	14	4 (66,8)	1 (16,6)	1 (16,6)	6 (100,0)
	30	5 (83,3)	1 (16,7)	0 (0,0)	6 (100,0)
	60	2 (33,3)	4 (66,7)	0 (0,0)	6 (100,0)
	<b>Total</b>	<b>11 (61,1)</b>	<b>6 (33,3)</b>	<b>1 (5,6)</b>	<b>18 (100,0)</b>

O grupo que recebeu as nanofibras contendo FM-PLGA e os que receberam nanofibras de PLGA (controle) apresentaram valor  $p$  calculado maior que 0,05, portanto, não houve diferenças estatisticamente significativas na inflamação da mucosa no que se refere ao tempo de eutanásia.

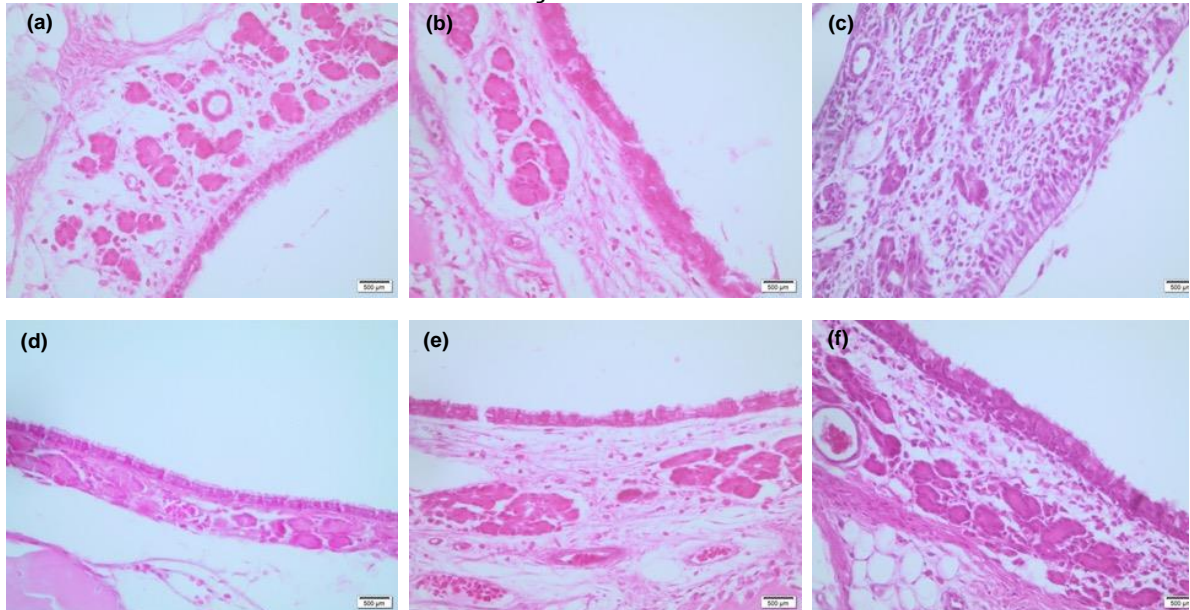
O estudo experimental mostrou diferenças estatísticas na comparação entre o padrão de inflamação da mucosa do seio maxilar de animais que receberam nanofibras contendo FM-PLGA e nanofibras de PLGA (controle) (**Tabela 18**).

