

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

OTÁVIO MENDES GIL

**ESTUDO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO ARTICULAR
POR ESPECTROSCOPIA RAMAN: AÇÃO DE
COMPOSTOS LAMELARES E DETECÇÃO DE
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/02/2023

OTÁVIO MENDES GIL

**Estudo de processo inflamatório articular por espectroscopia
Raman: ação de compostos lamelares e detecção de alterações
fisiológicas**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.*

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Dalva Lúcia Araújo de Faria

São Paulo

2023



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Estudo de processo inflamatório articular por espectroscopia Raman: ação de compostos lamelares e detecção de alterações fisiológicas"

OTÁVIO MENDES GIL

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - no Programa de Química.

Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino
(Presidente)

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Rômulo Augusto Ando
IQ - USP

Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araujo
FCF - USP

Prof. Dr. Norberto Sanches Gonçalves
UNIFESP - DIADEMA

SÃO PAULO
26 de maio de 2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G436e G11, Otávio Mendes
Estudo de processo inflamatório articular por espectroscopia Raman: ação de compostos lamelares e detecção de alterações fisiológicas / Otávio Mendes G11. - São Paulo, 2023.
139 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: de Faria, Dalva Lúcia Araújo

1. Espectroscopia Raman. 2. Hidróxidos Duplos Lamelares. 3. inflamação articular. 4. ibuprofeno. 5. liberação modificada de fármacos. I. T. II. de Faria, Dalva Lúcia Araújo, orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Hector Alexandre Chaves Gil e Égle Ferraz Mendes que foram e sempre serão meu porto seguro e meus exemplos de amor, perseverança, dedicação e determinação. Sempre acreditaram em mim, mesmo em períodos muito obscuros e de incertezas. Sempre serei profundamente grato por tudo que fizeram por mim durante todos os momentos desta longa trajetória.

Minha sincera gratidão à minha orientadora, a Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria, por seu incansável apoio e contribuição significativa para meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal. Que desde o início da minha jornada acadêmica, foi uma fonte constante de conhecimento e sabedoria, guiando-me com muita paciência. Obrigado por ser uma luz na minha trajetória e por acreditar em mim. Este trabalho é uma homenagem ao seu comprometimento e dedicação à minha formação.

Agradeço também aos professores Prof. Dr. Ivan H. J. Koh e Profa. Dra. Vera R. L. Constantino e todos os seus alunos, que de maneira direta ou indireta também contribuíram fornecendo auxílio durante a execução deste trabalho sempre se mostrando disponíveis para esclarecer dúvidas e ajudando a propor soluções aos problemas enfrentados. Em especial à aluna Denise Eulálio pela amizade e apoio na realização das sínteses dos materiais inorgânicos e ensaios de dissolução.

À Central Analítica do Instituto de Química da USP, particularmente à Michele A. Rocha pela obtenção e ajuda na interpretação dos resultados de análise química

Ao Prof. Dr. José Roberto M. C. da Silva e seus alunos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do ICB-USP pela realização das análises histológicas.

À Profa. Dra Solange K. Sakata por possibilitar a esterilização das amostras por radiação ionizante no Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CTR/IPEN/CNEN-SP.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores, funcionários, alunos e ex-alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de Espectroscopia Molecular.

Gostaria de expressar meu agradecimento ao Instituto de Química da USP por ter me proporcionado não apenas uma formação sólida e excelente, mas também por ter me dado a oportunidade de construir amizades verdadeiras e duradouras. As pessoas

incríveis que conheci durante o meu tempo na instituição são um presente para a minha vida e eu sou grato por ter tido a oportunidade de fazer parte desta comunidade

Ao IQUSP, à USP, à CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e CNPq pelos auxílios financeiros.

“Eterno é tudo aquilo que vive uma fração de segundo mas com tamanha intensidade que se petrifica e nenhuma força o resgata.”

Fazendeiro do Ar, Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Gil, O. M. **Estudo de processo inflamatório articular por espectroscopia Raman: ação de compostos lamelares e detecção de alterações fisiológicas**. 2023. 139p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesta Tese foram estudados através da espectroscopia Raman processos inflamatórios e seu tratamento com hidróxido duplo lamelar (LDH) intercalado com ibuprofeno, de diferentes tecidos biológicos encontrados na cápsula articular de joelho de ratos da raça Wistar, sendo eles a membrana sinovial, cartilagem articular e ossos.

Foi feita uma extensa caracterização do LDH sintetizado utilizando as técnicas de análise elementar (ICP-OES), análise térmica (TG-DTG-MS), XRD, SEM, FT-Raman e FTIR, que possibilitaram a determinação de sua estrutura e composição. Foi feito também ensaio de perfil de dissolução do LDH intercalado com ibuprofeno (Ibup) e a caracterização, utilizando as mesmas técnicas citadas, desta matriz após esterilização por radiação ionizante.

Os experimentos *in vivo* foram realizados fazendo-se indução inflamatória em joelhos de ratos Wistar por administração intra-articular de Adjuvante Completo de Freund (ACF) em dois grupos de animais, um apenas com a indução inflamatória e o outro com indução inflamatória e tratamento por LDH-Ibup. As amostras dos tecidos biológicos foram coletadas após 7, 14, 21 e 28 dias após a administração de ACF.

Os espectros Raman obtidos dos tecidos biológicos mostraram que cada tecido estudado apresenta um perfil espectral característico em condições normais e que é possível acompanhar o processo inflamatório induzido em cada um deles pela variação de seu perfil espectral entre os diferentes estágios do processo inflamatório.

Os tecidos que passaram pela indução inflamatória concomitantemente ao tratamento com LDH-Ibup apresentaram o processo inflamatório drasticamente reduzido, principalmente em seu estágio mais crítico, 7 dias de inflamação, fato constatado tanto por espectroscopia Raman, quanto por análise histológica, especialmente na membrana sinovial.

Os resultados evidenciam uma ação terapêutica positiva do uso de LDH-Ibup em tratamento de inflamações articulares e a alta capacidade da espectroscopia Raman no acompanhamento desses processos.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Hidróxidos Duplos Lamelares, inflamação articular, ibuprofeno, liberação modificada de fármacos.

ABSTRACT

Gil, O. M. **Study of joint inflammatory process by Raman spectroscopy: action of lamellar compounds and detection of physiological changes.** 2023. 139p. Ph.D. Thesis - Chemistry Postgraduate Program. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this thesis, joint inflammatory processes and their treatment with Layered Double Hydroxide intercalated with ibuprofen (LDH-Ibup) were studied using Raman spectroscopy on different biological tissues found in the knee joint capsule of Wistar rats, including the synovial membrane, articular cartilage, and bones.

An extensive characterization of the synthesized LDH was carried out using elemental analysis (ICP-OES), thermal analysis (TG-DTG-MS), XRD, SEM, FT-Raman, and FTIR techniques, which allowed the determination of its structure and composition. Dissolution profile assay of the LDH intercalated with ibuprofen was performed and the characterization of this matrix after ionizing radiation sterilization was carried out using the same techniques mentioned.

The *in vivo* experiments were carried out by inducing inflammation in the knee joints of Wistar rats through intra-articular administration of Freund's Complete Adjuvant (FCA) in two groups of animals, one with only inflammatory induction and the other with the inflammatory induction and treatment with LDH-Ibup. Samples of the biological tissues were collected after 7, 14, 21, and 28 days after the administration of FCA.

The Raman spectra obtained from the biological tissues showed that each tissue studied has a characteristic spectral profile under normal conditions and that it is possible to follow the induced inflammatory process in each of them by the variation of its spectral profile between the different stages of the inflammatory process.

The tissues that underwent the concomitant induction of inflammation and treatment with LDH-Ibup showed the inflammatory process drastically reduced, especially in its most critical stage, 7 days of inflammation, a fact confirmed by both Raman spectroscopy and histological analysis, especially in the synovial membrane.

The results demonstrate a positive therapeutic action of using LDH-Ibup in the treatment of joint inflammations and the high capacity of Raman spectroscopy in monitoring these processes.

Keywords: Raman spectroscopy, Layered Double Hydroxides, joint inflammation, ibuprofen, modified drug release.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação dos espalhamentos elástico Rayleigh e inelásticos Anti-Stokes e Stokes nas curvas de energia potencial (V) em função da coordenada normal (Q_i)... 21
- Figura 2:** Histograma com a produção de artigos publicados em periódicos dos anos 2000 a 2021. Dados obtidos pela biblioteca digital da plataforma Periódicos CAPES, consultada em 15/01/2023. 23
- Figura 3:** Esquema da articulação de joelho humano. A região destacada em vermelho evidencia a posição da cápsula articular. Extraído e adaptado de Esmonde-White, 2009. 25
- Figura 4:** Fotomicrografia de corte histológico de joelho de rato corado com Hematoxilina e Eosina; extraído e adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008. (A) Côndilo do fêmur (superior) e epífise da tíbia (inferior); (B) Menisco (tecido cartilaginoso); (C) Diáfise da tíbia; (D) Tecido muscular; (E) Membrana sinovial; (F) Cavidade articular (local do fluido sinovial). 26
- Figura 5:** Representação esquemática da organização molecular da matriz da cartilagem hialina. Ao lado é mostrada a estrutura molecular do ácido hialurônico, formado por monômeros de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina. Figura extraída e adaptada de Junqueira e Carneiro, 2008. 28
- Figura 6:** Representação esquemática da extremidade de ossos da articulação de joelho. Extraído e adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008. 29
- Figura 7:** Estrutura esquemática da estrutura de um LDH onde A^{m-} corresponde ao íon intercalado e M^{2+} e M^{3+} a cátions metálicos. Figura extraída de Cunha, *et al.* (2010). 34
- Figura 8:** Esquema da montagem feita para os ensaios de liberação no modo estático. 48
- Figura 9:** Estrutura química dos enantiômeros de ibuprofeno. A esquerda é apresentado o S-(+)-ibuprofeno e a direita o R-(-)-ibuprofeno. 53
- Figura 10:** Espectro FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) do sal de sódio de ibuprofeno; em destaque é mostrada a região de altos números de onda. 54
- Figura 11:** Espectro ATR-FTIR do sal de sódio de ibuprofeno (Na-Ibup); em destaque é mostrada a região de altos números de onda. 54

Figura 12: Estrutura otimizada (forma S) para o íon ibuprofenato utilizando o funcional B3LYP e base atômica 6-31+g(d,p).	56
Figura 13: Espectros vibracionais teóricos corrigidos do íon ibuprofenato calculados por DFT. Acima encontra-se a simulação do espectro no infravermelho e, abaixo, a simulação do espectro Raman, ambos já corrigidos com fator de correção = 0,9679. O símbolo * evidencia as bandas atribuídas aos estiramentos simétrico e antissimétrico do grupo carboxilato.....	58
Figura 14: Esquema dos modos de interação do grupo carboxilato com um íon metálico.	60
Figura 15: Curvas TG-DSC e DTG-MS obtidas para o LDH-Cl.....	62
Figura 16: Curvas TG-DSC e DTG-MS obtidas para o LDH-Ibup.	63
Figura 17: Difrátogramas de raios X das matrizes de LDH-Cl e LDH-Ibup.	64
Figura 18: Estrutura de intercalação do ibuprofeno proposta para a matriz LDH-Ibup.66	
Figura 19: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) e FTIR da matriz de LDH-Cl.....	67
Figura 20: Espectro FTIR-ATR do LDH-Cl junto com sua deconvolução espectral da região de 1100 a 400 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em azul, vermelho e verde, respectivamente.	68
Figura 21: Espectro FTIR-ATR do LDH-Cl junto com sua deconvolução espectral da região de 1800 a 1200 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em azul, vermelho e verde, respectivamente.	68
Figura 22: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) e FTIR da matriz de LDH-Ibup.	71
Figura 23: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras LDH-Cl e LDH-Ibup nas magnificações de $\times 50.000$ (superior) e $\times 100.000$ (inferior).....	72
Figura 24: Difrátogramas de raios X de LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.	74
Figura 25: Espectros FTIR de Na-Ibup (ibuprofeno sódico), LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.....	76
Figura 26: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) de Na-Ibup (ibuprofeno sódico), LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.....	76
Figura 27: Espectros de absorção no UV-Vis das soluções de ibuprofeno sódico dissolvido em SSF com máxima concentração de 25 mg.L^{-1} (25 ppm).....	78
Figura 28: Curva de calibração de ibuprofeno sódico obtida pelo máximo de absorbância em 272 nm.	78

Figura 29: Perfil de liberação do ibuprofeno em porcentagem a partir da matriz de LDH-Ibup. Ensaios realizados em triplicata (n=3).....	80
Figura 30: Modelos cinéticos aplicados à amostra LDH-Ibup considerando 12 horas de liberação em SSF (pH = 7,4). Modelos (A) de ordem zero, (B) de primeira ordem, (C) de Higuchi, (D) Korsmeje-Peppas e (E) difusão parabólica.....	83
Figura 31: Fotografia da cápsula articular sem inflamação de joelho de rata Wistar com o nome de suas estruturas.	86
Figura 32: Espectro Raman médio obtido da membrana sinovial (preto) de ratos sadios e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.....	87
Figura 33: Espectros Raman (785 nm) de Colágeno tipo I, III e IV.	88
Figura 34: Espectro Raman médio obtido do menisco (preto) de ratos sadios e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.....	89
Figura 35: Espectro Raman médio obtido do côndilo da Tíbia (preto) de ratos sadios e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.....	91
Figura 36: Espectro Raman médio obtido do côndilo do Fêmur (preto) de ratos sadios e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.....	91
Figura 37: Fotografias da comparação entre o joelho sadio (seta preta) e do joelho com inflamação induzida (seta vermelha) após 7 dias pelas doses de 200 µL (A) e 100 µL (B) de ACF.	94
Figura 38: Espectro Raman médio obtido da membrana sinovial (preto) e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos do tecido controle (A), tecido com inflamação induzida por uma dose de 100 µL de ACF (B) e 200 µL de ACF (C).	95
Figura 39: Espectro Raman médio obtido do menisco (preto) e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos do tecido controle (A), tecido com inflamação induzida por uma dose de 100 µL de ACF (B) e 200 µL de ACF (C).	97
Figura 40: Espectro Raman médio obtido do côndilo do fêmur e da tíbia (preto) e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em	

diferentes pontos do tecido ósseo controle (A), tecido ósseo com inflamação induzida por uma dose de 100 μL de ACF (B) e 200 μL de ACF (C).....	99
Figura 41: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. As linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.	102
Figura 42: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório nas regiões de 1800 a 1550 cm^{-1} e 1050 a 800 cm^{-1}	103
Figura 43: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório na região 1500 a 950 cm^{-1}	104
Figura 44: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da menisco controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. As áreas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.	106
Figura 45: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da tíbia controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. A área tracejada evidencia a região de maior mudança espectral.	108
Figura 46: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos do fêmur controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. A área tracejada evidencia a região de maior mudança espectral.	109
Figura 47: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório e tratamento com LDH-Ibup.....	110
Figura 48: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos do menisco controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório e tratamento com LDH-Ibup	113
Figura 49: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos do fêmur controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório por ACF e tratamento com LDH-Ibup.....	114
Figura 50: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da tíbia controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório por ACF e tratamento com LDH-Ibup.....	115

Figura 51: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação. À esquerda são mostradas as articulações de joelho com inflamação induzida por ACF e à direita as articulações com inflamação induzida por ACF e tratadas com LDH-Ibup, com aumento de 4x. As setas em preto indicam regiões de maiores modificações. Coloração por H&E.	117
Figura 52: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação das regiões das articulações de joelho com inflamação induzida por ACF. Coloração por H&E.....	118
Figura 53: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação das regiões das articulações de joelho com inflamação induzida por ACF e tratadas com LDH-Ibup. Coloração por H&E.	119
Figura 54: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação. À esquerda são mostradas as articulações de joelho com inflamação induzida por ACF e à direita as articulações com inflamação induzida por ACF e tratadas com LDH-Ibup, com aumento de 4x. As setas em branco evidenciam as regiões de maiores modificações. Técnica utilizada: Picrosirius Red	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nome e pureza aproximada das proteínas utilizadas (Sigma-Aldrich).	39
Tabela 2: Reagentes utilizados nas sínteses e ensaios de liberação de fármaco.....	40
Tabela 3: Reagentes e quantidades utilizadas para preparo do meio de dissolução SSF.	47
Tabela 4: Atribuição tentativa para as bandas nos espectros Raman e de absorção no infravermelho baseada nas frequências vibracionais calculadas e corrigidas para a molécula de Na-Ibup (fator de correção = 0,9679) (Wong, 1996).	56
Tabela 5: Valores de ângulo de reflexão 2θ (graus) e distâncias interplanares $d(hk\ell)$ para as matrizes de LDH-Cl e LDH-Ibup.....	65
Tabela 6: Atribuições tentativas das bandas no infravermelho encontradas nos espectros da matriz de LDH-Cl.	69
Tabela 7: Valores médios de quantidade de Ibuprofeno liberado a partir da matriz de LDH-Ibup em SSF (37 °C) utilizando o método estático.....	79

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	19
1.1.	Apresentação do trabalho.....	19
1.2.	Espectroscopia Raman aplicada a sistemas biológicos	20
1.3.	Articulação de joelho: composição, função e estrutura química	24
1.4.	Processo inflamatório articular e seu tratamento	30
1.5.	Hidróxidos duplos lamelares e suas aplicações.....	33
2.	Objetivos.....	37
3.	Parte experimental	39
3.1.	Materiais.....	39
3.1.1.	Proteínas.....	39
3.1.2.	Ibuprofeno.....	40
3.1.3.	Reagentes de sínteses e ensaios de liberação de fármacos	40
3.1.4.	Indutor de inflamação.....	41
3.2.	Síntese e caracterização dos hidróxidos duplos lamelares (LDHs) com e sem ibuprofeno.....	41
3.3.	Esterilização dos materiais para implante	43
3.4.	Procedimentos cirúrgicos <i>in vivo</i>	43
3.4.1.	Animais.....	43
3.4.2.	Grupos de estudo	44
3.4.3.	Anestesia.....	44
3.4.4.	Ato Operatório.....	44
3.4.4.1.	Joelho.....	44
3.4.4.2.	Controle da dor após cirurgia	45
3.4.4.3.	Coleta das amostras biológicas.....	45
3.4.4.4.	Sacrifício e descarte.....	45

3.5.	Análises histológicas.....	46
3.5.1.	Coração por hematoxilina e eosina (H&E) e <i>Picrosirius Red</i> (Picro)	46
3.6.	Ensaio de liberação do Ibuprofeno <i>in vitro</i>	47
3.7.	Instrumentação.....	48
3.7.1.	Espectroscopia de absorção no infravermelho	48
3.7.2.	Espectroscopia Raman.....	48
3.7.3.	Difratometria de raios X.....	49
3.7.4.	Espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	49
3.7.5.	Análise elementar	49
3.7.6.	Análise térmica	50
3.8.	Processamento dos espectros.....	50
3.9.	Simulações vibracionais.....	50
4.	Resultados e discussões	52
4.1.	Caracterizações do ibuprofeno e matrizes de hidróxidos duplos lamelares (LDHs).....	52
4.1.1.	Caracterização do ibuprofeno sódico	52
4.1.2.	Caracterização das matrizes de Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs).....	60
4.1.3.	Caracterização das matrizes de Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs) esterilizadas por radiação ionizante.....	73
4.1.4.	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> no modo estático do ibuprofeno intercalado na matriz de hidróxido duplo lamelar	77
4.2.	Análises da evolução temporal do processo inflamatório dos componentes da cápsula articular de joelho de ratos Wistar	85
4.2.1.	Caracterização dos tecidos biológicos sadios (controle)	85
4.2.1.1	Caracterização da membrana sinovial.....	86
4.2.1.2	Caracterização do tecido cartilaginoso (menisco)	88
4.2.1.3	Caracterização do tecido ósseo.....	90

4.2.2. Caracterização dos tecidos com inflamação induzida por administração de Adjuvante Completo de Freund (ACF) com e sem LDH-Ibup	93
4.2.2.1. Teste de dose de Adjuvante Completo de Freund (ACF)	93
4.2.2.2. Análise da evolução temporal do processo inflamatório induzido por ACF para a membrana sinovial	100
4.2.2.3. Análise da evolução temporal do processo inflamatório induzido por ACF para o menisco	105
4.2.2.4. Análise da evolução temporal do processo inflamatório induzido por ACF nos tecidos ósseos.....	105
4.2.2.5. Análise da evolução do processo inflamatório na membrana sinovial induzido por ACF e tratado com LDH-Ibup.....	108
4.2.2.6. Análise da evolução do processo inflamatório no menisco induzido por ACF e tratados com LDH-Ibup.....	110
4.2.2.7. Análise da evolução do processo inflamatório na tíbia e fêmur induzido por ACF e tratados com LDH-Ibup.....	112
4.2.2.8. Análises histomorfológicas dos tecidos da articulação.....	114
5. Conclusão	124
6. Referências	127
Súmula Curricular	140

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Apresentação do trabalho

A Tese que será apresentada é fruto de uma colaboração de longa data entre três grupos de pesquisa, o Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM), o qual originou este trabalho, orientado pela Profa. Dalva Lúcia Araújo de Faria, docente do IQUSP e coordenadora do grupo de espectroscopia Raman aplicada, o Laboratório de Sólidos Lamelares (LabSol) coordenado pela Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino também docente do IQ-USP e o Laboratório de Pesquisa Experimental coordenado pelo Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh do Departamento de Cirurgia da EPM-UNIFESP.