**Tabela 18 - Padrão inflamatório observados nas mucosas de coelhos.**

Produto	Tempo de eutanásia (dias)	Inflamação (individuais e percentual)		Total
		Sim	Não	
Nanofibras de PLGA p = 0,185	14	6 (100,0)	0 (0,0)	6 (100,0)
	30	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100,0)
	60	4 (66,7)	2 (33,3)	6 (100,0)
	<b>Total</b>	<b>12 (66,7)</b>	<b>6 (33,3)</b>	<b>18 (100,0)</b>
Nanofibras contendo FM-PLGA p = 0,022	14	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100,0)
	30	1 (16,7)	5 (83,3)	6 (100,0)
	60	4 (66,7)	2 (33,3)	6 (100,0)
	<b>Total</b>	<b>7 (38,9)</b>	<b>11 (61,1)</b>	<b>18 (100,0)</b>

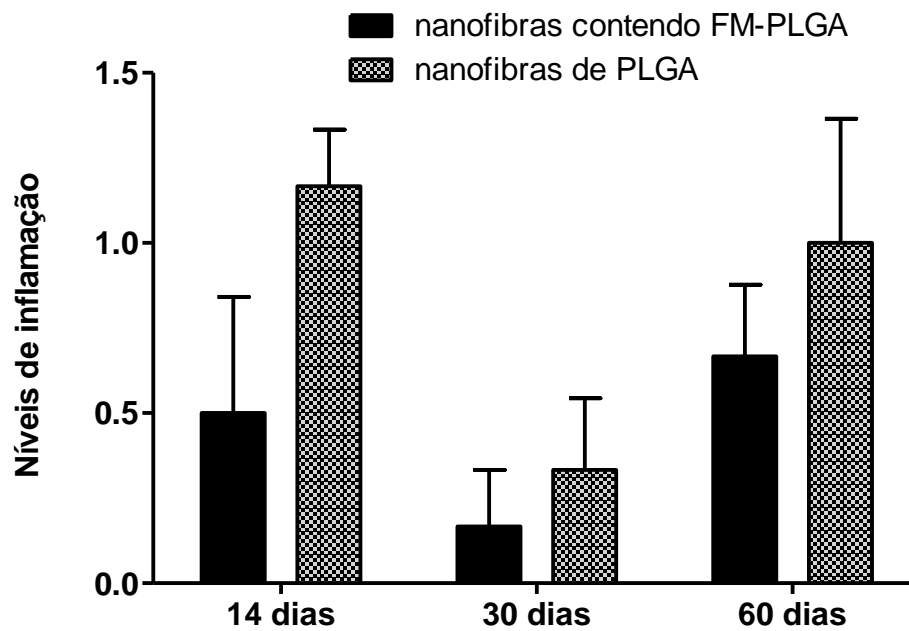
A redução dos níveis de inflamação observada na mucosa nasal do grupo que foi tratado com as nanofibras contendo FM-PLGA deve-se à presença do FM no local de ação (**Figuras 32 e 33**).

**Figura 32 - Seções de mucosa nasal de coelhos por tempo após a administração de nanofibras.**



Nanofibras de PLGA: **(a)** 14 dias, inflamação leve; **(b)** 30 dias, sem inflamação; e **(c)** 60 dias, inflamação moderada. Nanofibras contendo FM-PLGA: **(d)** 14 dias, sem inflamação; **(e)** 30 dias, sem inflamação; e **(f)** 60 dias, inflamação leve. Coloração HE, aumento 400x). **Fonte:** elaborado pela autora.

**Figura 33 - Níveis de inflamação de mucosa nasal de coelhos por tempo após a administração de nanofibras**



**Fonte:** elaborado pela autora

A redução dos níveis de inflamação observada nos achados histológicos de 30 dias pode ser correlacionada com o perfil de liberação (**Figura 31**), uma vez que aproximadamente 70% do FM foi liberado durante esse período *in vitro*. Além disso, nos três tempos de eutanásia o nível da inflamação na mucosa dos animais, que receberam a nanofibra sem o fármaco, foi superior àqueles que receberam as nanofibras com o glicocorticoide (**Figura 33**). As nanofibras contendo FM-PLGA quando aplicadas diretamente na superfície da mucosa nasal reduzem o processo inflamatório por um tempo prolongado e são seguras.

## 4 CONCLUSÃO

As nanofibras poliméricas biodegradáveis contendo furoato de mometasona, um glicocorticóide amplamente utilizado no tratamento da RSC, foram desenvolvidas com sucesso.

A ferramenta estatística, planejamento do composto central, foi aplicada no desenvolvimento das nanofibras para a seleção das condições ótimas relacionadas ao percentual de polímero em solução (26,66%) e composição de solventes (60,63% de tetrahidrofurano). As nanofibras obtidas apresentaram morfologia satisfatória, ausência de *beads* e diâmetro médio de 620 nm.

As nanofibras contendo furoato de mometasona desenvolvidas apresentam liberação modificada. O fármaco apresentou liberação durante 60 dias *in vitro*, seguindo o modelo cinético de *Higuchi* e demonstrou segurança após administração intranasal em coelhos.

O método cromatográfico para quantificação do furoato de mometasona nas nanofibras e no perfil de liberação *in vitro* foi validado no intervalo de 5,00 a 65,00 µg/mL, apresentado linearidade, seletividade, exatidão e precisão adequadas.

As nanofibras poliméricas contendo furoato de mometasona são seguras, o que corrobora com o potencial de sua aplicação como carreadores de fármacos com liberação controlada, para o tratamento de doenças crônicas do trato respiratório. As nanofibras apresentam as características necessárias para administração sobre superfície dos seios paranasais após a FESS para remoção dos pólipos nasais, local que as doses administradas de INCS não atingem. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e sem necessidade de remoção poderiam proporcionar maior adesão do paciente ao tratamento e minimizar as recidivas de RSC.

## 5 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados promissores obtidos neste estudo, as próximas etapas abrangem a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, da distribuição e do perfil de liberação *in vivo* das nanofibras contendo furoato de mometasona. Os resultados obtidos, até a presente data, sugerem uma aplicação potencial das nanofibras poliméricas no tratamento da rinosinusite crônica, pelo aumento da eficácia terapêutica do tratamento. Além disso, nanofibras representam um grande avanço na fabricação de medicamentos e de dispositivos médicos, bem como sua aplicação clínica como estratégia inovadora no tratamento de doenças do trato respiratório.

## REFERÊNCIAS

AH-SEE, K. L.; MACKENZIE, J.; AH-SEE, K. W. Management of chronic rhinosinusitis. **BMJ Publishing Group Ltd**, v. 345, n. 7881, p. 40-44, 2012.

ANSELMO LIMA, W. T. *et al.* Rinossinusite: evidências e experiências. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. S1, p. 1-49, 2015.

ANVISA. Guia nº4 - Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2015a.

ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Ministério da Saúde. Brasília, DF, Diário Oficial da União, 8 dez. 2015b.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Ministério da Saúde. Brasília, DF, Diário Oficial da União, 25 jul. 2017.

AOAC INTERNATIONAL. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Official Methods of Analysis, p. 9, 2016.

ARORA, P.; SHARMA, S.; GARG, S. Permeability issues in nasal drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 18, p. 967-975, 2002.

BACHERT, C. *et al.* Chronic rhinosinusitis: From one disease to different phenotypes. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, n. SUPPL.22, p. 2-4, 2012.

BACHERT, C. *et al.* Adult chronic rhinosinusitis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 19, 2020a.

BACHERT, C. *et al.* Biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 3, p. 725-739, 2020b.

BACHERT, C.; AKDIS, C. A. Phenotypes and Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 4, p. 621-628, 2016.

BACHERT, C.; HOLTAPPELS, G. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis, pharmaceutical therapy options. **Current Topics in Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 14, n. 09, p. 1-40, 2015.



BALUSAMY, B. *et al.* Progress in the design and development of “fast-dissolving” electrospun nanofibers based drug delivery systems - A systematic review. *Journal of Controlled Release*, v. 326, n. June, p. 482-509, 2020.

BANSIL, R.; TURNER, B. S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 124, p. 3-15, 2018.