O grupo da Profa. Dra. Vera R. L. Constantino possui interesse na área de química inorgânica, principalmente no desenvolvimento e aprimoramento de estruturas e propriedades físico-químicas de materiais híbridos, especialmente matrizes inorgânicas com capacidade de troca e captura de diversos tipos de íons e moléculas neutras. Nessa linha de pesquisa estão inseridos os hidróxidos duplos lamelares (LDHs) intercalados com moléculas naturais ou sintéticas de interesse farmacológico como antioxidantes e fármacos com propriedades anti-inflamatórias (Constantino, *et al.*, 2023; Cunha, *et al.*, 2016; Cunha, *et al.*, 2020; Eulálio, 2019; Eulálio, *et al.*, 2023; Guilherme, *et al.*, 2022).

Tais estudos acerca do desenvolvimento de materiais híbridos carregados com fármacos anti-inflamatórios levantaram o questionamento de como seria o comportamento desses materiais quando em contato com sistemas biológicos, visto sua capacidade de liberação dessas moléculas *in loco* e suas propriedades terapêuticas, de biointegração e de biocompatibilidade gerando assim os estudos *in vivo* que foram feitos em colaboração e sob orientação do Prof. Dr. Ivan H. J. Koh.

Assim, neste contexto se insere o grupo de espectroscopia Raman aplicada, coordenado pela Profa. Dra. Dalva L. A. de Faria que além de ter orientado o trabalho que investigou estruturas e propriedades físico-químicas de LDHs em aplicações como microambientes para moléculas de interesse na química pré-biótica (Souza, 2017), também tem colaborações em trabalhos que envolvem sistemas biológicos, como caracterização por espectroscopia Raman de pele e unhas humanas (De Faria e de Souza, 1999), o estudo de acompanhamento de reparo de vasos sanguíneos

anastomosados (da Silva, 2013) e mais recentemente a orientação da Dissertação de Mestrado na qual foram investigados por espectroscopia Raman os processos de reparo tecidual de músculos com e sem implantes de LDHs com o fármaco anti-inflamatório sulindaco (Gil, 2015; Gil, *et al.*, 2016), a qual devido aos resultados positivos, originou a ideia desta Tese.

1.2. Espectroscopia Raman aplicada a sistemas biológicos

No contexto da biomedicina, a espectroscopia Raman é uma valiosa técnica para o estudo de sistemas biológicos por se tratar de uma técnica não invasiva e não destrutiva que fornece informações a cerca de vibrações moleculares. Tais vibrações por sua vez, são características das moléculas que em seu conjunto único formam o espectro Raman que pode ser considerado, a grosso modo, como um impressão digital da molécula. Comparada a técnicas consideradas “gold standards” para amostras biológicas, como as técnicas histológicas e histoquímicas, também fornece informações acerca da composição bioquímica e estrutural de forma muito mais rápida e sem a necessidade de derivatização da amostra, como por exemplo, a necessidade de processos de descalcificação para estudos de tecidos ósseos e o uso de diferentes corantes para cada tipo de análise histológica.

A espectroscopia Raman fundamenta-se no fenômeno físico de espalhamento inelástico de uma radiação monocromática frente a uma molécula prova. Tal molécula apresentará atividade Raman, caso apresente variação na sua polarizabilidade, α , em relação à coordenada normal de vibração, Q_i , em torno de sua posição do equilíbrio, $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$. Sob a molécula incide a radiação monocromática de energia $E = h\nu_0$ perturbando-a e a levando a um estado virtual de maior energia, a partir do qual são espalhados fótons. A Figura 1 exemplifica as possibilidades de espalhamento de radiação eletromagnética em que são apresentadas as curvas de energia potencial (V) em função de uma coordenada normal da vibração (Q_i).

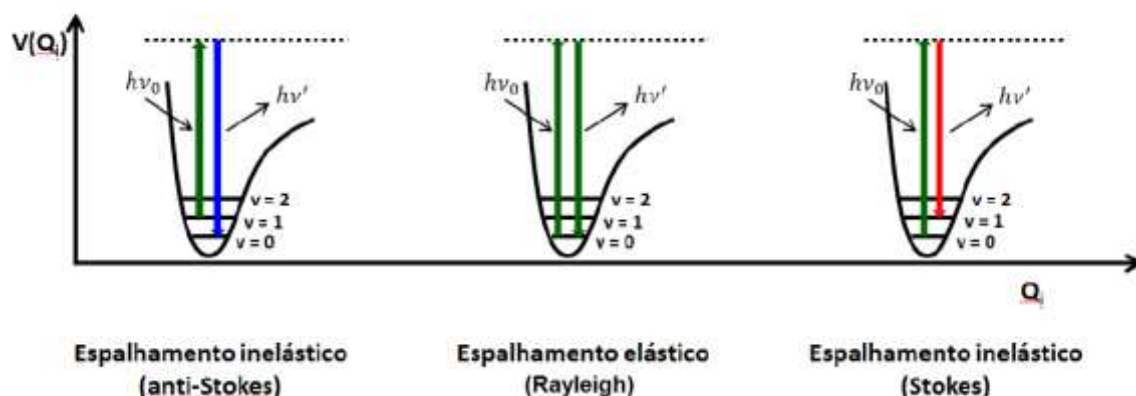


Figura 1: Representação dos espalhamentos elástico Rayleigh e inelásticos Anti-Stokes e Stokes nas curvas de energia potencial (V) em função da coordenada normal (Q_i).

O espalhamento mais intenso observável é o espalhamento elástico, conhecido também como espalhamento Rayleigh, em que o fóton espalhado tem a mesma energia do fóton incidente sendo, portanto, nula a diferença de energia observada ($\Delta E = hv_0 - hv' = 0$) (Hollas, 2008; Sala, 2008).

O espalhamento Anti-Stokes é definido quando a molécula já em um estado vibracional excitado espalha um fóton de energia maior que a energia incidente, $hv' = hv_0 + e_v$, sendo e_v a diferença de energia entre níveis vibracionais consecutivos, levando a molécula a um estado vibracional de menor energia do que o estado de partida, gerando uma diferença de energia negativa ($\Delta E = hv_0 - hv' < 0$) (Hollas, 2008; Sala, 2008). Apesar de não ter sido utilizada neste trabalho, vale comentar a existência de um recurso avançado da espectroscopia Raman que vem sendo empregado com sucesso em aplicações biológicas e médicas e que usa o espalhamento Raman coerente na região Anti-Stokes (CARS, Coherent Anti-Stokes Raman Scattering). Esse recurso é mais eficiente que a espectroscopia Raman convencional do ponto de vista de secção de choque para espalhamento, porém, apresenta algumas limitações, entre elas o custo e a maior complexidade instrumental, já que usa uma combinação de lasers pulsados para levar a molécula ao estado vibracional excitado previamente à coleta dos fótons espalhados. Seu enorme potencial de aplicação na área biomédica a torna digna de menção, já é considerada uma técnica no estado da arte em aplicações em medicina diagnóstica e imageamento de amostras biológicas (Downes e Elfick, 2010; Evans e Xie, 2008; Krafft e Popp, 2015; Li, et al., 2020; McVey e Crain, 2014; Rae, et al., 2014; Tu e Boppart, 2014)

Enfim, o espalhamento Raman considerado convencional também nomeado como espalhamento Stokes é definido quando a molécula é excitada de um determinado nível vibracional a um estado virtual e decai para um nível vibracional mais energético, gerando um fóton espalhado de energia menor do que o fóton incidente, $E = hv' = hv_0 - e_v$. Assim a diferença de energia observada é positiva ($\Delta E = hv_0 - hv' > 0$).

A aplicação da espectroscopia Raman no campo da biomedicina apresenta diversos desafios devido à alta complexidade molecular das amostras de origem biológica que normalmente são compostas por macromoléculas como proteínas e lipídios. Além disso, é comum que tais que tecidos biológicos apresentem um fundo de luminescência que se sobrepõe às bandas Raman obscurecendo-as, principalmente no estudo de sistemas que envolvem processos inflamatórios, de reparo tecidual e neoplasias em que há uma cascata de liberação de diferentes proteínas, matrizes extracelulares e células de defesa como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (Bergholt, *et al.*, 2019).

Assim, faz-se necessária a escolha de comprimentos de onda de excitação adequados, visando reduzir tal fundo de autoluminescência e maximizar o sinal Raman obtido. É comum que a otimização do sinal se mostre suficiente e com baixa luminescência quando são utilizados lasers de comprimentos de onda na região no infravermelho próximo, *Near-Infrared* (NIR), entre 785 a 1064 nm (Jie Lim, *et al.*, 2011); fazendo com que dificilmente seja possível empregar linhas laser na região visível do espectro eletromagnético para obtenção de espectros Raman nesse tipo de sistema, já que a intensidade Raman é proporcional à quarta potência do comprimento de onda de excitação, ν_0^4 , e o fundo de autoluminescência aumenta em comprimentos de onda que tendem à região do ultravioleta (Bergholt, *et al.*, 2019; De Faria e de Souza, 1999).

Visto a grande aplicabilidade e versatilidade da espectroscopia Raman, estudos que a envolvem em aplicações biomédicas tem aumentado ano a ano. Ao fazer uma busca pelas palavras-chave “Raman and Tissue e Raman and Biological” na biblioteca digital disponibilizada na plataforma Periódicos CAPES, foi montado o histograma do número de artigos publicados a partir dos anos 2000 até 2021 e que é mostrado na Figura 2.

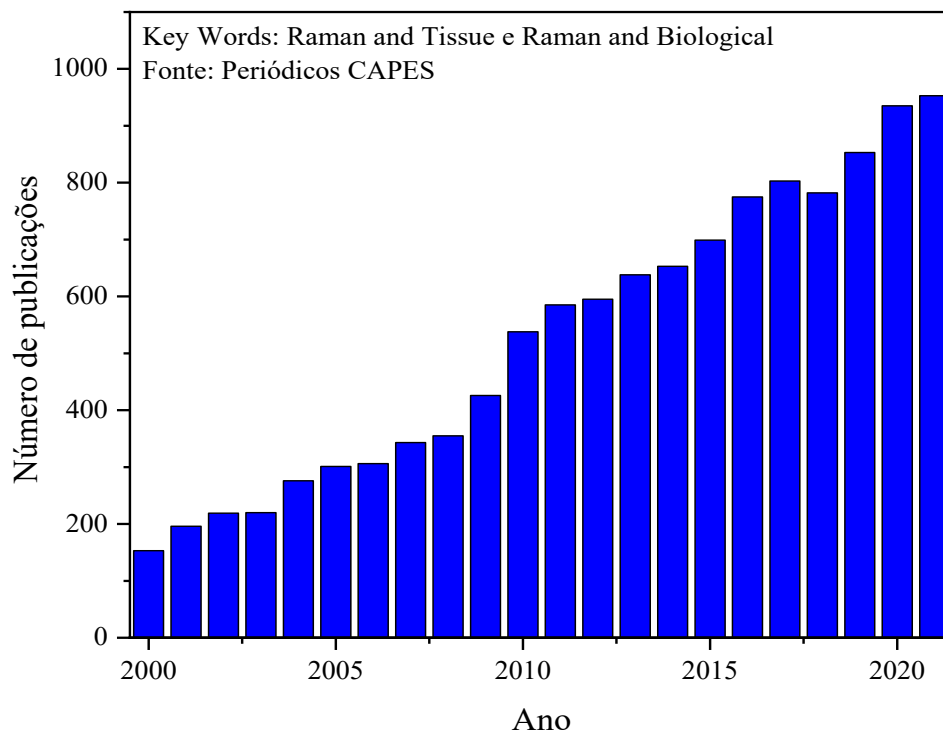


Figura 2: Histograma com a produção de artigos publicados em periódicos dos anos 2000 a 2021. Dados obtidos pela biblioteca digital da plataforma Periódicos CAPES, consultada em 15/01/2023.

A popularização das aplicações da espectroscopia Raman na área biomédica justificada pelo aumento das publicações com as palavras-chave citadas acima pode ser explicado principalmente por diversos avanços tecnológicos como, por exemplo, o desenvolvimento de detectores mais sensíveis do tipo CCDs, *Charged-Coupled Devices*, com tamanhos de pixel cada vez menores (Krafft, *et al.*, 2017) e sistemas de dispersão de luz mais avançados, como redes de difração do tipo VPHG, *Volume Phase Holographic Grating*, que acopla duas ou mais redes de difração em um pequeno espaço físico do equipamento, permitindo uma melhora significativa da resolução espectral e a miniaturização dos espectrômetros (Cabrero, *et al.*, 2019; Soliman, *et al.*, 2022). Tal miniaturização dos espectrômetros Raman permitiu a utilização desta técnica em ambientes clínicos e em campo, tornando possível realizar medições e imageamento *in situ*, *in vivo* e em tempo real (Pinto, *et al.*, 2019; van Breugel, *et al.*, 2023; Žuvela, *et al.*, 2019).

Desta forma, a espectroscopia Raman tem sido amplamente usada no acompanhamento e identificação de diversos tipos de carcinomas e neoplasias (Hanna, *et al.*, 2022; Ralbovsky e Lednev, 2019; Traynor, *et al.*, 2021), além da caracterização

de diferentes tipos de tecidos de origem biológica como pele, tecidos adiposos, tecidos cerebrais, culturas celulares e também no acompanhamento de processos inflamatórios e de reparo tecidual (Alimova, *et al.*, 2009; Chaudhary, *et al.*, 2021; Crane e Elster, 2012; da Silva, 2013; Gautam, *et al.*, 2015; Imas, *et al.*, 2020; Jain, *et al.*, 2014; Makowski, *et al.*, 2012; van der Laan, *et al.*, 2021).

1.3. Articulação de joelho: composição, função e estrutura química

As articulações de um organismo, por definição, são pontos de conexão entre dois ou mais ossos de seu corpo, que permitem o movimento e a flexibilidade dos membros adjacentes (Tortora e Derrickson, 2016). Especialmente articulações de joelhos humanos tem como função principal permitir a flexão e extensão das pernas, o que é fundamental para a locomoção e realização de atividades cotidianas, como caminhar, correr, saltar e subir escadas. Além disso, a articulação do joelho também fornece estabilidade e suporte à perna, ajudando a distribuir o peso corporal e a absorver impacto durante o movimento (Hirschmann e Müller, 2015; Junqueira e Carneiro, 2008).

As articulações do joelho possuem, na região de encontro dos ossos, o que é chamado de cápsula articular, e sua estrutura é composta por tecidos cartilagosos mineralizados e não-mineralizados, ossos, membrana sinovial e líquido sinovial. Um esquema da estrutura articular de joelho humano é mostrado na Figura 3.

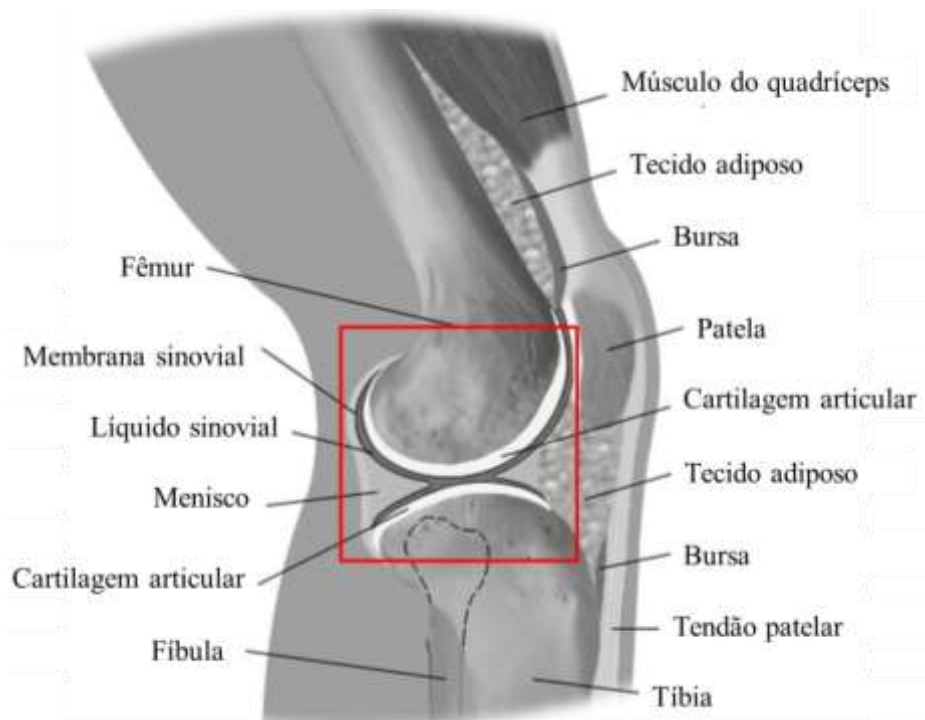


Figura 3: Esquema da articulação de joelho humano. A região destacada em vermelho evidencia a posição da cápsula articular. Extraído e adaptado de Esmonde-White, 2009.

A Figura 3 mostra a localização da cápsula articular em que entre as extremidades dos ossos, côndilo do fêmur e epífise da tibia, encontra-se o menisco (tecido cartilaginoso não-mineralizado) encapsulados pela membrana sinovial externa com todas as cavidades entre eles preenchidas por líquido sinovial. Além disso, encontram-se tecidos fibrosos musculares e diversos ligamentos e tendões na parte externa à cápsula que auxiliam na estabilização dos movimentos da articulação.

Sendo os componentes da cápsula articular de joelhos de ratos os objetos de estudo deste trabalho, é de extrema importância saber sua composição química, uma vez que este sistema se assemelha quimicamente e funcionalmente à articulação de joelhos humanos. A fim de se evidenciar a similitude entre os joelhos de ratos e humanos, é mostrada na Figura 4 uma fotomicrografia de um corte histológico de joelho de rato corado com Hematoxilina e Eosina, H&E.

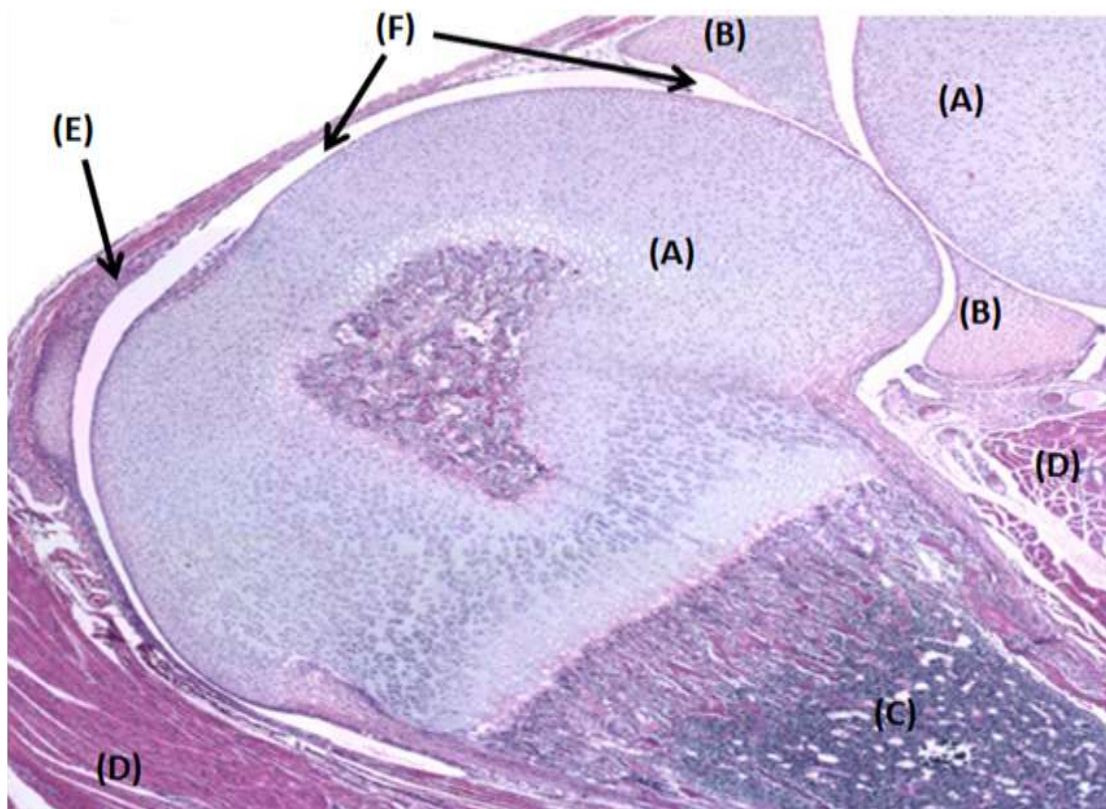


Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico de joelho de rato corado com Hematoxilina e Eosina; extraído e adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008. (A) Côndilo do fêmur (superior) e epífise da tíbia (inferior); (B) Menisco (tecido cartilaginoso); (C) Diáfise da tíbia; (D) Tecido muscular; (E) Membrana sinovial; (F) Cavidade articular (local do fluido sinovial).

Nos ratos, a membrana sinovial consiste em uma camada fina não vascularizada, com espessura aproximada de 10 μm , composta essencialmente por tecidos conjuntivos similares ao tecido epitelial com presença majoritária de dois tipos de células, os fibroblastos e as semelhantes a macrófagos, também chamadas de sinoviócitos. Grande parte desse tecido é composto por matriz extracelular e fibras colágenas do tipo I e III que são responsáveis pela sua elasticidade frente à movimentação. A superfície interna da membrana sinovial apresenta uma camada de glicoproteínas, que facilitam a lubrificação interna e previnem a adesão das superfícies articulares. Como funções principais, a membrana sinovial cria uma barreira física que mantém o líquido sinovial confinado na cápsula e fornece por difusão compostos como fatores de crescimento, células de defesa (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eusínófilos), glicosaminoglicanos (GAGs), sais inorgânicos, ácido hialurônico e outras substâncias

com função de nutrição e proteção das superfícies articulares além da remoção de rejeitos celulares provenientes das cartilagens, como o menisco (Junqueira e Carneiro, 2008; Kemble e Croft, 2021; van Weeren, 2014) .

O líquido sinovial, caracteriza-se por ser um líquido viscoso e denso, rico em ácido hialurônico, GAGs e diferentes proteínas sinoviais, como a lubrificina, por exemplo. O ácido hialurônico, componente majoritário, é uma molécula de alto peso molecular que atua como lubrificante, ajudando a preencher o espaço entre as superfícies articulares e permitindo um movimento fluido da articulação. Ele preenche a cavidade articular, que em joelhos de ratos possui volume aproximado de 250 μ L, e possui entre suas funções principais a lubrificação das superfícies dos demais tecidos da cápsula articular, bem como atuar como uma via de difusão de metabólitos e nutrientes permitindo sua circulação entre tais tecidos. Além disso, também possui a importante função de absorção da energia proveniente de choques e impactos mecânicos, o que ajuda na prevenção do desgaste e possíveis lesões (Culemann, *et al.*, 2019; Orr, *et al.*, 2017).

É interessante mencionar que as moléculas encontradas na composição do líquido sinovial, como o ácido hialurônico, além de possuir um papel importante na composição estrutural de outros tecidos como as cartilagens, também apresentam, por exemplo, função regulatória em processos biológicos que envolvem a junção de moléculas de glicose, glicação, a citocinas e enzimas encontradas em fases avançadas de processos artríticos e desta forma combatendo a inflamação, evidenciando assim um alto grau de interação entre os componentes do tecidos e diferentes atividades biológicas que o organismo apresenta ao longo de sua vida (Neumann, *et al.*, 1999; Wang, *et al.*, 2006).

A terceira componente da articulação são as cartilagens conhecidas como cartilagens de hialina ou cartilagens articulares. Tal tecido é o foco de diversos estudos por serem encontradas tanto nos tecidos puramente cartilagosos não-mineralizados, no caso o menisco, quanto em tecidos em processo de calcificação, especialmente recobrimo superfícies das extremidades dos ossos em fase de crescimento e no disco epifisário, que separa as regiões da diáfise e epífise em ossos como o fêmur e tíbia. Em sua composição são encontradas células conhecidas como condrócitos e condroblastos, sendo as primeiras responsáveis por fornecer suporte e revestimento e o segundo tipo pela produção e liberação de matriz extracelular. Além das células, são encontradas fibras colágenas do tipo II firmemente unidas a componentes de matriz extracelular

como sulfatos de condroitina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. A Figura 5 mostra uma representação esquemática da organização molecular na matriz de cartilagem hialina em que são destacadas as interações covalentes entre as moléculas de ácido hialurônico e proteínas de ligação, formando os conhecidos proteoglicanos. Esses por sua vez possuem também em sua estrutura cadeias de sulfatos de condroitina que possibilitam a interação eletrostática deste proteoglicano sulfatado com as fibrilas de colágeno tipo II (Eschweiler, *et al.*, 2021; Gaut e Sugaya, 2015; Peng, *et al.*, 2021).

Os proteoglicanos sulfatados encontrados na cartilagem articular possuem como função essencial atrair e reter moléculas de água, que por sua vez ajudam a amortecer os impactos sofridos. Cartilagens do tipo hialina possuem grande quantidade de moléculas de água em sua composição, podendo chegar de 60 a 80% de sua massa total. Já as fibras de colágeno tipo II são responsáveis pela estabilidade estrutural da cartilagem.

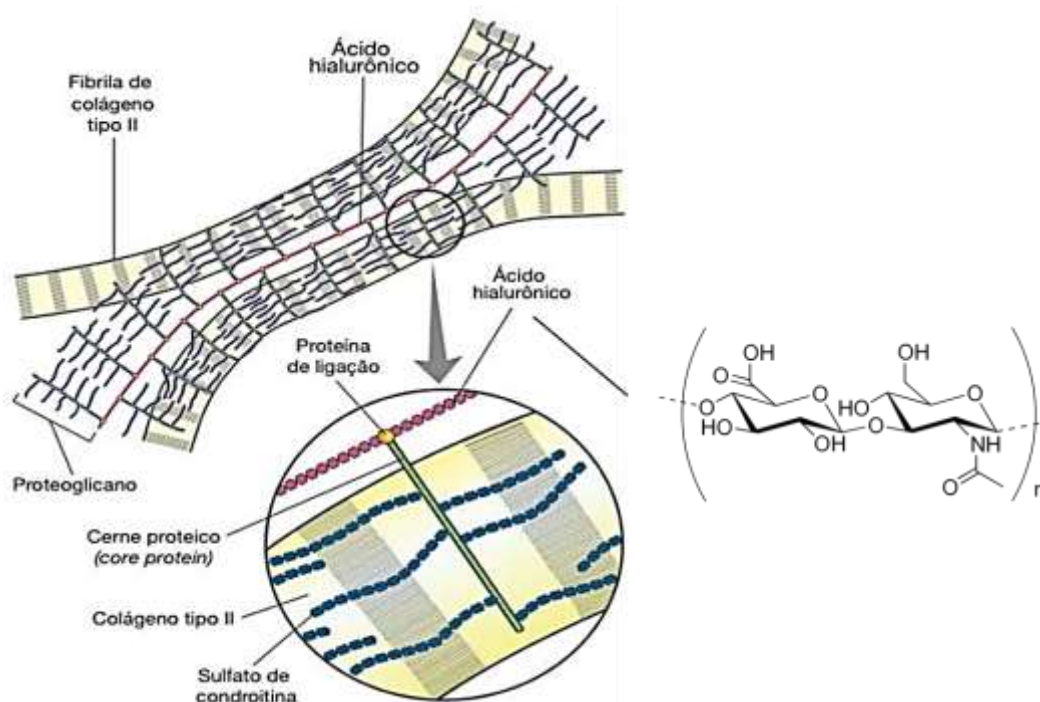


Figura 5: Representação esquemática da organização molecular da matriz da cartilagem hialina. Ao lado é mostrada a estrutura molecular do ácido hialurônico, formado por monômeros de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina. Figura extraída e adaptada de Junqueira e Carneiro, 2008.

Dentro da cápsula articular são encontradas as regiões corticais dos ossos da tíbia e do fêmur. A região cortical desses ossos pode ser classificada como uma região de ossos subcondrais, ou seja, há em sua superfície uma camada de cartilagem hialina

proveniente da gênese do tecido que ao se desenvolver é calcificada. A Figura 6 mostra um esquema da extremidade dos ossos mencionados acima. A calcificação dos condrócitos é um processo complexo que ocorre como parte da maturação dos tecidos do osso. Inicialmente, as células condróticas produzem matriz extracelular que é rica em proteoglicanos e colágeno. Com o tempo e com sinalizações do organismo, os condrócitos morrem por apoptose programada e a matriz ao seu redor começa a se mineralizar, formando pequenos cristais de hidroxiapatita. Migram então para essa região as células conhecidas como osteoblastos, que são responsáveis pela liberação de matriz orgânica, essencialmente colágenos do tipo I. Os cristais de hidroxiapatita se aglutinam e se alinham às fibras colágenas formando uma camada mineralizada cada vez mais espessa e densa e diminuindo cada vez mais a camada de cartilagens não-mineralizadas na superfície do osso. A evolução da calcificação dos condrócitos é regulada por uma série de fatores, incluindo o suprimento de cálcio e fosfato, fatores de crescimento e sinalizações celulares (Florencio-Silva, *et al.*, 2015; Junqueira e Carneiro, 2008)

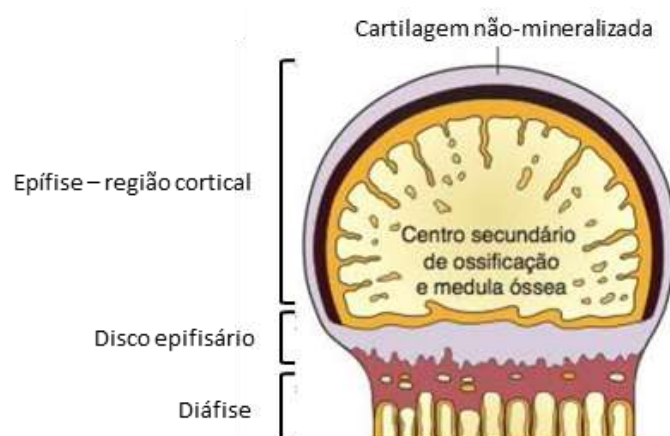


Figura 6: Representação esquemática da extremidade de ossos da articulação de joelho. Extraído e adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008.

Além dos osteoblastos, são também encontradas as células especializadas chamadas de osteoclastos com características fagocitárias, responsáveis por processos de reabsorção óssea, assim mantendo o tecido ósseo em constante remodelamento. Diversos estudos relacionam o aumento de osteoclastos no tecido ósseo com a evolução de processos inflamatórios e metastases ósseas, como as artrites e carcinomas. Assim, pode-se considerar que em indivíduos adultos e saudáveis a composição dos ossos corticais pode atingir aproximadamente 85% de sua massa total em hidroxiapatita e o

restante em componentes de matriz extracelular, majoritariamente colágenos tipo I, lembrando que tal composição é altamente dependente da idade do organismo e de processos de degradação ou reparo e remodelamento que o organismo tenha sofrido (Florencio-Silva, *et al.*, 2015; Goldring e Goldring, 2010; Goldring, 2012).

1.4. Processo inflamatório articular e seu tratamento

Processos inflamatórios são respostas de defesa do sistema imunológico que visam proteger o organismo contra ameaças externas, como infecções bacterianas ou virais, presença de corpo estranho, traumas teciduais e disfunções autoimunes. Durante a resposta inflamatória há uma cascata de eventos em nível molecular e celular que acontecem simultaneamente, tornando-a um processo desafiador de ser estudado (Medzhitov, 2008; Midwood, *et al.*, 2004).

Especificamente em articulações, existe uma ampla variedade de condições inflamatórias que as afetam, sendo utilizado genericamente o termo “artrite” para denominá-las. De modo geral, todas podem afetar a região da cápsula articular dos joelhos causando dor, inchaço, rigidez motora, e em casos extremos a perda da função articular. É uma das doenças reumáticas mais comuns, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a artrite pode afetar cerca de 10% da população mundial, já nos Estados Unidos, foi estimado pela “Arthritis Foundation” que em 2017 tal patologia acometia cerca de 50 milhões de adultos, ou cerca de 1 em cada 4 adultos (Barbour, 2017; Barbour, *et al.*, 2013). No Brasil é estimado que cerca de 4% da população é afetada (Burgos-Vargas, *et al.*, 2014; Senna, *et al.*, 2004).

Dentre as variações das artrites, destaca-se a osteoartrite, que tem origem multifatorial e envolve uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Alguns dos principais fatores de risco incluem idade avançada, lesão articular prévia, obesidade, trabalho físico pesado e outros distúrbios autoimunes (Martel-Pelletier, *et al.*, 2016).

A osteoartrite, em seu estágio inicial, caracteriza-se pela alta atividade metabólica e sintética dos condrócitos localizados nas superfícies dos ossos subcondrais na articulação modificando-a e expondo suas camadas inferiores, iniciando assim o início da erosão das fibras colágenas da estrutura cartilaginosa e óssea. A partir desse estágio os danos geralmente são irreversíveis, chegando até a ocorrer danos na medula óssea. Do ponto de vista da membrana sinovial, que é o primeiro tecido a ser afetado

pelo processo inflamatório por ser uma fina camada celular, há uma hiperplasia no tecido causada pela infiltração de monócitos, macrófagos, células do tipo fibroblastos e a formação de fibrose pela alta sintetização de matriz extracelular local, principalmente monômeros de colágenos tipo I (prócolágenos) (Neumann, *et al.*, 2010; Qu, *et al.*, 1994). Há também a migração de fatores pró-inflamatórios provenientes da degradação da região cartilaginosa para a membrana sinovial, aumentando assim sua hiperplasia em um processo de retroalimentação positiva da inflamação (Tetlow, *et al.*, 2001). Assim, mostra-se que o processo inflamatório articular é interconectado entre os tecidos da cápsula articular e diretamente dependente da intensidade da resposta imune do organismo, o que explica o motivo de ainda hoje ser uma doença alvo de diversos estudos.

Uma vez detectado o processo artrítico, diversos tipos de tratamentos podem ser propostos pelo médico responsável. Sendo eles de cunho farmacológico ou não-farmacológico e dependentes do estágio e localização em que a patologia foi identificada. Em estágios iniciais e em joelhos, por exemplo, podem ser recomendadas fisioterapias voltadas à adaptação do organismo frente a desgastes físicos. Em casos mais intensos a terapia farmacológica é indispensável. Nestes casos a patologia pode ser dividida em três estágios: brando, intermediário e avançado (Martel-Pelletier, *et al.*, 2016; McAlindon, *et al.*, 2014).

No estágio brando são recomendados os tratamentos com fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs), que atuam na via metabólica do ácido araquidônico, responsável pelo desencadeamento do processo inflamatório, inibindo de forma específica ou não a ação das enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX 1 e COX 2) que catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, moléculas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, como resposta a lesões, inflamação e dor. Alguns NSAIDs comumente utilizados nestes tratamentos são o diclofenaco, ácido acetilsalicílico, celecoxib, naproxeno e ibuprofeno (Crofford, 2013; Thakur, *et al.*, 2018), sendo o último a molécula alvo do estudo aqui apresentado.

No estágio intermediário, é recomendado o uso de fármacos esteroidais, também conhecidos como corticosteroides, e são utilizados devido à sua potente ação anti-inflamatória que atua reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores da inflamação, resultando em uma redução da inflamação e da dor nas articulações afetadas. Além disso, os corticosteroides também têm propriedades

imunossupressoras, motivo pelo qual são receitados em casos de artrites autoimunes. Prednisona, metilprednisolona e dexametasona são os corticoesteróides mais utilizados no tratamento de artrites (Iwami, *et al.*, 2022; Martel-Pelletier, *et al.*, 2016; Stone, *et al.*, 2021; Thakur, *et al.*, 2018).