BARTON, B. E. *et al.* Cytokine inhibition by a novel steroid, mometasone furoate. ***Immunopharmacology and Immunotoxicology***, v. 13, n. 3, p. 251-261, 1991.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. ***Talanta***, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. ***Biotechnology Advances***, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BHATTACHARYYA, N. *et al.* Cost burden and resource utilization in patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps. ***Laryngoscope***, v. 129, n. 9, p. 1969-1975, 2019.

BOUSQUET, J. Mometasone furoate: An effective anti-inflammatory with a well-defined safety and tolerability profile in the treatment of asthma. ***International Journal of Clinical Practice***, v. 63, n. 5, p. 806-819, 2009.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

BRUSCHI, M. Mathematical models of drug release. ELSEVIER. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. 1st Edition, p. 63-86.

BUSILLO, J. M.; CIDLOWSKI, J. A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: Ready, reinforce, repress, resolve, and restore. ***Trends in Endocrinology and Metabolism***, v. 24, n. 3, p. 109-119, 2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Summary Health Statistics: National Health Interview Survey Chronic Sinusitis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/de-mometasona/fastats/sinuses.htm>>.

CHEN, T.; OAKLEY, D. M. Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. ***Thermochimica Acta***, v. 248, n. C, p. 229-244, 1995.

CHEN, X. S. *et al.* Solid State Characterization of Mometasone Furoate Anhydrous and Monohydrate Forms. ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, Vol. 94, 2496-2509, 2005.

CHEW, S. *et al.* The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. ***Current Pharmaceutical Design***, v. 12, n. 36, p. 4751-4770, 2006.

CHOU, S. F.; CARSON, D.; WOODROW, K. A. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 584-591, 2015.

COSTANTINO, H. R. *et al.* Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 1-24, 2007.

CRIM, C.; PIERRE, L. N.; DALEY-YATES, P. T. A review of the pharmacology and pharmacokinetics of inhaled fluticasone propionate and mometasone furoate. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1339-1354, 2001.

DAVIES, R. J.; NELSON, H. S. Once-daily mometasone furoate nasal spray: Efficacy and safety of a new intranasal glucocorticoid for allergic rhinitis. **Clinical Therapeutics**, v. 19, n. 1, p. 27-38, 1997.

DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Absorption Enhancers for Nasal Drug Delivery. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 13, p. 1107-1128, 2003.

DEAN, A.; VOSS, D.; DRAGULJIC, D. Design and Analysis of Experiments. 2nd. ed. New York: **Springer International Publishing**, 2017.

DJUPESLAND, P. G. Nasal drug delivery devices: Characteristics and performance in a clinical perspective-a review. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, n. 1, p. 42-62, 2013.

DRAPER, R. W. *et al.* An unusual dienone-enol rearrangement product formed during the synthesis of mometasone furoate (Sch 32088). **Steroids**, v. 63, n. 3, p. 135-140, 1998.

DURAKOVIC, B. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. **Periodicals of Engineering and Natural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 421-439, 2017.

EBADI, S. V.; FAKHRALI, A.; SEMNANI, D. Systematic investigation of parameters of an electrospinning process of poly(acrylic acid) nanofibres using response surface methodology. **Bulletin of Materials Science**, v. 42, n. 3, 2019.

ENGLAND, R. J. A. *et al.* Nasal pH measurement: A reliable and repeatable parameter. **Clinical Otolaryngology and Allied Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67-68, 1999.

ERICSON-NEILSEN, W.; KAYE, A. D. Steroids: Pharmacology, complications, and Practice Delivery Issues. **Ochsner Journal**, v. 14, n. 2, p. 203-207, 2014.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 163-169, 2017.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents**, v. 12, n. 2, p. 109-116, 2005.

FOKKENS, W. J. *et al.* **European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps** 2020. *Rhinology*, n. Suppl.29, p. 1-464, 2020.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, n. 16, p. 4585-4592, 1999.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry, July, p. 1-15, 2015.

FRENOT, A.; CHRONAKIS, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, n. 1, p. 64-75, 2003.