No estágio avançado, intervenções cirúrgicas muitas vezes são realizadas removendo parcialmente tecidos cartilagosos altamente degradados, como o menisco. São receitados, além dos fármacos esteroidais, fármacos antireumáticos modificadores da doença, *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs* (DMARDs), que são uma classe de medicamentos que agem para alterar o curso da doença, ao invés de apenas aliviar os sintomas ou inibir a resposta imune. Eles são geralmente usados quando outros tratamentos, como o uso de NSAIDs e medicamentos sintomáticos, não conseguem controlar adequadamente a doença. Alguns DMARDs mais utilizados são a sulfassalazina e o metotrexato (Caporali, *et al.*, 2008).

Ainda sobre os tratamentos dos processos inflamatórios artríticos, as opções clínicas para a entrega de fármacos predominantemente incluem a administração sistêmica, via oral, e a injeção direta na articulação (Brown, *et al.*, 2019).

A administração oral é comum para os NSAIDs e outros medicamentos para controle da dor devido à facilidade e frequência de administração. No entanto, a exposição sistêmica prolongada a esses medicamentos NSAIDs coloca os pacientes em risco de complicações gastrointestinais e cardiovasculares graves (Lanas, 2009).

A injeção intra-articular é uma alternativa vantajosa à administração sistêmica para medicamentos destinados ao tratamento dos tecidos da articulação, mas que apresentam alto risco de toxicidade sistêmica e local, baixa biodisponibilidade articular causadas pela rápida absorção das moléculas biologicamente ativas pelo organismo gerando uma duração insuficiente da permanência do fármaco, além do risco de infecção associado ao procedimento de punção (Brown, *et al.*, 2019). Em relação à biodisponibilidade, por exemplo, estima-se que para injeção direta de NSAIDs, como paracetamol, salicilato e diclofenaco em modelos de artrite reumatóide humana o tempo de meia-vida desses fármacos após a administração varia entre 1 a 5 horas (Owen, *et al.*, 1994), sendo considerado baixo para uma ação efetiva além de gerar a necessidade de aplicações adicionais para manutenção do tratamento.

Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade local de fármacos um esforço significativo tem se concentrado no desenvolvimento de sistemas de liberação prolongados administrados via injeção intra-articular, visando direcionar o composto

ativo para os tecidos ou células alvo, aumentando assim a eficiência do tratamento, reduzindo a dose necessária para atingir o efeito terapêutico, além de diminuir os efeitos colaterais fora do alvo e aumentar o tempo de permanência na articulação como um todo (Brown, *et al.*, 2019; Mwangi, *et al.*, 2018).

Diversos modelos de matrizes para com capacidade de carregamento de fármacos vem sendo estudados com o objetivo de aumentar a retenção e farmacocinética de medicamentos, entre eles é válida a menção de sistemas que têm tecidos cartilaginoso como alvo e que se utilizam de matrizes poliméricas para encapsulamento de fármacos e proteínas (Mwangi, *et al.*, 2018), do uso de nanotubos de carbono funcionalizados com polietilenoglicol (Sacchetti, *et al.*, 2014) e liposomas modificadas com anticorpos (anti-colágenos tipo II) (Cho, *et al.*, 2018; Cho, *et al.*, 2014). Para tratamentos em que a membrana sinovial é o alvo, modelos que utilizam carregadores nanométricos com tamanho de partícula entre 5 a 200 nm podem ser utilizados pela facilidade de permeação e retenção neste tecido, entre os modelos podem ser encontrados o uso de nanopartículas de ouro (Labens, *et al.*, 2013) e os nanotubos de carbono (Nomura, *et al.*, 2015).

Estes estudos em que o uso de diferentes matrizes injetadas diretamente na articulação auxilia o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, podendo ser alvo-específicos e também sistemas de liberação prolongada, originou a ideia da aplicação de hidróxidos duplos lamelares, que serão descritos a frente com suas propriedades e potencialidades, como matrizes primárias para carregamento de fármacos em sistemas modelo de inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freund em ratos, bem como o acompanhamento da evolução da inflamação e de seu tratamento.

1.5. Hidróxidos duplos lamelares e suas aplicações

No contexto das inflamações articulares, diferentes estratégias terapêuticas vem sendo consideradas para minimizar o agravamento de inflamações articulares, dentre elas está a administração de matrizes inorgânicas que liberam, localmente e progressivamente, anti-inflamatórios ou outras substâncias capazes de proporcionar benefício aos pacientes (Cunha, *et al.*, 2020; Jr. da Costa Fernandes, *et al.*, 2019; Riaz e M. Ashraf, 2013; Zhang, *et al.*, 2014).

Uma classe de compostos que possibilita tal estratégia são os hidróxidos duplos lamelares, *Layered Double Hydroxides* (LDHs) por possuírem estrutura com a

capacidade de acomodar íons de interesse farmacológico entre suas camadas bidimensionais. A Figura 7 mostra uma representação esquemática da estrutura de um LDH.

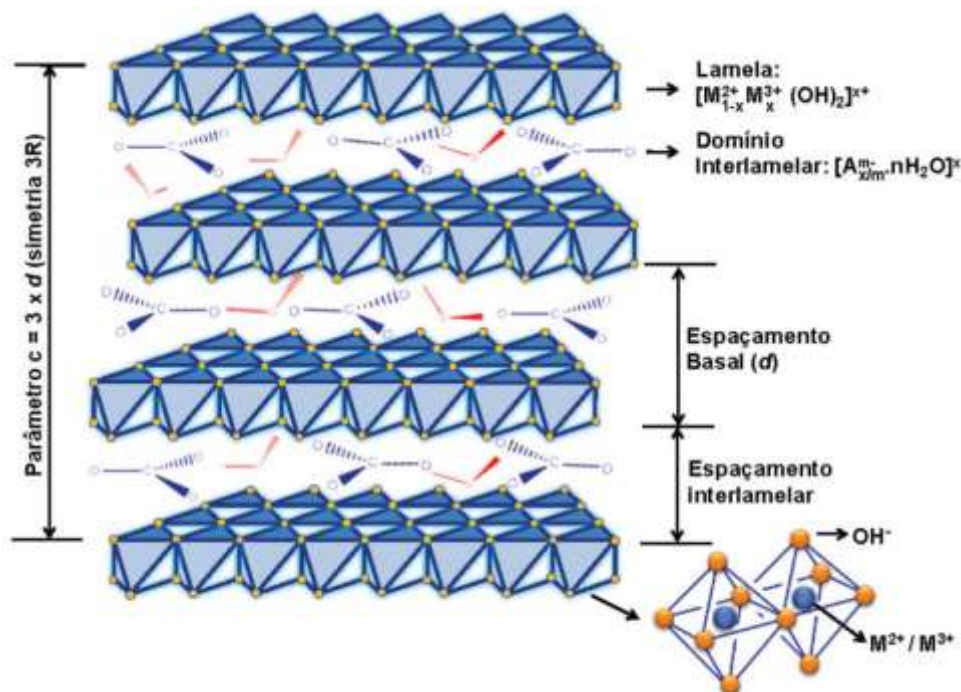


Figura 7: Estrutura esquemática da estrutura de um LDH onde A^{m-} corresponde ao íon intercalado e M^{2+} e M^{3+} a cátions metálicos. Figura extraída de Cunha, *et al.* (2010).

Como mostrado na Figura 7, a estrutura geral dos LDHs é formada por lamelas compostas por grupos hidroxila coordenados a cátions metálicos em uma geometria octaédrica. Esses octaedros compartilham suas arestas com octaedros adjacentes gerando assim uma camada bidimensional. Quando cátions metálicos bivalentes, M^{2+} , são substituídos isomorficamente por cátions metálicos trivalentes, M^{3+} , gera-se na lamela uma carga residual positiva que é neutralizada por espécies ânionicas que se acomodam na região interlamelar. Nesta região interlamelar é possível também encontrar espécies neutras, como moléculas de água (Cavani, *et al.*, 1991; Cunha, *et al.*, 2010; Forano, *et al.*, 2006).

A versatilidade dos LDHs em relação às suas propriedades físico-químicas derivam da possibilidade de sua formação utilizando diversas combinações de cátions bivalentes, como por exemplo Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , entre outros, enquanto que os cátions trivalentes podem ser Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Ga^{3+} , etc. Assim, atinge-se uma

fórmula geral para esses compostos igual a $[M^{2+}_{(1-x)}M^{3+}_x(OH)_2](A^{m-})_{x/m} \cdot zH_2O$ (Forano, *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que tal substituição isomórfica, representada pela razão M^{2+}/M^{3+} , altera a densidade de cargas residuais nas lamelas, modificando a capacidade de acomodação das espécies iônicas interlamelares. No contexto da formação de matrizes de LDH com alta capacidade de armazenamento dos ânions, os valores almejados são próximos de 2 (Goh, *et al.*, 2008; Mishra, *et al.*, 2018).

Em relação à composição iônica interlamelar, é possível encontrar na literatura uma grande variedade de intercalatos utilizados para diversas aplicações, entre eles pode-se encontrar espécies de haletos, íons inorgânicos simples, complexos de metais de transição, ânions orgânicos, polímeros aniônicos, aminoácidos, fármacos entre outros (Berber, *et al.*, 2010; Chakraborti, *et al.*, 2012; Charradi, *et al.*, 2010; Cunha, *et al.*, 2016; Gil, *et al.*, 2016; Goh, *et al.*, 2008; Guilherme, *et al.*, 2022; Minagawa, *et al.*, 2012; Rocha, *et al.*, 2016; Viseras, *et al.*, 2010).

Especialmente em aplicações farmacológicas, a capacidade dos LDHs em realizar trocas iônicas com o meio de liberação são de grande interesse visto que, neste processo, o fármaco é liberado gradualmente ao longo do tempo. A liberação modificada de fármacos é benéfica porque ajuda a manter níveis constantes do ativo no sangue, além disso, a liberação controlada pode reduzir os efeitos colaterais dos fármacos, pois evita picos de concentração elevados no organismo (Das e Pal, 2015).

Assim, destacam-se na literatura estudos que utilizam essas propriedades dos LDHs aliadas ao estudo da liberação e atividade de fármacos NSAIDs, como por exemplo o naproxeno, ácido acetilsalicílico, cetoprofeno, diclofenaco, sulindaco e ibuprofeno (Bonina, *et al.*, 2008; Constantino, *et al.*, 2023; Cunha, *et al.*, 2010; Delarco, *et al.*, 2009; Gil, *et al.*, 2016; Gordijo, *et al.*, 2005; Guilherme, *et al.*, 2022; Kong, *et al.*, 2010; Parello, *et al.*, 2010; Rocha, *et al.*, 2016; Tarushi, *et al.*, 2013).

Considerando a relevância do ponto de vista médico que esses sistemas têm como carregadores de fármacos, esta investigação se propõe a avaliar a capacidade desses intercalatos serem mais favoráveis levando em conta sua farmacocinética e uma maior biodisponibilidade.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. Objetivos

Como foi apresentado na Introdução, devido à possibilidade do uso de sistemas de liberação prolongada de fármacos no tratamento de processos inflamatórios e também o seu acompanhamento por via espectroscópica, este trabalho tem como objetivo geral investigar, através da espectroscopia Raman, a extensão dos processos inflamatórios em diferentes tecidos biológicos encontrados em cápsulas articulares, além da influência de compostos lamelares (LDHs) carregados com anti-inflamatórios nestes processos.

Dentre os objetivos específicos estão:

- 1) Avaliar a potencialidade da espectroscopia Raman em distinguir as fases da resposta inflamatória aguda em tecidos conjuntivos, cartilagosos e ósseos;
 - 2) Avaliar por microscopia Raman o efeito da inserção intra-articular de matrizes de LDH com fármaco intercalado no processo inflamatório dos tecidos biológicos;
 - 3) Avaliar por microscopia Raman aspectos relacionados à biocompatibilidade dos sistemas de liberação prolongada e suas características;
 - 4) Comparar as respostas obtidas por espectroscopia Raman com a técnica histológica na avaliação da resposta inflamatória aguda dos tecidos biológicos.
-

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Parte experimental

Os materiais e técnicas empregados nesta Tese bem como a metodologia utilizada estão apresentados a seguir.

3.1. Materiais

3.1.1. Proteínas

Proteínas são polipeptídeos muito suscetíveis a processos de degradação química e física, tanto em estado sólido quanto em solução. Dentre os processos de denaturação encontra-se a degradação térmica, que pode alterar estruturas terciárias e secundárias e até romper ligações de hidrogênio e ligações peptídicas, descaracterizando a proteína original (Lai e Topp, 1999; Wen, 2007). As espectroscopias Raman e de absorção no infravermelho são baseadas em espalhamento e absorção de fótons, respectivamente, o que facilmente pode alterar a energia térmica local, gerando assim a denaturação da proteína. Por esse motivo, foram adquiridas as proteínas listadas na Tabela 1, todas da Sigma-Aldrich, para serem utilizadas como referências espectrais para comparações entre espectros encontrados na literatura e identificação nos espectros obtidos durante essa pesquisa. Todas as proteínas foram caracterizadas sem tratamento prévio.

Tabela 1: Nome e pureza aproximada das proteínas utilizadas (Sigma-Aldrich).

Proteínas	Pureza aproximada
Fibrina de plasma humano	-
Fibrinogênio extraído de plasma de ratos	60 – 80 % de proteína
Fibronectina extraído de plasma de ratos	-
Osteopontina de ratos	> 95 %
Heparan (sulfato de sódio) de rim bovino	-
Agrecan de cartilagem bovina	-
Colágeno humano do tipo I (Bornstein e Traub (Bornstein e Traub, 1979; P Bornstein e Sage, 1980))	95 %
Colágeno de cartilagem nasal bovina do tipo II (Bornstein e Traub (Bornstein e Traub, 1979; P Bornstein e Sage, 1980))	> 95 %

Colágeno de placenta humana do tipo III (Bornstein e Traub (Bornstein e Traub, 1979; P Bornstein e Sage, 1980))	> 90 %
Colágeno de placenta humana do tipo IV (Bornstein e Traub (Bornstein e Traub, 1979; P Bornstein e Sage, 1980))	> 85 %
Trombospondina humana	98 %
SPARC/osteonectina humana	> 97 % de mistura proteica
Vitronectina extraída de plasma de ratos	conteúdo proteico de 10 %

3.1.2. Ibuprofeno

Ibuprofeno ou ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico foi adquirido diretamente da Sigma-Aldrich na sua forma de sal de sódio, ibuprofeno sódico, com fórmula molecular $C_{13}H_{17}O_2Na$ e foi utilizado nas sínteses, caracterizações dos produtos obtidos e curvas de calibração para ensaios de liberação modificada do fármaco. Para caracterização do fármaco, utilizou-se espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia Raman e difratometria de raios X.

3.1.3. Reagentes de sínteses e ensaios de liberação de fármacos

Para a síntese dos hidróxidos duplos lamelares e posterior ensaios de liberação do fármaco foram utilizados os reagentes de partida descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Reagentes utilizados nas sínteses e ensaios de liberação de fármaco.

Reagente	Fórmula	Pureza (%)	Procedência
Cloreto de Zinco	$ZnCl_2$	> 99	Sigma-Aldrich
Cloreto de alumínio hexahidratado	$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	> 99	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	> 99	Merck
Dihidrogeno fosfato de potássio	KH_2PO_4	> 99	Sigma-Aldrich
Monohidrogeno fosfato de potássio	K_2HPO_4	> 99	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio	NaCl	> 99	Sigma-Aldrich
Cloreto de potássio	KCl	> 99	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico 36,5 -38% (m/m)	HCl	-	Synth

Ácido Hialurônico	$(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$	> 95	Farmácia Ananda
-------------------	---------------------------	------	-----------------

3.1.4. Indutor de inflamação

O processo inflamatório na articulação dos animais foi induzido pelo uso do Adjuvante Completo de Freund (ACF) obtido da Sigma-Aldrich e o seu preparo antes das aplicações consiste apenas em uma resuspensão do conteúdo da ampola em vortex. Tal indutor é composto por uma suspensão água/óleo de *Mycobacterium tuberculosis*, morta por ação térmica e dessecada em óleo mineral (parafina) e emulsificante (monooleato de manitol) (Freund, 1947; Freund e McDermott, 1942). O ACF é comumente utilizado como indutor inflamatório devido à presença dos antígenos provenientes das membranas das bactérias mortas que induzem a resposta inflamatória forte e persistente no local da aplicação (Kaur, *et al.*, 2011; van Eden, *et al.*, 2001).

3.2. Síntese e caracterização dos hidróxidos duplos lamelares (LDHs) com e sem ibuprofeno

As sínteses das matrizes de LDH de zinco e alumínio com íons cloreto (LDH-Cl) e ibuprofeno (LDH-Ibup) intercalados no espaço interlamelar seguiram o método de coprecipitação, método já utilizado em trabalhos do grupo (Cunha, *et al.*, 2016; Eulálio, 2019; Gil, 2015; Gil, *et al.*, 2016; Rocha, 2015; Rocha, *et al.*, 2016), e foram realizadas no Laboratório de Sólidos Lamelares (LabSoL) sob coordenação da Profa. Dra. Vera R. L. Constantino do IQUSP.

Os materiais utilizados nas sínteses foram ibuprofeno sódico (Aldrich), cloreto de alumínio hexahidratado ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$, Aldrich), cloreto de zinco ($ZnCl_2$, Aldrich) e hidróxido de sódio (NaOH, Merck). Todos foram utilizados sem tratamento prévio.

A síntese da matriz de LDH com íons cloreto ($Zn^{2+}/Al^{3+}/Cl^-$, na razão molar $Zn^{2+}/Al = 2$), consistiu na mistura das soluções de $0,067 \text{ mol L}^{-1}$ para o cátion bivalente, proveniente de $ZnCl_2$, e $0,033 \text{ mol L}^{-1}$ para o cátion trivalente, proveniente de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, tornando assim a concentração total de cátions igual a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi feita por gotejamento lento, aproximadamente 1 mL min^{-1} , de 250 mL da solução contendo os cátions sobre 100 mL de água deionizada em constante agitação e pH ajustado e fixado para o valor de 7,5. Toda síntese foi executada sob atmosfera

inerte de nitrogênio e o pH foi mantido com adições controladas de solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹. Após o término da adição dos reagentes, a suspensão obtida foi mantida sob intensa agitação por 24 horas, em atmosfera de nitrogênio e temperatura ambiente. Depois de isolado por centrifugação e lavado cinco vezes com água deionizada, o sólido resultante foi seco à temperatura ambiente em dessecador sob pressão reduzida.

A síntese da matriz de LDH intercalada com ibuprofeno ($Zn^{2+}/Al^{3+}/Ibup^{-}$, também na razão molar $Zn^{2+}/Al^{3+} = 2$ e $Ibup/Al^{3+} = 1$) seguiu um procedimento similar ao citado acima, também descrito na literatura para fármacos monovalentes de carga negativa (Cunha, *et al.*, 2016; Gaskell, *et al.*, 2018; Gil, *et al.*, 2016; Rocha, 2015; Rocha, *et al.*, 2016). Ibuprofeno foi solubilizado em 250 mL solução de NaOH (pH = 7,5) de modo a formar uma solução 0,01 mol L⁻¹, que foi mantida sob agitação vigorosa, atmosfera de nitrogênio e temperatura ambiente, a fim de evitar a degradação térmica do fármaco, após a lenta adição (aproximadamente 1 mL min⁻¹) de 250 mL da solução contendo Zn²⁺ e Al³⁺, respectivamente. O sistema foi mantido por 24 horas sob agitação e atmosfera de N₂ após o término das adições. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e lavada por cinco vezes com H₂O deionizada e o sobrenadante descartado. O sólido resultante foi lavado com água deionizada e seco em dessecador sob pressão reduzida.