GENTILE, P. *et al.* An overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640-3659, 2014.

GHELICH, R. *et al.* Central composite design (CCD)-Response surface methodology (RSM) of effective electrospinning parameters on PVP-B-Hf hybrid nanofibrous composites for synthesis of HfB<sub>2</sub>-based composite nanofibers. **Composites Part B: Engineering**, v. 166, n. February, p. 527-541, 2019.

GOH, Y. F.; SHAKIR, I.; HUSSAIN, R. Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. **Journal of Materials Science**, v. 48, n. 8, p. 3027-3054, 2013.

GRAYSON, J. W. *et al.* Contemporary Classification of Chronic Rhinosinusitis beyond Polyps vs No Polyps: A Review. **JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 146, n. 9, p. 831-838, 2020.

HALAWI, A. M.; SMITH, S. S.; CHANDRA, R. K. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and cost. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 34, n. 4, p. 328-334, 2013.

HAMILOS, D. L. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and medical management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 128, n. 4, p. 693-707, 2011.

HAN, J. K.; KERN, R. C. Topical therapies for management of chronic rhinosinusitis: steroid implants. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 9, n. S1, p. 22-26, 2019.

HASTAN, D. *et al.* Chronic rhinosinusitis in Europe - An underestimated disease. A GA2LEN study. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. 9, p. 1216-1223, 2011.

HE, Y. *et al.* Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids. **Cell Research**, v. 24, n. 6, p. 713-726, 2014.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HOCHHAUS, G. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of mometasone furoate nasal spray: Potential effects on clinical safety and efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 2008.

HUANG, Z. M. *et al.* A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, 2003.

HÜBNER, M.; HOCHHAUS, G.; DERENDORF, H. Comparative pharmacology, bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of inhaled glucocorticosteroids. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 469-488, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q2(R1) - Validation of analytical procedures: text and methodology*, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products, v. 4, n. February, p. 24, 2003.

JAIN, R. *et al.* Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: Different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

JAVID, A. *et al.* Performance of photocatalytic oxidation of tetracycline in aqueous solution by TiO<sub>2</sub> nanofibers. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

JUG, M. *et al.* An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 350-366, 2018.

KAPOOR, D. N. *et al.* PLGA: a unique polymer for drug delivery. **Therapeutic Delivery Delivery**, v. 6, n. 1, p. 41-58, 2015.

KARA, C. O. Animal models of sinusitis: Relevance to human disease. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 4, n. 6, p. 496-499, 2004.

KATO, A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. **Allergology International**, v. 64, n. 2, p. 121-130, 2015.

KECK, T. *et al.* Temperature Profile in the Nasal Cavity. **The Laryngoscope**, v. 110, p. 651-654, 2000.

KENNEDY, D. W. The PROPEL™ steroid-releasing bioabsorbable implant to improve outcomes of sinus surgery. **Expert review of respiratory medicine**, v. 6, n. 5, p. 493-498, 2012.

KUMAR, A.; PANDEY, A. N.; JAIN, S. K. Nasal-nanotechnology: Revolution for efficient therapeutics delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 681-693, 2016.

KUSHWAHA, S. K. S.; KESHARI, R. K.; RAI, A. K. Advances in nasal trans-mucosal drug delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 7, p. 21-28, 2011.

LAO, L. L. *et al.* Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 28-41, 2011.

LECHANTEUR, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 50-63, 2018.

LIU, X. *et al.* Electrospinnability of Poly Lactic-co-glycolic Acid (PLGA): the Role of Solvent Type and Solvent Composition. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 738-749, 2017.

LOURIJSEN, E. S.; FOKKENS, W. J.; REITSMA, S. Direct and indirect costs of adult patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Rhinology**, v. 58, n. 3, p. 213-217, 2020.

LUMRY, W. R. A review of the preclinical and clinical data of newer intranasal steroids used in the treatment of allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, n. 4, p. 150-159, 1999.