Após secagem, os materiais foram macerados e submetidos à caracterização estrutural e análise química. As quantidades de carbono e hidrogênio foram determinadas por análise elementar; Zn e Al foram quantificados por ICP OES e H₂O por análise termogravimétrica.

A partir desses dados foram propostas fórmulas mínimas para os compostos como segue: $[Zn_{2,1}Al(OH)_{6,1}]Cl \cdot 2,2H_2O$ e $[Zn_{1,9}Al(OH)_{5,7}](C_{13}H_{17}O_2)_{0,8}Cl_{0,2} \cdot 1,9H_2O$, com as formulas teóricas sendo $[Zn_2Al(OH)_6]Cl \cdot mH_2O$ e $[Zn_2Al(OH)_6](C_{13}H_{17}O_2)_1 \cdot nH_2O$, respectivamente, com m e n variáveis. Assim, para a matriz carregada com ibuprofeno, com capacidade de carregamento teórica de 44,1 g de ibuprofeno a cada 100 g LDH-Ibup, obteve-se um a valor experimental de aproximadamente 35,3 g de ibuprofeno para cada 100 g de LDH-Ibup.

Parte das matrizes sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman e difratometria de raios X e outra parte foi encaminhada para esterilização com posterior caracterização pelas mesmas técnicas e, por final, para os ensaios *in vivo*.

3.3. Esterilização dos materiais para implante

Antes do início do tratamento dos animais com LDH-Ibup, aproximadamente 2,0 g do sólido obtido da síntese foi submetido à esterilização por irradiação ionizante com dose de 25 kGy sob taxa de dose de 6 kGy h⁻¹ (Abuhanoğlu e Özer, 2014). A radiação ionizante utilizada é proveniente do Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CTR/IPEN/CNEN-SP, equipamento financiado pela FAPESP (projeto 1997/07136-0) e que se localiza em uma instalação pertencente à Categoria IV segundo a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Após o processo de esterilização, o material foi submetido às mesmas caracterizações já mencionadas acima para os compostos sintetizados e foi nomeado de LDH-Ibup irradiado.

3.4. Procedimentos cirúrgicos *in vivo*

3.4.1. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Wistar-EPM-1, adultas, com peso variando de 250 a 270 g, oriundas do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP-EPM e mantidas no Biotério do Departamento de Cirurgia, localizado no 11º andar do edifício Horácio Knesse de Mello - UNIFESP-EPM.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura ambiente pré-ajustada em 21±2 °C, em ambiente com dispositivo automático que proporciona alternância entre claro e escuro de doze horas (6:00/18:00 horas) e em condições adequadas de higiene. Os animais receberam água e dieta padrão para a espécie, *ad libitum* (Nuvital[®] - Quintia Brasil Feed, Colombo, PR) e permaneceram em aclimação por um período de 7 dias anteriores à data dos procedimentos. O protocolo experimental, descrito abaixo, foi submetido para a Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEUA-UNIFESP) e aprovado sob o número de protocolo **4074090117**. Os experimentos *in vivo* foram realizados somente após a aprovação do Comitê de Ética.

3.4.2. Grupos de estudo

Os experimentos foram realizados em triplicata nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias utilizando um total de 36 animais aleatoriamente distribuídos em:

Grupo Controle (Controle): animais que não foram submetidos a nenhum tratamento no joelho direito (3 animais em 4 períodos, $n_{\text{total}}=12$)

Grupo Joelho com Adjuvante de Freund (JF): animais submetidos a artrite induzida via administração intra-articular de 0,05 mL de ACF / 100 g de massa do animal no joelho direito (3 animais para cada período, $n_{\text{total}}=12$). Ainda neste grupo foi estudado apenas 1 animal em que foi testada a dose 0,1 mL/ 100 g massa do animal de ACF no outro joelho, para fins comparativos.

Grupo Joelho com Adjuvante de Freund e LDH-Ibuprofeno (JFI): animais submetidos a artrite induzida via administração intra-articular 0,05 mL de ACF / 100 g de massa do animal e tratados com LDH contendo Ibuprofeno (65 mg LDH-Ibup / 0,1 mL ACF) no joelho direito (3 animais para cada período, $n_{\text{total}}=12$).

3.4.3. Anestesia

A anestesia geral foi administrada nos animais com idade de 3 a 6 meses após a aferição de massa em balança digital. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma associação de Ketamina[®] e Xylazina[®] (4:1), na dose de 50 mg kg^{-1} para os 2 anestésicos.

3.4.4. Ato Operatório

Após anestesia, os animais foram imobilizados em prancha cirúrgica, em decúbito dorsal, com suas extremidades fixadas com fitas adesivas, seguido da antisepsia da região operatória com álcool a 70%.

3.4.4.1. Joelho

Após a colocação de campos estéreis, foi escolhida e identificada uma das articulações de joelho à palpação e por meio de punção com agulha (30G) foi injetada a solução com componente designado para cada grupo. Para a indução da artrite foi utilizado o Adjuvante Completo de Freund, ACF, administrado via intra-articular

seguindo o protocolo descrito na literatura (0,1 mL/100 g de massa do animal) em apenas 1 animal (Kaur, *et al.*, 2011; van Eden, *et al.*, 2001), porém, foi constatada a necessidade de diminuição da dose para 0,05 mL/100 g, visto que o processo inflamatório causado pela administração da dose inicial foi muito intenso e descaracterizou as amostras estudadas.

3.4.4.2 Controle da dor após cirurgia

A inoculação de Adjuvante Completo de Freund produz dor em função do processo inflamatório que induz. Para controle da dor, foi administrada uma dose de dipirona sódica (25 mg kg^{-1}) antes da inoculação do Adjuvante de Freund e durante os períodos do experimento após a inoculação do Adjuvante de Freund e LDHs. Os animais receberam visitas diárias, duas vezes ao dia, e foram estimulados à deambulação. Mediante a presença de sinais de sofrimento/dor articular (tendência a manter-se imobilizado, claudicação e postura antálgica) doses adicionais de 25 mg kg^{-1} de dipirona via subcutânea foram administradas. Posteriormente aos atos cirúrgicos, o mesmo analgésico foi ministrado nas gaiolas no bebedouro ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) durante 7 dias.

3.4.4.3 Coleta das amostras biológicas

Os animais foram submetidos à anestesia geral nos períodos pós-operatórios de 7, 14, 21 e 28 dias 3 animais por período de cada grupo. Nos animais os componentes da articulação foram removidos e separados (membrana sinovial, menisco, ligamentos e osso). O material foi dividido em duas porções equivalentes, sendo uma delas analisada por espectroscopia Raman e a outra encaminhada para análise histomorfológica conduzida no Laboratório de Histofisiologia Evolutiva coordenado pelo Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva no ICB-USP.

3.4.4.4 Sacrifício e descarte

O sacrifício dos animais foi realizado após a coleta do material biológico, por aprofundamento da anestesia de Ketamina/Xylazina com dose de 150 mg.kg^{-1} (três vezes a dose anestésica) para os dois analgésicos, via intraperitoneal.

Todo o material biológico não utilizado foi descartado dentro de sacos plásticos próprios para resíduos biológicos, e colocados em lixeiras próprias do Edifício de Pesquisa II nos dias de descarte. O edifício de Pesquisa II possui protocolo de descarte de material biológico embalado em sacos brancos (resíduo biológico) e mantido congelado até o momento de descarte.

3.5. Análises histológicas

As análises histológicas foram conduzidas no Laboratório de Histofisiologia Evolutiva coordenado pelo Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva no ICB-USP.

3.5.1. Coração por hematoxilina e eosina (H&E) e *Picrosirius Red* (Picro)

Após a remoção da articulação completa do joelho dos animais, as peças foram conservadas por imersão em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4. Após a fixação, as amostras foram submetidas a duas lavagens por imersão no mesmo tampão por um período de 10 minutos. As amostras foram então submetidas a imersão em solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 10% por aproximadamente 90 dias para descalcificação do tecido ósseo. Seguiu-se desidratação, em série crescente de etanol, nas concentrações 50% a 100%, durante 10 minutos a cada passagem. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas por aproximadamente 12 horas (*overnight*) em solução de etanol absoluto e historresina (Technovit 7100[®]) em partes iguais (1:1). Em seguida, as amostras foram imersas em historesina pura por um período de 4 horas, e posteriormente incluídas com polimerizador em moldes plásticos apropriados.

Os cortes foram equidistantes e com 3 µm de espessura; foram obtidos com auxílio de micrótomo American Optical model 820[®] e submetidos à coração pela técnica de hematoxilina e eosina (Michalany, 1990) e *Picrosirius Red* (Tolosa, et al., 2003). A observação e registro das imagens foram realizados sob microscópio de luz Carl-Zeiss Axio Scope.A1[®] e *software* de captura de imagem Zen[®].

3.6. Ensaios de liberação do Ibuprofeno *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* do ibuprofeno intercalado na matriz de LDH foram realizados utilizando o material sintetizado, LDH-Ibup, na sua forma em pó. A fim de simular o processo de liberação que ocorre na cápsula articular foi proposto o método de ensaio de liberação no modo estático, que será descrito abaixo, e em meio de dissolução que simula a composição do líquido sinovial da cápsula articular, *Simulated Synovial Fluid* (SSF).

As medidas de concentração de ibuprofeno liberado foram obtidas por espectroscopia de absorção no UV-Vis no seu comprimento de onda de máxima absorção em 272 nm, utilizando uma curva analítica de calibração do ibuprofeno sódico dissolvido no meio de dissolução, SSF, na faixa de 0 a 25 mg L⁻¹, tanto os espectros quanto a curva de calibração encontram-se no item 4.1.4. Todas as medidas foram feitas em triplicata e utilizando cubetas de quartzo de 0,5 cm.

A preparação do meio de dissolução SSF seguiu o método descrito na literatura (Marques, 2011), o pH foi mantido em 7,4 e sua composição é mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Reagentes e quantidades utilizadas para preparo do meio de dissolução SSF.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Cloreto de sódio	8,0
Cloreto de potássio	0,2
Fosfato de sódio dibásico	1,44
Fosfato de potássio monobásico	0,24
Ácido hialurônico	3,0

O ensaio de liberação no modo estático de ibuprofeno a partir da matriz de LDH foi conduzido em microtubos do tipo eppendorf de 2 mL à temperatura de 37 °C utilizando 65,0 mg de LDH-Ibup em pó, equivalente a 30 mg de ibuprofeno. Os microtubos foram preenchidos com 2 mL de meio de dissolução SSF e acomodados em suporte de isopor que garantiram sua flutuação nas cubas do dissolutor mantendo seu

corpo imerso no banho de água deionizada que as preenchia. O esquema representativo da montagem é mostrado na Figura 8.

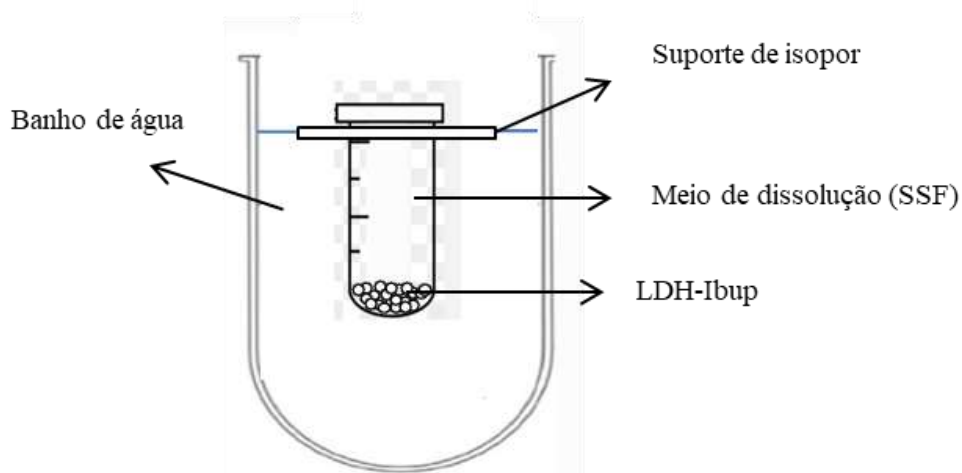


Figura 8: Esquema da montagem feita para os ensaios de liberação no modo estático.

3.7. Instrumentação

3.7.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em equipamento Bruker FTIR, modelo Alpha com ótica de KBr, detector DTGS e com o acessório de ATR (Platinum) de única reflexão com cristal de diamante. A resolução espectral foi de 4 cm^{-1} e os espectros, a não ser quando mencionado no texto, foram registrados com 512 coadições espectrais.

3.7.2. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman das matrizes sintetizadas e das proteínas de referência foram obtidos nos equipamentos Bruker FT-Raman modelos MultiRaman e RFS 100/S, ambos dotados de detector de Ge, resfriado com N_2 líquido, laser de estado sólido de $\text{Nd}^{3+}/\text{YAG}$ para excitação em 1064 nm; os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm^{-1} . No caso das análises das amostras biológicas é necessária a discriminação espacial das diferentes composições dos tecidos articulares e, portanto, utilizou-se o microscópio Renishaw inVia Reflex, equipado com câmera CCD (Renishaw, 600x400 pixels) refrigerado termoeletricamente e acoplado a um microscópio Leica modelo DM2500M;

a linha laser em 785 nm, laser de diodo da marca Renishaw, foi focalizada na amostra por uma objetiva Leica x50 (abertura numérica de 0,75). Após o procedimento de limpeza, as amostras foram dispostas em lâminas de vidro recobertas com papel alumínio, com o objetivo de eliminar a possibilidade de interferência de sinais Raman provenientes do vidro. A potência do laser sempre foi mantida abaixo de 1 mW na amostra a fim de evitar qualquer possível degradação por aquecimento local.

3.7.3. Difractometria de raios X

Os difratogramas das matrizes sintetizadas foram obtidos pelo método do pó e as amostras foram tratadas previamente por maceração e distribuídas diretamente em um porta-amostras de vidro. Para obtenção dos difratogramas foi utilizado um difratômetro Rigaku modelo Miniflex, operando com tensão de 30 kV e corrente de 15 mA; a radiação $K\alpha$ da fonte de cobre com filtro de Ni, com comprimento de onda definido em 1,541 Å foi utilizada na obtenção dos difratogramas. Todos os difratogramas foram registrados no intervalo de valores de 2θ de 1,5 a 70 °, com varreduras feitas em passos de 0,03 ° s⁻¹.

3.7.4. Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-Vis (220 a 400 nm) das amostras provenientes dos ensaios de cinética de liberação de fármaco (soluções) foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-3101PC, com porta-amostras de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm e resolução espectral de 0,5 nm.

3.7.5. Análise elementar

Para as matrizes inorgânicas, análises químicas dos elementos carbono e hidrogênio foram realizadas em duplicata em um equipamento Perkin Elmer modelo 2400. Para determinação de Zn e Al, as amostras foram digeridas em ácido nítrico a 80 °C e as análises foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) em um espectrômetro Spectro Arcos e também foram realizadas em duplicata. As linhas de emissão utilizadas para quantificação de

cada elemento foram: Al: 396 nm , 152 nm e Zn: 213 nm, 856 nm. As análises foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CA-IQUSP).

3.7.6. Análise térmica

Curvas TG-DSC e TG-MS foram obtidas em uma termobalança com espectrômetro de massas acoplado (TGA-MS) em um termoanalisador Netzsch modelo TGA/DSC 490 PC Luxx acoplado com espectrômetro de massas Aëolos 403C, utilizando uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob ar sintético (50 mL min^{-1}). As análises foram feitas no Laboratório de Sólidos Lamelares coordenado pela Profa. Dra. Vera Constantino.

3.8. Processamento dos espectros

A análise e processamento dos espectros Raman, FTIR e difratogramas de raios X, obtidos experimentalmente e por modelagem molecular, foi feita utilizando os programas GRAMS/AI versão 9.1 (Thermo Scientific) e Origin 2020, versão 9.7.0.185 (OriginLab Co.). Os espectros Raman obtidos dos experimentos com tecidos biológicos foram previamente analisados utilizando o pacote estatístico Unscrambler X, versão 10.1 (Camo). A metodologia utilizada foi uma seleção de 10 espectros de cada período de pós-operatório, sem tratamento prévio, para realizar os tratamentos de alisamento seguido de uma correção de linha base igual para todos os espectros e uma normalização por *De-Trending*.

3.9. Simulações vibracionais

As simulações vibracionais das diferentes configurações que a molécula de ibuprofeno pode se estruturar foram feitas utilizando o programa Gaussian09 (Frisch, *et al.*, 2009). Nos cálculos foi empregado o método DFT (*Density Functional Theory*) com o funcional híbrido Becke 3-parameter Lee–Yang–Parr (B3LYP) com base atômica 6-31+g(d,p) (Vueba, *et al.*, 2008).

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. Resultados e discussões

Este capítulo está dividido em dois blocos de resultados e suas respectivas discussões. No primeiro serão apresentados resultados da caracterização do sal de ibuprofeno de sódio usado nas sínteses e das matrizes de LDH após síntese, após esterilização e seus parâmetros cinéticos de liberação modificada pelo método estático. No segundo bloco, serão mostrados os resultados obtidos a partir dos experimentos *in vivo* de tais matrizes de LDH no sistema articular de joelho de ratos Wistar e incluem a análise por microscopia Raman e histológica dos tecidos biológicos controle da cápsula articular, tecidos com inflamação induzida e tecidos inflamados sob tratamento das matrizes de LDH contendo ibuprofeno.

4.1. Caracterizações do ibuprofeno e matrizes de hidróxidos duplos lamelares (LDHs)

4.1.1. Caracterização do ibuprofeno sódico

É comum que fármacos NSAIDs apresentem centros quirais, gerando assim enantiômeros que podem ou não ter ação e/ou afinidade biológica (Lee, *et al.*, 1985), além disso, quando em estado sólido, podem também apresentar polimorfismo, fator este que pode alterar a solubilidade e biodisponibilidade de tais fármacos no organismo que deve metabolizá-los, como é o caso do ibuprofeno (Andrioli, *et al.*, 2014).

O ibuprofeno é comercializado como mistura racêmica e o enantiômero S-(+)-ibuprofeno, Figura 9, possui maior afinidade por proteínas plasmáticas e, consequentemente com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória pela via de inibição das COX 1 e 2. No organismo humano a presença da enzima isomerase 2-arilpropionil-CoA epimerase é capaz de converter cerca de 50 a 60% do enantiômero R-(-)-ibuprofeno em seu equivalente mais ativo (Evans, 2001; Lee, *et al.*, 1985), o que permite concluir que para a finalidade de aplicação deste trabalho, o fato de usar uma mistura racêmica obtida comercialmente como reagente de partida não seria um problema nos estudos *in vivo*.

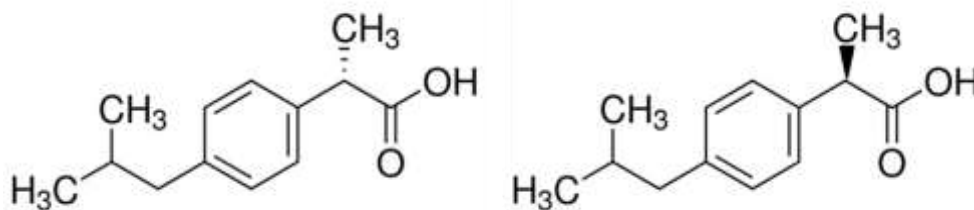


Figura 9: Estrutura química dos enantiômeros de ibuprofeno. A esquerda é apresentado o S-(+)-ibuprofeno e a direita o R-(-)-ibuprofeno.

Já a possibilidade de formação de polimorfos poderia ser um fator que viesse a dificultar os procedimentos de caracterização e síntese das matrizes de LDH, já que o rendimento da intercalação do fármaco entre as lamelas do LDH não é de 100% durante o procedimento de síntese. Dessa forma, caso fossem formados sólidos polimorfos ao final da síntese que se agregassem externamente à matriz de LDH, a aplicação das matrizes como objeto de estudo para liberação modificada do ibuprofeno e a própria absorção do NSAID pelos organismos estudados poderia ser alterada levando a uma dose reduzida de absorção do fármaco. Para confirmação da não formação destes polimorfos foram utilizadas as técnicas de espectroscopia vibracional (FTIR e Raman) e XRD, que serão mostradas à frente na discussão da caracterização das matrizes de LDH.

Outra questão que foi levada em consideração na escolha do ibuprofeno sódico (Na-Ibup) ao invés do ibuprofeno (Ibup) na sua forma protonada como reagente precursor para sínteses do LDH intercalado foi a maior facilidade de solubilização do sal em água, visto que as sínteses foram conduzidas em pH 7,5 e temperatura de 25 °C (item 3.2). Em tais condições o ibuprofeno possui pKa igual a 5,3 e solubilidade de 0,432 g L⁻¹ (Herzfeldt e Kümmel, 1983; Janus, *et al.*, 2020), assim não se faz necessária uma etapa prévia de neutralização do grupo ácido do ibuprofeno.

Os espectros Raman e ATR-FTIR de Na-Ibup comercial são mostrados nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

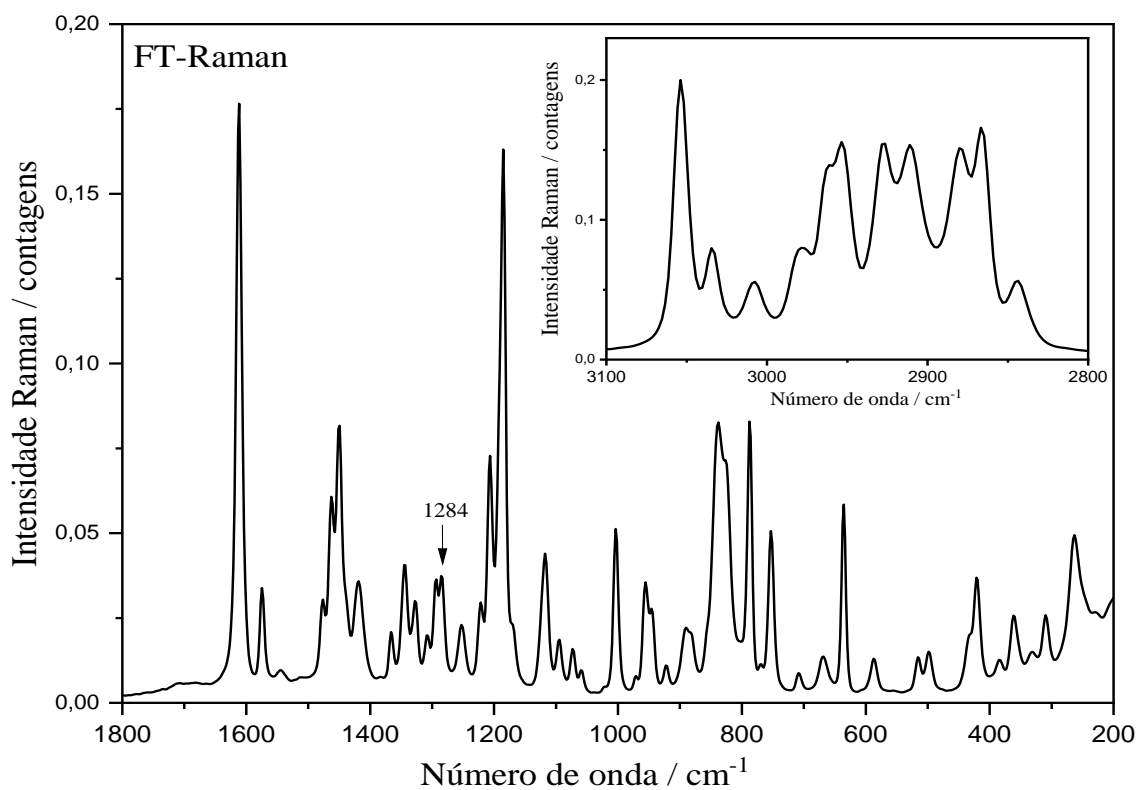


Figura 10: Espectro FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) do sal de sódio de ibuprofeno; em destaque é mostrada a região de altos números de onda.

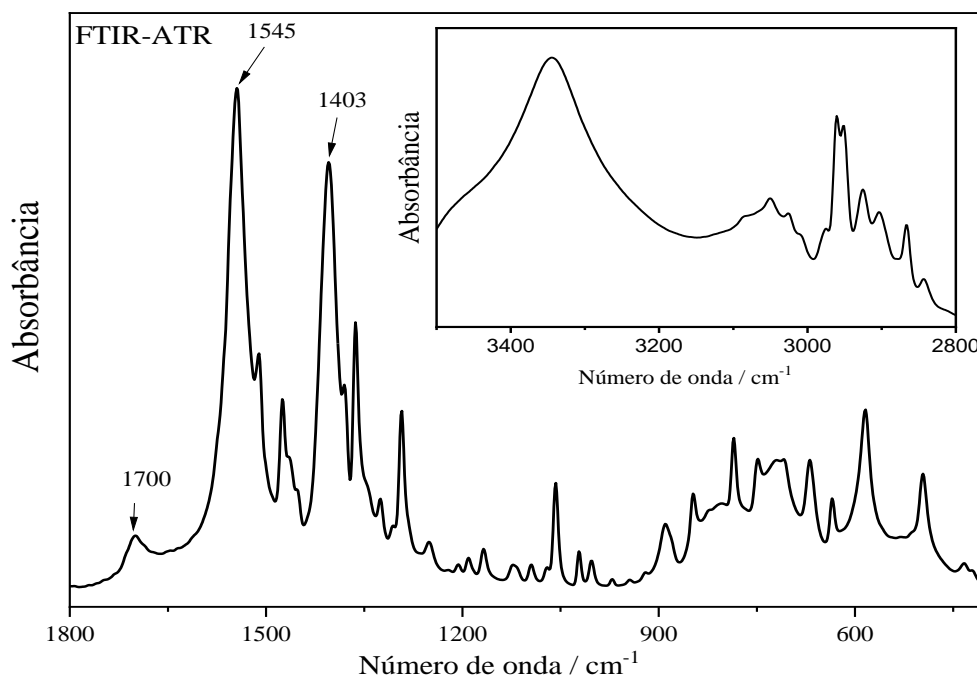


Figura 11: Espectro ATR-FTIR do sal de sódio de ibuprofeno (Na-Ibup); em destaque é mostrada a região de altos números de onda.

No espectro Raman mostrado na Figura 10, é possível verificar a existência da banda de baixa intensidade localizada em 1284 cm^{-1} atribuída, na literatura, à deformação angular $\delta(\text{C-O-H})$ (Liu e Gao, 2012; Vueba, *et al.*, 2008). A presença desta vibração molecular sugere fortemente que uma fração das moléculas do fármaco encontra-se na forma protonada. Tal evidência se confirma na análise do espectro de absorção no infravermelho, Figura 11, onde é possível constatar a presença de uma banda intensa e larga localizada em 3350 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu(\text{O-H})$, além da banda de baixa intensidade e larga localizada em 1700 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu(\text{C=O})$ da carboxila.

Devido ao alto valor da variação do momento de dipolo com a variação da coordenada de deslocamento (Q) $\left(\frac{\delta\mu}{\delta Q}\right)$ encontrado na ligação C=O, mesmo com uma pequena parcela de moléculas que a presente, é esperado no espectro FTIR uma banda muito intensa, fato que não é observado quando se compara a intensidade da banda em 1700 cm^{-1} com outras localizadas em 1545 e 1403 cm^{-1} , que são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{COO}^-)$ antissimétrico e simétrico, respectivamente (Gaskell, *et al.*, 2018; Silva, *et al.*, 2013; Sousa, *et al.*, 2017), confirmando assim uma maior predominância de moléculas desprotonadas, como era esperado para o sal de ibuprofeno.

Teoricamente uma molécula não linear apresenta $3N-6$ modos vibracionais, sendo N o número de átomos ligados covalentemente na molécula em questão (Hollas, 2008; Sala, 2008), portanto, para a molécula do ânion ibuprofenato que apresenta fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2$, temos 32 átomos, gerando assim 90 modos vibracionais fundamentais para uma molécula isolada. Como, experimentalmente, não foram analisadas moléculas isoladas, no espectro podem ser ainda observados sobretons e bandas de combinação (apenas no IR), bem como modos de rede dependentes da forma de cristalização.

A atribuição das bandas nos espectros foi feita com auxílio de cálculo teórico usando a teoria do funcional de densidade (DFT, Density Functional Theory) através do funcional B3LYP e com base atômica 6-31+g(d,p) (Vueba, *et al.*, 2008). Durante o processo de otimização da geometria da molécula, notou-se que a molécula se estabiliza na configuração S, que é biologicamente ativa, como mostrado na Figura 12. Tal estabilidade de estrutura se mostra de acordo com os estudos que utilizaram diferentes funcionais e bases atômicas maiores e mais complexas gerando a mesma conformação

estrutural atingida por nós, porém utilizando a molécula de ibuprofeno (Liu e Gao, 2012).

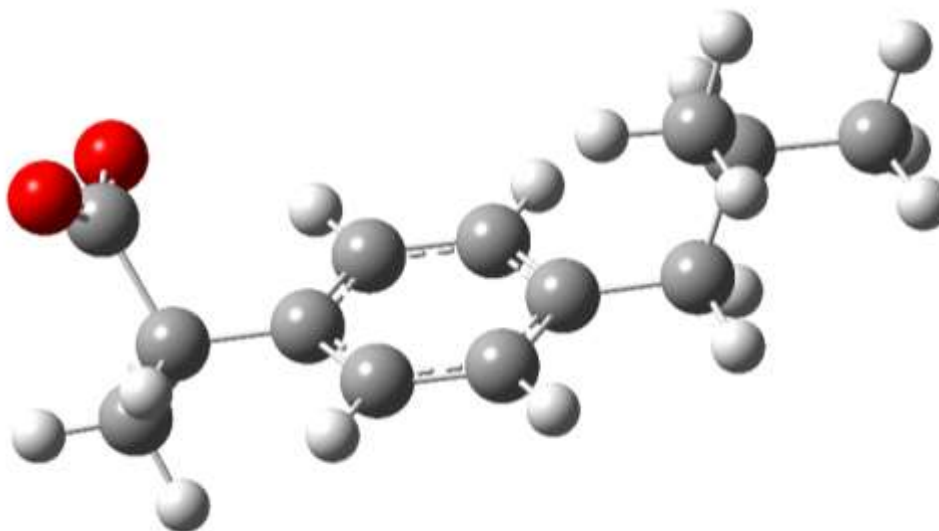


Figura 12: Estrutura otimizada (forma S) para o íon ibuprofenato utilizando o funcional B3LYP e base atômica 6-31+g(d,p).

Os espectros vibracionais teóricos Raman e de absorção no infravermelho são mostrados na Figura 13 e a partir deles foi feita a atribuição tentativa das principais bandas encontradas, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Atribuição tentativa para as bandas nos espectros Raman e de absorção no infravermelho baseada nas frequências vibracionais calculadas e corrigidas para a molécula de Na-Ibup (fator de correção = 0,9679) (Wong, 1996).

ν / cm^{-1}				Atribuição tentativa
$\nu_{\text{calculado}}$	$\nu_{\text{corrigido}}$	Raman _{exp}	IR _{exp}	
-	-	3220	ca. 3350	$\nu(\text{O-H})$
3203	3100	3107	3087	$\nu(\text{C-H})_{\text{arom}}$
3170	3068	3054	3050	$\nu(\text{C-H})_{\text{arom}}$
3143	3042	3034	3026	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant arom}}$
3115	3015	3008	3008	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant metila}}$
3084	2985	2978	2975	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant metila}^*}$
3069	2970	2953	2960	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant}}$

3055	2956	2927	2951	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant}}$
3040	2942	2911	2925	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant}}$
3021	2924	2879	2903	$\nu(\text{C-H})_{\text{sim}}$
3013	2916	2866	2866	$\nu(\text{C-H})_{\text{sim}}$
3005	2908	2844	2843	$\nu(\text{C-H})_{\text{sim}}$
-	-	1710	1700	$\nu(\text{C=O})$
1682	1628	1610	-	$\nu(\text{C=C})_{\text{arom}} + \delta(\text{C=C-H})_{\text{arom}}$
1651	1598	1574	1575	$\nu(\text{COO}^-)_{\text{ant}}$
1605	1556	1545	1544	$\nu(\text{C=C})_{\text{arom}}$
1539	1492	-	1510	$\delta(\text{C=C-H})_{\text{arom}}$
1514	1468	1476	1475	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}^*}$
1505	1459	1462	1464	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}^*}$
1500	1454	1450	1452	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant}}$
1450	1406	1419	-	$\nu(\text{C=C})_{\text{ant arom}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{sim}}$
1335	1294	-	1404	$\nu(\text{COO}^-)_{\text{sim}} + \nu(\text{C=C})_{\text{arom}} + \nu(\text{C-CO}_2^-) +$ $\delta(\text{C-H})_{\text{sim metila}^*}$
1420	1376	-	1380	$\delta(\text{C=C-H})_{\text{arom}} + \nu(\text{C=C})_{\text{arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{alif}} +$ $\delta(\text{C-H})_{\text{metila}^*}$
1401	1358	1366	1363	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}^*} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{sim}}$
1393	1350	1344	1345	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim metila}}$
1377	1335	1324	1326	$\delta(\text{C-H}) + \delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}}$
1345	1304	1307	1308	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}} + \delta(\text{C-H})$
1312	1272	1294	1293	$\delta(\text{C-H}_2)_{\text{sim}} + \delta(\text{C-H})$
-	-	1285	-	$\delta(\text{C-O-H})$
1308	1268	1252	1251	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}} + \delta(\text{C-H}) + \delta(\text{C-H}_2)$
1251	1213	1221	-	$\delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant}} + \delta(\text{C-H}) + \delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}}$
1244	1206	1207	1206	$\delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}}$
1224	1186	1185	1191	$\delta(\text{C-H}_2)_{\text{sim}} + \delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}}$
1212	1175	1169	1168	$\delta(\text{C-H})_{\text{arom}} + \delta(\text{C-H})$
1141	1106	1118	1120	$\delta(\text{C-H})_{\text{arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}}$
1131	1096	1095	1095	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant}} + \delta(\text{C-H})_{\text{arom}}$ ant
1100	1066	1073	1070	$\delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}}$

1079	1046	1060	1058	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant arom}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant}}$
1069	1036	1020	1022	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant metila}} + \delta(\text{C-H})$
1034	1002	1003	1003	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim arom no plano}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
991	960	970	970	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \delta(\text{C-H})$
978	948	955	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{arom fora do plano}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
965	935	946	943	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
954	925	921	920	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \delta(\text{C-H})_{\text{arom fora do plano}}$
932	903	890	889	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metilas}} + \delta(\text{C-H})$
863	836	838	847	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim arom fora do plano}}$
845	816	820	823	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant arom fora do plano}}$
828	802	787	785	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant arom fora do plano}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metilas}}$
801	776	752	748	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim arom fora do plano}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metilas}}$
742	719	707	707	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant arom fora do plano}} + \delta(\text{COO}^-)$

v = estiramento, δ = deformação angular, ant. = antissimétrico, sim. = simétrico, arom. = anel aromático, alif. = alifático.

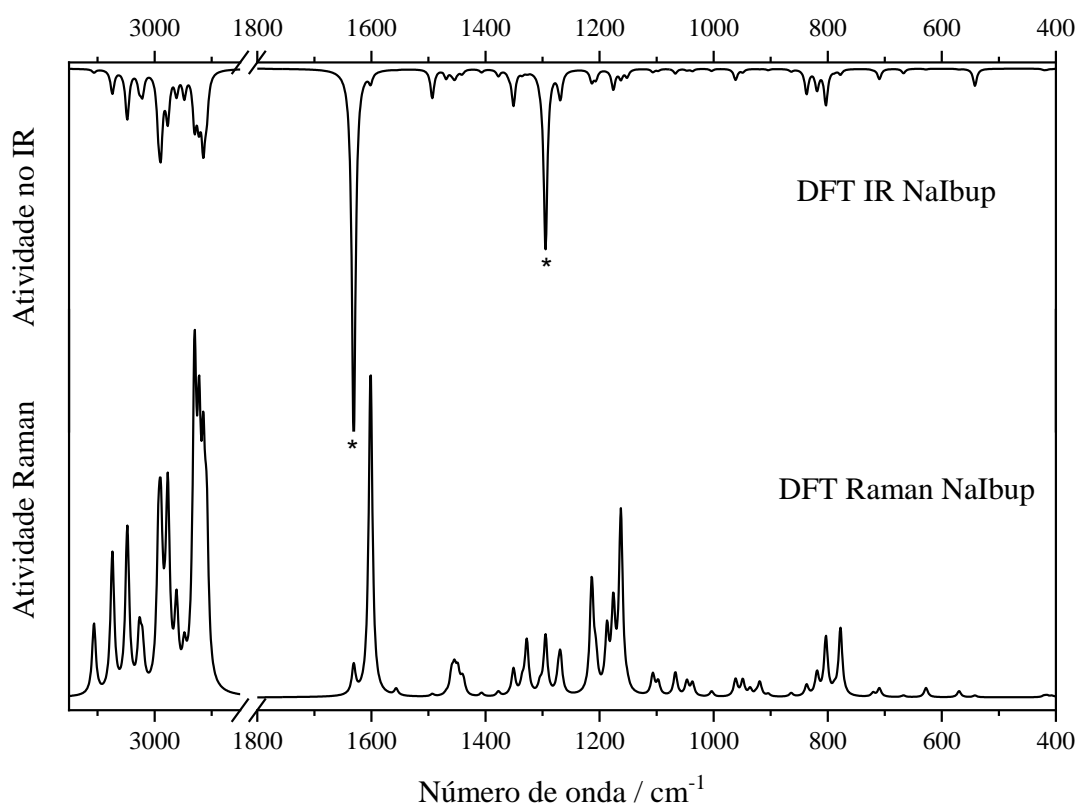


Figura 13: Espectros vibracionais teóricos corrigidos do íon ibuprofenato calculados por DFT. Acima encontra-se a simulação do espectro no infravermelho e, abaixo, a simulação do espectro Raman, ambos já corrigidos com fator de correção = 0,9679. O

símbolo * evidencia as bandas atribuídas aos estiramentos simétrico e antissimétrico do grupo carboxilato.