MAHER, S.; CASETTARI, L.; ILLUM, L. Transmucosal Absorption Enhancers in the **Drug Delivery Field**. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 1-10, 2019.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MARPLE, B. F. *et al.* Advance II: A Prospective, randomized study assessing safety and efficacy of bioabsorbable steroid-releasing sinus implants. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 146, n. 6, p. 1004-1011, 2012.

MARTTIN, E. *et al.* Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, n. 1-2, p. 13-38, 1998.

MATERA, M. G. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids for asthma treatment. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 58, 2019.

MEINEL, A. J. *et al.* Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 1-13, 2012.

MELTZER, E. O.; HAMILOS, D. L. Rhinosinusitis diagnosis and management for the clinician: A synopsis of recent consensus guidelines. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 5, p. 427-443, 2011.

MYGIND, N. *et al.* Mode of action of intranasal corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 108, n. 1., p. 16-25, 2001.

NADERI, N. *et al.* Prediction of nanofiber diameter and optimization of electrospinning process via response surface methodology. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2509-2515, 2008.

NASOURI, K.; SHOUSHARI, A. M.; MOJTAHEDI, M. R. M. Evaluation of effective electrospinning parameters controlling polyvinylpyrrolidone nanofibers surface morphology via response surface methodology. **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 9, p. 1941-1954, 2015.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington. National Academies Press, 2011.

NAVES, L. *et al.* Poly(lactic-co-glycolic) acid drug delivery systems through transdermal pathway: an overview. **Progress in Biomaterials**, v. 6, n. 1-2, p. 1-11, 2017.

ONRUST, S. V.; LAMB, H. M. Mometasone furoate: A review of its intranasal use in allergic rhinitis. *Drugs*, v. 56, n. 4, p. 725-745, 1998.

ORLANDI, R. R. *et al.* International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *International Forum of Allergy and Rhinology*, v. 6, n. November 2015, p. S22-S209, 2016.

OZCAN, K. M. *et al.* Comparison of Histopathological and CT Findings in Experimental Rabbit Sinusitis. **Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 63, n. 1, p. 56-59, 2011.

PARIKH, A. *et al.* Drug-eluting nasal implants: Formulation, characterization, clinical applications and challenges. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 2, p. 249-267, 2014.

PEREZ, A. C. *et al.* Assessing the maxillary sinus mucosa of rabbits in the presence of biodegradable implants. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 6, p. 40-46, 2012.

PEREZ, A. C. *et al.* Review of experimental models: Sinusitis in rabbits. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 80, n. 5, p. 435-440, 2014.

PILAN, R. R. DE M. *et al.* Prevalence of chronic rhinosinusitis in São Paulo. **Rhinology**, v. 50, n. 4, p. 129-138, 2012.

POETKER, D. M.; REH, D. D. A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 753-768, 2010.

PRAKASH, A.; BENFIELD, P. Topical Mometasone - A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in the Treatment of Dermatological Disorders. **Drugs**, v. 55, n. 1, p. 145-163, 1998.

RENEKER, D. H. *et al.* Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts. **Advances in Applied Mechanics**, v. 41, 2007.

RUDMIK, L. Economics of Chronic Rhinosinusitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, p. 1-10, 2017.

SAHIN-YILMAZ, A.; NACLERIO, R. M. Anatomy and Physiology of the Upper Airway. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 8, n. 1, p. 31-39, 2011.

SARLAK, N. *et al.* Effects of electrospinning parameters on titanium dioxide nanofibers diameter and morphology: An investigation by Box-Wilson central composite design (CCD). **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p. 410-416, 2012.

SCHLINDWEIN, W. S.; GIBSON, M. **Pharmaceutical Quality by Design - A Practical Approach**. First Edition. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Ltd, 2018.

SHAHRIAR, S. M. S. *et al.* Electrospinning nanofibers for therapeutics delivery. **Nanomaterials**, v. 9, n. 4, 2019.

SHAPIRO, E. L.; GROVE, C. United States Patent - 4,472,393, 20-dioxo-1,4-pregnadiene-17 $\alpha$ -ol 17-aromatic heterocycle carboxylates. New Jersey, 1984.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6-12, 2011.

SMITH, T. L. *et al.* Randomized controlled trial of a bioabsorbable steroid-releasing implant in the frontal sinus opening. **Laryngoscope**, v. 126, n. 12, p. 2659-2664, 2016.

SOFI, H. S. *et al.* Electrospun nanofibers for the delivery of active drugs through nasal, oral and vaginal mucosa: Current status and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 111, n. February, p. 110756, 2020.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

SZEFLER, S. J. Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. S26-S31, 2001.

TAHERALI, F.; VARUM, F.; BASIT, A. W. A slippery slope: On the origin, role and physiology of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 16-33, 2017.

TANG, Z. *et al.* Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 86-128, 2016.

THAKKAR, S.; MISRA, M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 107, n. June, p. 148-167, 2017.

TSENG, Y. Y. *et al.* Biodegradable drug-eluting poly[lactic-co-glycol acid] nanofibers for the sustainable delivery of vancomycin to brain tissue: In vitro and in vivo studies. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 9, p. 1314-1321, 2013.

UGWOKE, M. I. *et al.* Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1640-1665, 2005.

UHRICH, K. E. *et al.* Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999.

VAN DRUNEN, C. *et al.* Nasal allergies and beyond: A clinical review of the pharmacology, efficacy, and safety of mometasone furoate. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Supplement, v. 60, n. 80, p. 5-19, 2005.

WAHID, N. W. *et al.* The socioeconomic cost of chronic rhinosinusitis study. **Rhinology**, v. 58, n. 2, p. 112-125, 2020.

WANG, C.; YAN, B.; ZHANG, L. The epithelium-derived inflammatory mediators of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 16, n. 3, p. 293-310, 2020.

WANNER, A.; SALATHÉ, M.; O'RIORDAN, T. G. State of the Art - Mucociliary Clearance in the Airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, p. 1868-1902, 1996.

WATELET, J. B.; VAN CAUWENBERGE, P. Applied anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. **Allergy**, v. 54, n. 57, p. 14-25, 1999.

WEI, C. C.; KENNEDY, D. W. Mometasone implant for chronic rhinosinusitis. **Medical Devices: Evidence and Research**, v. 5, n. 1, p. 75-80, 2012.

XUE, J. *et al.* Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Application. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298-5415, 2019.



YOUSEFI ABDOLMALEKI, A. *et al.* Optimization and characterization of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers as a phenol adsorbent via response surface methodology. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 28, n. 12, p. 1872-1878, 2017.

YU, H. *et al.* Efficacy of mometasone furoate for nasal polyps. **Medicine**, v. 98, n. 30, p. e16632, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Efficacy of Short-Term Systemic Corticosteroid Therapy in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Systematic Review. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 33, n. 5, p. 567-576, 2019.

## ANEXO

Certificado de aprovação do projeto para testes *in vivo* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da de Ribeirão Preto (228/2018).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Avaliação da segurança dos mucoadésivos com mometasona na mucosa nasossinusal*", registrado com o número **228/2018**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Wilma Terezinha Anselmo Lima**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 1º de julho de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 20 coelhos Nova Zelândia machos pesando 3000g oriundos da Anilab Animais de Laboratório, Criação e Comércio. Vigência da autorização: 1º/07/2019 a 20/12/2019.

We certify that the Protocol nº 228/2018, entitled "*Evaluation of the safety of mucoadhesives with mometasone on the sinusal mucosa*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/01/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 20 male New Zealand rabbit weighing 3000g from the Anilab Animais de Laboratório, Criação e Comércio. This certificate is valid until 12/20/2019.

Ribeirão Preto, 1º de julho de 2019

  
**Profa. Dra. Katíuchia Uzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP - USP