Os espectros teóricos obtidos mostraram uma grande concordância na atribuição das principais bandas com os espectros obtidos experimentalmente e também com os valores de bandas encontrados na literatura, tanto teóricos quanto experimentais (Gaskell, *et al.*, 2018; Jubert, *et al.*, 2006; Liu e Gao, 2012; Omar e Abu Ali, 2017; Silva, *et al.*, 2013; Sousa, *et al.*, 2017; Vueba, *et al.*, 2008). Dentre as principais bandas, a única que se mostrou com um valor muito abaixo do esperado foi a banda encontrada em 1294 cm^{-1} nos espectros teóricos, que deveria ser encontrada próximo de 1400 cm^{-1} como no espectro experimental FTIR e que é atribuída ao estiramento simétrico do grupo carboxilato. Ainda sobre a banda deste estiramento simétrico, nota-se no FTIR que sua intensidade experimental é mais intensa do que esperado, fator que pode ser explicado pela banda ser uma composição de vários modos de simetria que envolvem estiramentos entre carbonos presentes no anel aromático, carbonos adjacentes ao grupo carboxilato e a deformação angular dos hidrogênios do grupo metila, mostrando um alto acoplamento mecânico entre tais modos, o que influencia diretamente a intensidade observada experimentalmente. Além disso, os espectros teóricos obtidos refletem a molécula no seu estado gasoso sem considerar interações intermoleculares e o átomo de sódio como contra-íon, fator que pode ter influenciado sua posição nos espectros Raman e FTIR.

As posições de tais bandas e a dependência das interações com contra-íons apresentada pelas vibrações do grupo carboxilato pode ser mostrada pela diferença entre os valores da posição das bandas de estiramento C-O antissimétrico e simétrico ($\Delta\nu(\text{COO}^-) = \nu_{\text{ant}} - \nu_{\text{sim}}$) deste grupo em função da carga e do modo de interação com o contra-íon metálico que pode ser por coordenação do tipo quelato, ponte, monodentado ou iônico (Nakamoto, 2009), como mostra a Figura 14.

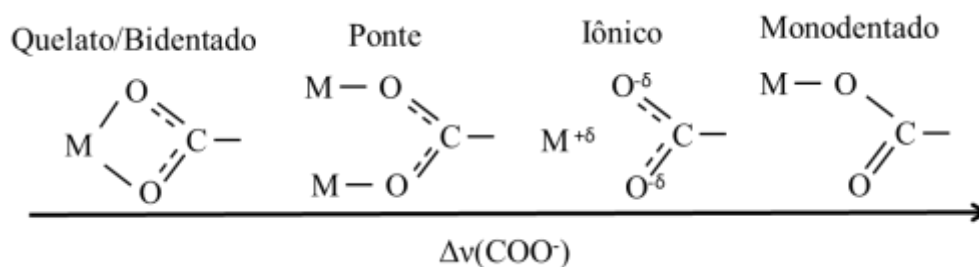


Figura 14: Esquema dos modos de interação do grupo carboxilato com um íon metálico.

Analisando os valores encontrados experimentalmente nos espectros FTIR para as bandas de estiramento C-O do grupo carboxilato atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico, 1545 e 1403 cm^{-1} respectivamente, chega-se a um valor de $\Delta\nu$ igual a 140 cm^{-1} , valor próximo ao reportado na literatura para o sal de sódio de ibuprofeno (150 cm^{-1}), no qual há uma interação puramente iônica (Omar e Abu Ali, 2017). Tal informação será importante para discussão sobre a intercalação do ânion ibuprofenato na matriz de LDH.

4.1.2. Caracterização das matrizes de Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs)

A matriz de LDH almejada e sintetizada foi a matriz composta por cátions de zinco e alumínio uma vez que, como também mostrado na Introdução, é a composição que melhor mostrou resultados frente à indução da formação de colágenos do tipo III em experimentos *in vivo* já realizados pelo grupo (Cunha, *et al.*, 2016; Gil, 2015; Jr. da Costa Fernandes, *et al.*, 2019), tal indução é desejada neste modelo de estudo por conta das melhores características mecânicas que essas fibras de colágeno apresentam, como por exemplo, uma maior elasticidade, fator desejado durante o reparo do tecido sinovial encontrado nas articulações estudadas.

Além disso, outra característica desejada da matriz de LDH sintetizada foi a razão molar entre os cátions de zinco e alumínio de 2:1 ($\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$), visto que tal razão molar otimiza a capacidade de carregamento de espécies iônicas interlamelares, consequentemente, disponibilizando uma maior quantidade de íons intercalados (Li, *et al.*, 2004; Nabipour e Sadr, 2015; Rodrigues, *et al.*, 2013), já que a matriz foi utilizada neste estudo como carreador para liberação modificada do ibuprofeno por troca iônica nos organismos animais.

Portanto, como descrito na seção de Parte Experimental, foram sintetizadas no Laboratório de Sólidos Lamelares, coordenado pela Prof.^a Vera R. L. Constantino do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, duas matrizes de LDH de zinco e alumínio, uma com íons cloreto no interstício lamelar (LDH-Cl) e outra com íons ibuprofenato (LDH-Ibup).

Após as sínteses, os materiais foram submetidos à caracterização estrutural e química. Como já descrito, as quantidades de C e H foram determinadas por análise elementar, a fim de quantificar o ibuprofeno disponível. Zn e Al foram quantificados por ICP OES e H₂O por análise térmica.

A quantificação de zinco apresentou resultados médios de 28,05 % e 26,75% em massa para o LDH-Cl e LDH-Ibup, respectivamente. Enquanto que para o alumínio os resultados médios foram de 5,65 % e 5,93 % em massa para o LDH-Cl e LDH-Ibup, respectivamente.

Para o LDH-Ibup, a análise elementar de C e H apresentaram valores médios de 27,95 % em massa de carbono e 4,76% em massa de hidrogênio.

As análises térmicas são mostradas na Figura 15 e 16 para o LDH-Cl e LDH-Ibup, respectivamente. Para o LDH-Cl é possível notar 3 eventos térmicos, sendo o primeiro ($T_{\text{onset}} = 105^{\circ}\text{C}$) com pico endotérmico na curva DSC em 140°C atribuído ao processo de desidratação do material com perda de massa de 11,4% devido à saída de moléculas de H₂O adsorvidas nas regiões externa e interlamelar do material, evidenciado também pelo espectro de massas com perda de fragmentos de $m/z = 18$ (H₂O) na mesma faixa de temperatura. O segundo evento térmico ($T_{\text{onset}} = 215^{\circ}\text{C}$), também um processo endotérmico com pico DTG em 255°C é atribuído ao processo de desidroxilação do material lamelar, confirmado pela perda de fragmentos de $m/z = 18$ (H₂O). Ainda neste segundo evento é possível observar uma pequena liberação de fragmentos $m/z = 44$ referentes à molécula de CO₂, provenientes dos íons bicarbonato que acabam sendo gerados no processo de síntese devido à incorporação de CO₂ no meio reacional, ou, possivelmente à adsorção de CO₂ no material seco após o procedimento de lavagem. Por fim, o terceiro evento com pico DTG em 560°C e $T_{\text{onset}} = 470^{\circ}\text{C}$, também endotérmico, atribuído à reorganização estrutural do material, possivelmente com a formação de ZnO e o espinélio ZnAl₂O₄ (Carvalho, *et al.*, 2013), que geram um resíduo de 63% em massa.

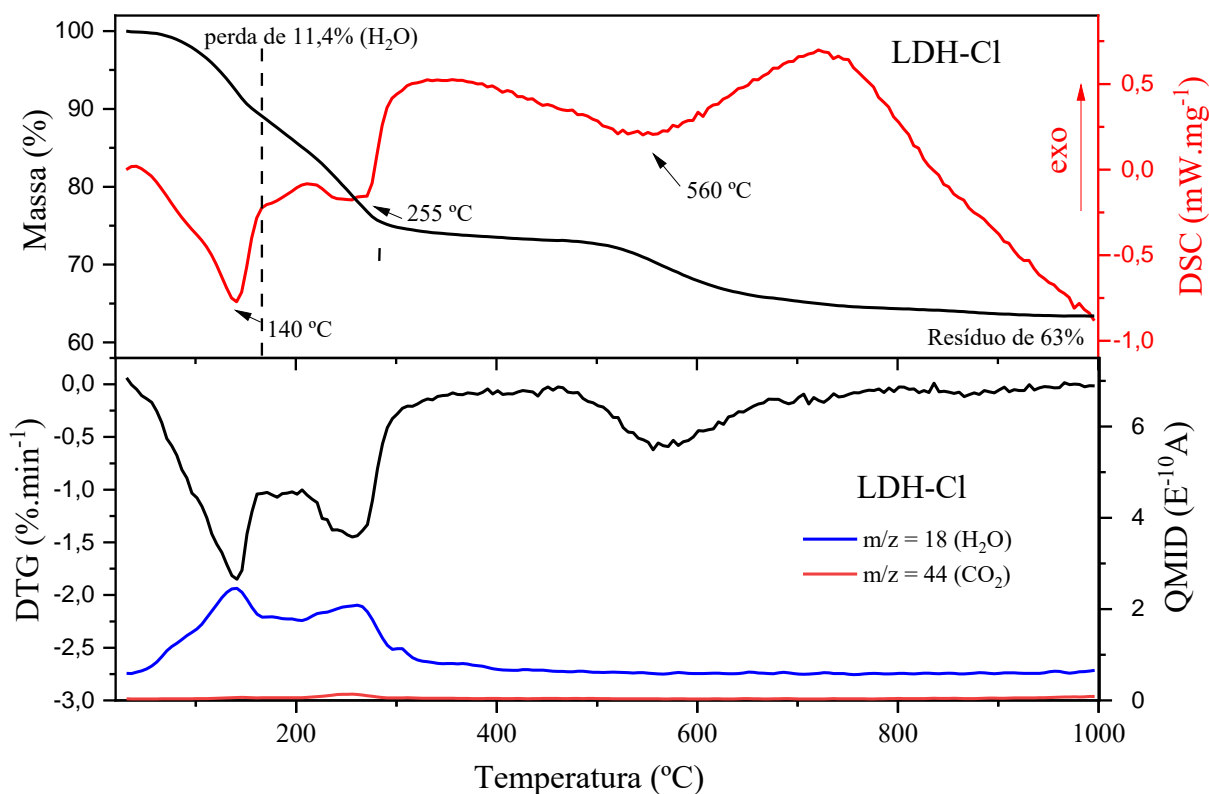


Figura 15: Curvas TG-DSC e DTG-MS obtidas para o LDH-Cl.

Na análise térmica do LDH-Ibup, Figura 16, são observados 6 eventos, sendo o primeiro evento endotérmico com $T_{\text{onset}} = 55 \text{ °C}$ e pico DTG em 106 °C atribuído à desidratação do material, com perda de 7,7% de massa, corroborado pela perda de fragmentos $m/z = 18$ (H_2O). Já os dois eventos seguintes com picos DTG em 156 e 180 °C , endotérmicos, são atribuídos à desidroxilação do material, também evidenciados pela perda de fragmentos $m/z = 18$ (H_2O). Os eventos finais, com picos DTG em 394 e 466 °C , com $T_{\text{onset}} = 300$ e 407 °C , respectivamente, são atribuídos à decomposição do ibuprofeno intercalado, evidenciado pela liberação de fragmentos $m/z = 44$ e 18 . O sexto evento térmico, evidenciado essencialmente pelo pico endotérmico na curva DSC em 779 °C , é referente à reorganização estrutural do resíduo de 44% em massa, atribuído à possível formação dos compostos ZnO e ZnAl_2O_4 (Carvalho, *et al.*, 2013).

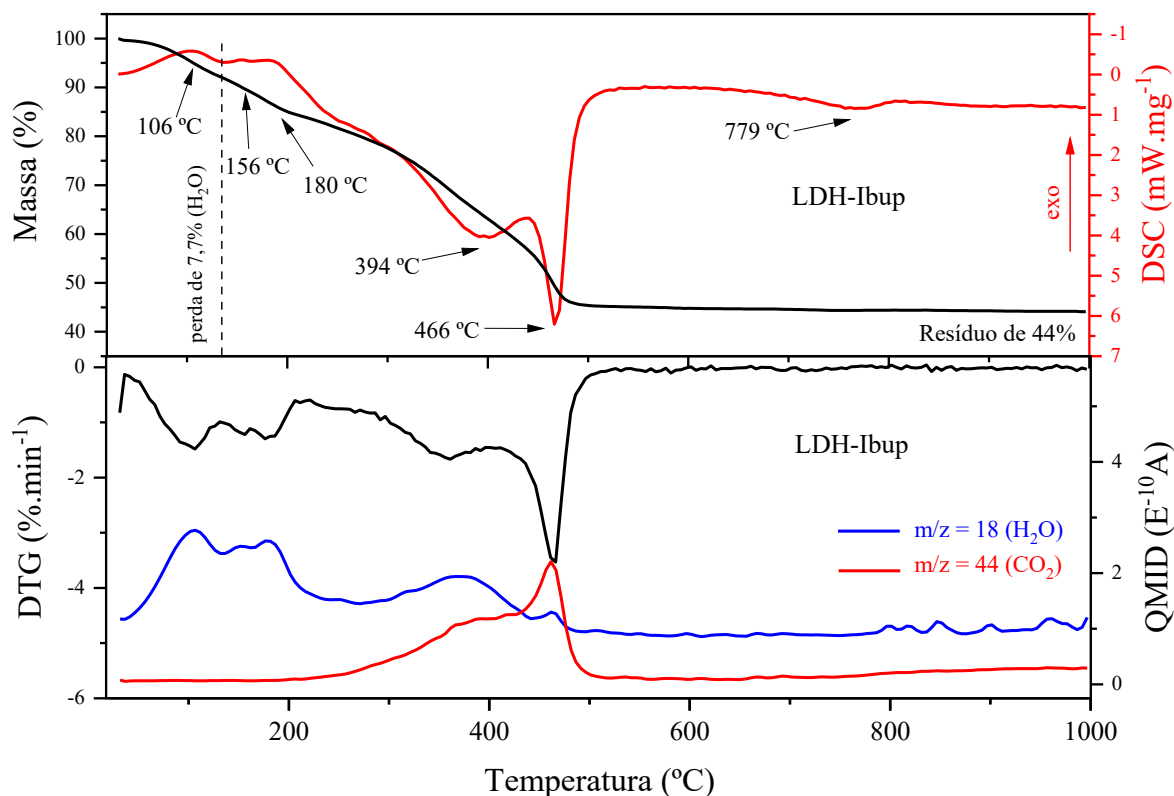


Figura 16: Curvas TG-DSC e DTG-MS obtidas para o LDH-Ibup.

Assim, com a união dos dados de análise elementar e térmica e por meio de cálculos estequiométricos, foram propostas fórmulas mínimas para os compostos como segue: $[\text{Zn}_{2,06}\text{Al}(\text{OH})_{6,12}]\text{Cl}\cdot 2,15\text{H}_2\text{O}$ para o LDH com apenas íons cloreto intercalados (LDH-Cl) e $[\text{Zn}_{1,9}\text{Al}(\text{OH})_{5,7}](\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_{0,8}\text{Cl}_{0,2}\cdot 1,9\text{H}_2\text{O}$ para o LDH com ibuprofeno intercalado, LDH-Ibup.

As amostras sintetizadas de LDH-Cl e LDH-Ibup foram encaminhadas para análise de difratometria de raios X e seus respectivos difratogramas são mostrados na Figura 17.

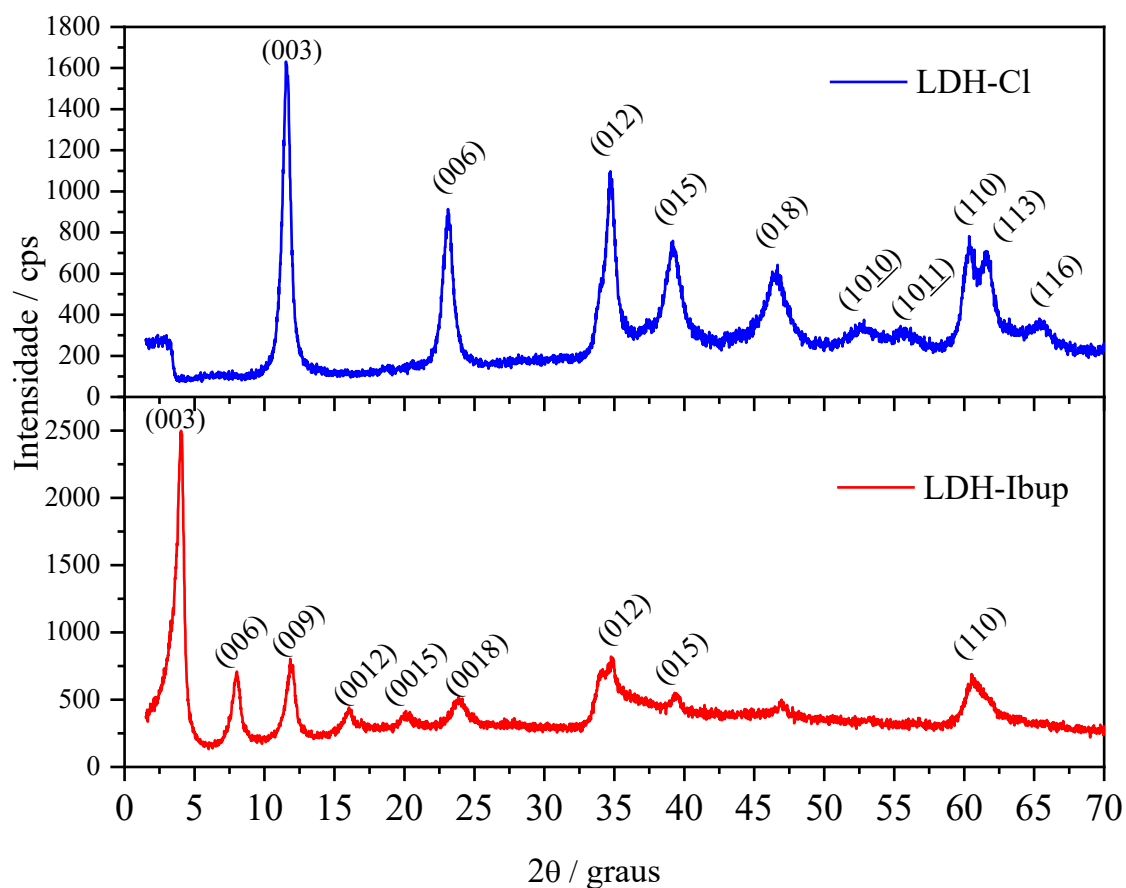


Figura 17: Difratomogramas de raios X das matrizes de LDH-Cl e LDH-Ibup.

A partir dos difratogramas apresentados na Figura 17 foram obtidos os valores de ângulo de reflexão 2θ (graus) e, assim, atribuídos valores de distâncias interplanares $d(hkl)$, mostrados na Tabela 5.

Os difratogramas apresentam picos característicos de materiais lamelares do tipo hidróxidos duplos lamelares, sendo os picos encontrados abaixo de 30° (2θ) atribuídos aos planos basais (00ℓ) referentes ao empilhamento ao longo do eixo cristalográfico c . Já os picos com valores acima de 30° (2θ) são referentes à estrutura interna das lamelas ($hk0$) e aos politipos estruturais hexagonais ou romboédricos ($0k\ell$) (Forano, *et al.*, 2006; Cunha, *et al.*, 2010).

A partir dos dados obtidos por XRD das duas matrizes e utilizando a equação de Bragg ($n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\theta$) foi possível determinar a distância interlamelar basal (d_{003}) com valores de 7,67 e 21,87 Å para o LDH-Cl e LDH-Ibup, respectivamente. Para o LDH-Cl, o valor de 7,67 Å é compatível com matrizes de LDH formados de Zn^{2+}/Al^{3+} intercalados com íons cloreto (Forano, *et al.*, 2006) e para o LDH-Ibup o valor de 21,87

Á também é compatível, uma vez que são propostas estruturas de intercalação para LDHs com fármacos de tamanho similar ao ibuprofeno nas quais as moléculas orgânicas encontram-se interagindo anguladas entre 0 a 45° em relação a um eixo perpendicular à lamela e formando um arranjo de bicamada, como proposto na Figura 18.

Tabela 5: Valores de ângulo de reflexão 2θ (graus) e distâncias interplanares $d(hk\ell)$ para as matrizes de LDH-Cl e LDH-Ibup.

(hkℓ)	LDH-Cl		LDH-Ibup	
	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)
(003)	11,54	7,67	4,04	21,87
(006)	23,12	3,85	8,02	11,02
(009)	-	-	11,84	7,47
(0012)	-	-	16,04	5,52
(0015)	-	-	20,1	4,42
(0018)	-	-	23,88	3,73
(012)	34,68	2,59	34,76	2,58
(015)	39,08	2,30	39,3	2,29
(018)	46,28	1,96	-	-
(1010)	52,60	1,74	-	-
(1011)	55,68	1,65	-	-
(110)	60,36	1,53	60,52	1,52
(113)	61,56	1,50	-	-
(116)	65,46	1,42	-	-
c (Å)	23,01		65,61	
a (Å)	3,06		3,04	

Com os dados mostrados na Tabela 5, calcularam-se também os parâmetros cristalográficos a e c , que se referem à distância entre centros metálicos da lamela ($2 \times d_{(110)}$) e ao triplo do espaçamento basal ($3 \times d_{(003)}$), respectivamente. Os parâmetros a calculados mostram-se de acordo com dados de hidróxidos duplos lamelares de zinco e alumínio encontrados na literatura e os parâmetros c estão de acordo com estruturas do

tipo hidrotalcita e grupo espacial do tipo R-3m (Choy, *et al.*, 2004; Crepaldi e Valim, 1998; del Arco, *et al.*, 2004; Eulálio, 2019; Forano, *et al.*, 2006; Seftel, *et al.*, 2008).

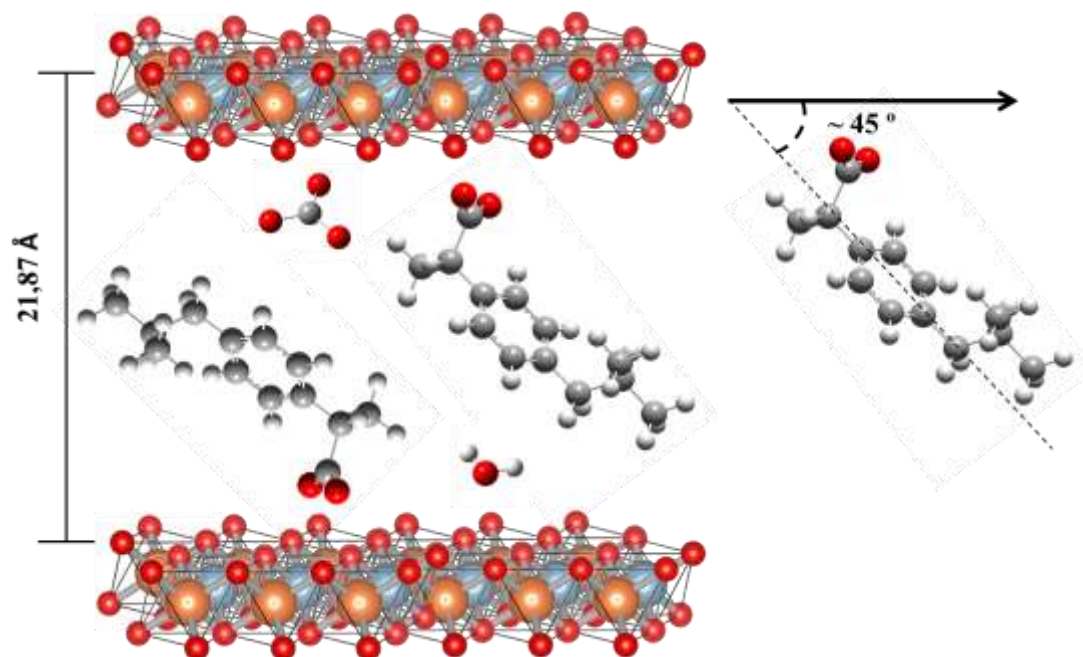


Figura 18: Estrutura de intercalação do ibuprofeno proposta para a matriz LDH-Ibup.

As matrizes de LDH foram submetidas à caracterização vibracional por FTIR e FT-Raman e seus resultados são apresentados a seguir.

A Figura 19 apresenta os espectros FTIR e FT-Raman para a matriz de LDH-Cl.

Como mostrado na Figura 18, o espectro Raman apresenta bandas características de LDHs de zinco e alumínio localizadas em 548 e 487 cm^{-1} , atribuídas a estiramentos Zn-O-Al e Al-O-Al, respectivamente, encontrados na estrutura das lamelas a matriz, e estão de acordo com dados já reportados na literatura (Burrueco, *et al.*, 2013; Palmer, *et al.*, 2008). A região abaixo de 400 cm^{-1} , no espectro Raman, apresenta bandas localizadas em 373, 263, 200 e 147 cm^{-1} que são atribuídas a modos de deformação angular de ligações do tipo M-OH e a banda em 148 cm^{-1} a um conjunto de deformações angulares O-M-O, sendo M zinco ou alumínio (Burrueco, *et al.*, 2013; Mora, *et al.*, 2014; Palmer, *et al.*, 2009). Nota-se também uma banda localizada em 1060 cm^{-1} atribuída ao estiramento simétrico de íons carbonato ν_1 (CO_3)²⁻. Tais íons podem ser provenientes da adsorção de $\text{CO}_{2(g)}$ no material seco após lavagem, ou ate mesmo da dissolução de $\text{CO}_{2(g)}$ na solução da síntese do material, já que a formação do hidróxido duplo lamelar é conduzida em pH levemente alcalino (7,5).

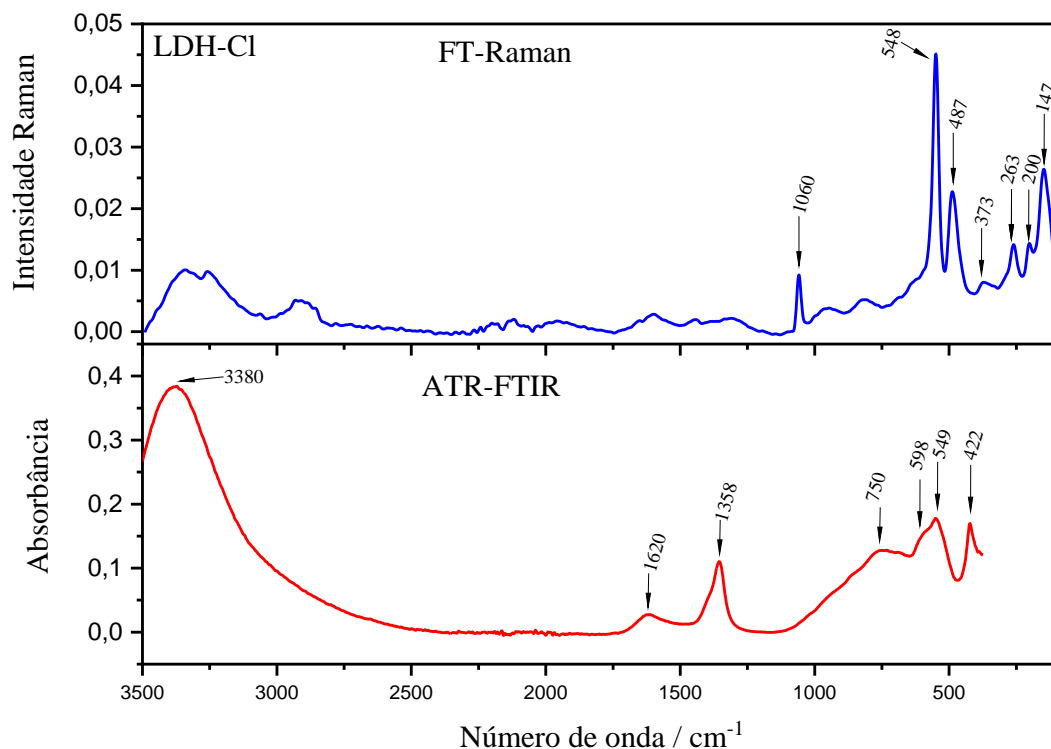


Figura 19: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$) e FTIR da matriz de LDH-Cl.

No espectro FTIR da matriz de LDH-Cl, mostrado na Figura 18, nota-se que a região espectral abaixo de 1100 cm^{-1} é composta por um conjunto de bandas sobrepostas e atribuídas à combinação de modos translacionais e deformações angulares da matriz. Para uma atribuição mais precisa, foi feito o processo de deconvolução espectral das principais regiões do espectro de absorção no infravermelho, sendo a primeira entre 1100 e 400 cm^{-1} e a outra entre 1800 e 1200 cm^{-1} .

As Figuras 20 e 21 mostram os espectros FTIR-ATR da matriz de LDH-Cl juntamente com as bandas ajustadas e o traço resultante da deconvolução espectral.

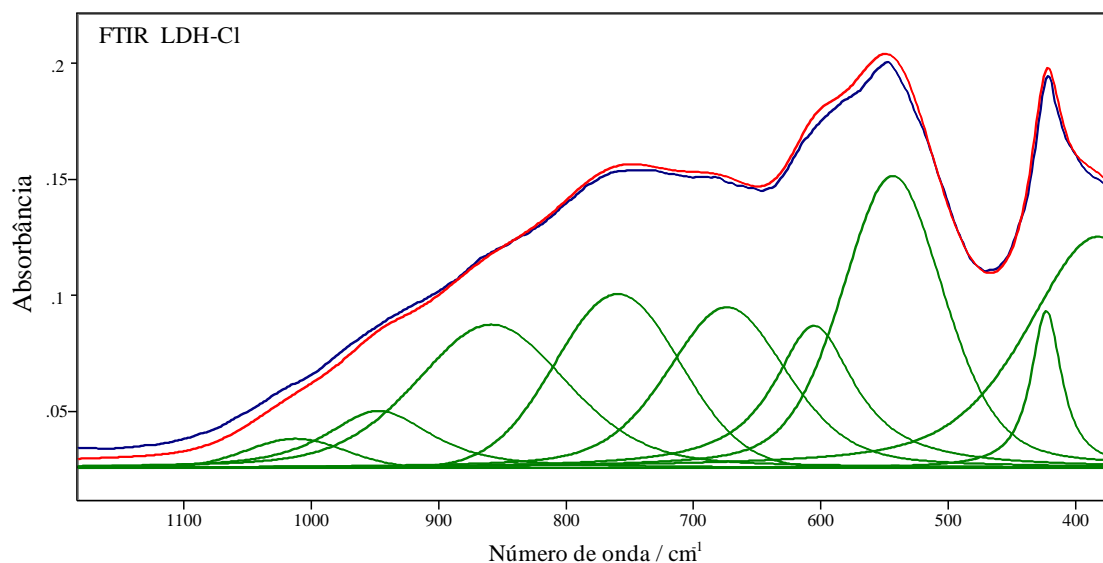


Figura 20: Espectro FTIR-ATR do LDH-Cl junto com sua deconvolução espectral da região de 1100 a 400 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em azul, vermelho e verde, respectivamente.

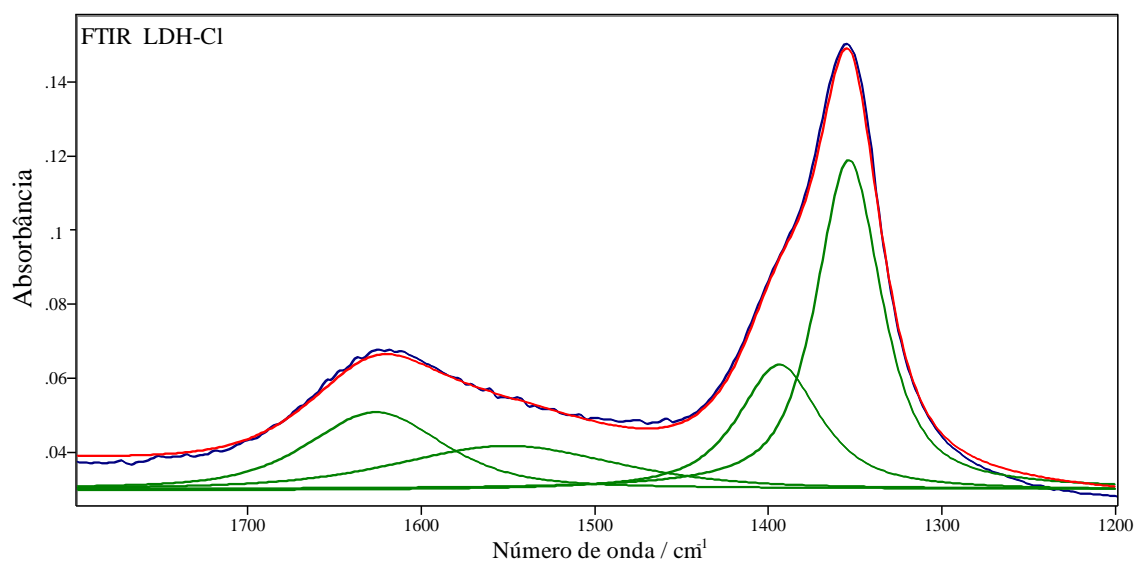


Figura 21: Espectro FTIR-ATR do LDH-Cl junto com sua deconvolução espectral da região de 1800 a 1200 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em azul, vermelho e verde, respectivamente.

A partir da análise das posições das bandas ajustadas e comparando-as a propostas de atribuições encontradas na literatura (Frost, *et al.*, 2014; Klopogge, *et al.*,

2004; Kloprogge, *et al.*, 2005), foi possível identificar as bandas características de deformações angulares, $\delta(\text{Zn-OH})$, modos translacionais, $\delta(\text{Zn-O-H})_{\text{transl.}}$ e $\delta(\text{Al-OH})_{\text{transl.}}$, e estiramento, $\nu(\text{Zn-O-Al})$. Além disso, foi possível também a identificação de bandas que são atribuídas a estiramentos do íon carbonato em sua simetria do tipo D_{3h} (estiramentos ν_2, ν_3 e ν_4) e bandas atribuídas às deformações angulares de moléculas de água, $\delta(\text{H}_2\text{O})$, e estiramentos de grupos hidroxila, $\nu(\text{O-H})$, presentes na composição estrutural da matriz. As posições e atribuições tentativas são mostradas na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6: Atribuições tentativas das bandas no infravermelho encontradas nos espectros da matriz de LDH-Cl.

LDH-Cl (cm^{-1})	Atribuição tentativa das bandas do FTIR
421	$\delta(\text{Zn-O-H})_{\text{transl.}}$
544	$\nu(\text{Zn-O-Al})$
606	$\delta(\text{Al-OH})_{\text{transl.}}$
667	$\nu_{4a}(\text{CO}_3^{2-})$
758	$\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$
858	$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$
947	$\delta(\text{Al-OH})_{\text{transl.}}$
1011	$\delta(\text{Zn-OH})$
1355	$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$
1394	$\nu_{3a}(\text{CO}_3^{2-})$
1551	$\delta(\text{H}_2\text{O})$
1626	$\delta(\text{H-O-H})$
3380	$\nu(\text{O-H})$

ν = estiramento, δ = deformação angular, transl. = translação, a= interação com a matriz; Atribuições baseadas em Frost, *et al.* (2014), Kloprogge, *et al.* (2004) e Kloprogge, *et al.* (2005).

É interessante notar que foram encontradas bandas localizadas em 1355 e 758 cm^{-1} que são atribuídas aos estiramentos $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ e $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$, e próximo a elas as bandas em 1394 e 667 cm^{-1} que também podem ser atribuídas ao mesmos estiramentos citados acima para o íon carbonato, porém, nesse caso deve-se considerar a interação dos íons com a lamela da matriz.

Há na literatura uma extensa discussão sobre a posição e atribuição dessas bandas, uma vez que a interação do íon carbonato, com simetria inicial pertencente ao grupo D_{3h} , pode interagir com a lamela da matriz diminuindo sua simetria para grupos do tipo D_3 , C_{2v} e C_s (Gil, 2015; Mora, *et al.*, 2014; Nakamoto, 1963; Sala, 2008). Tal diminuição de simetria, acarreta em desdobramentos dos estiramentos ν_3 (CO_3^{2-}) e ν_4 (CO_3^{2-}) com tipicamente $\Delta\nu$ de 30 a 40 cm^{-1} para as bandas geradas dos dois modos. O que se observa experimentalmente neste caso é um $\Delta\nu = 40$ e 90 cm^{-1} para o ν_3 (CO_3^{2-}) e ν_4 (CO_3^{2-}), respectivamente, valores muito elevados para atribuição de desdobramentos causados por diminuição de simetria. Desta forma, com a avaliação das bandas atribuídas ao íon carbonato nos espectros FTIR e o não aparecimento de outras bandas no FT-Raman, além da banda ν_1 (CO_3^{2-}) em 1060 cm^{-1} , propõem-se que a interação do íon com a lamela seja de caráter eletrostático com o íon carbonato, mantendo sua simetria D_{3h} , interagindo com seu plano paralelo ao plano lamelar.

A matriz de LDH-Ibup também foi submetida à caracterização vibracional e seus espectros FTIR e FT-Raman são mostrados na Figura 22.

O espectro FT-Raman mostrado na Figura 22 apresenta um perfil espectral semelhante ao espectro FT-Raman do ibuprofeno sódico mostrado na Figura 9, sendo possível identificar as bandas mais intensas em 1613, 1576, 1451, 1186 e 838 cm^{-1} que seguem as mesmas atribuições já realizadas e mostradas na Tabela 4. Nota-se também que as bandas referentes às vibrações da matriz inorgânica não são observadas, uma vez que o espectro é dominado pela espécie intercalada; tal fato é comumente encontrado em espectros de materiais híbridos em que o intercalato apresenta seção de choque maior que a da matriz (de Faria, *et al.*, 1998).

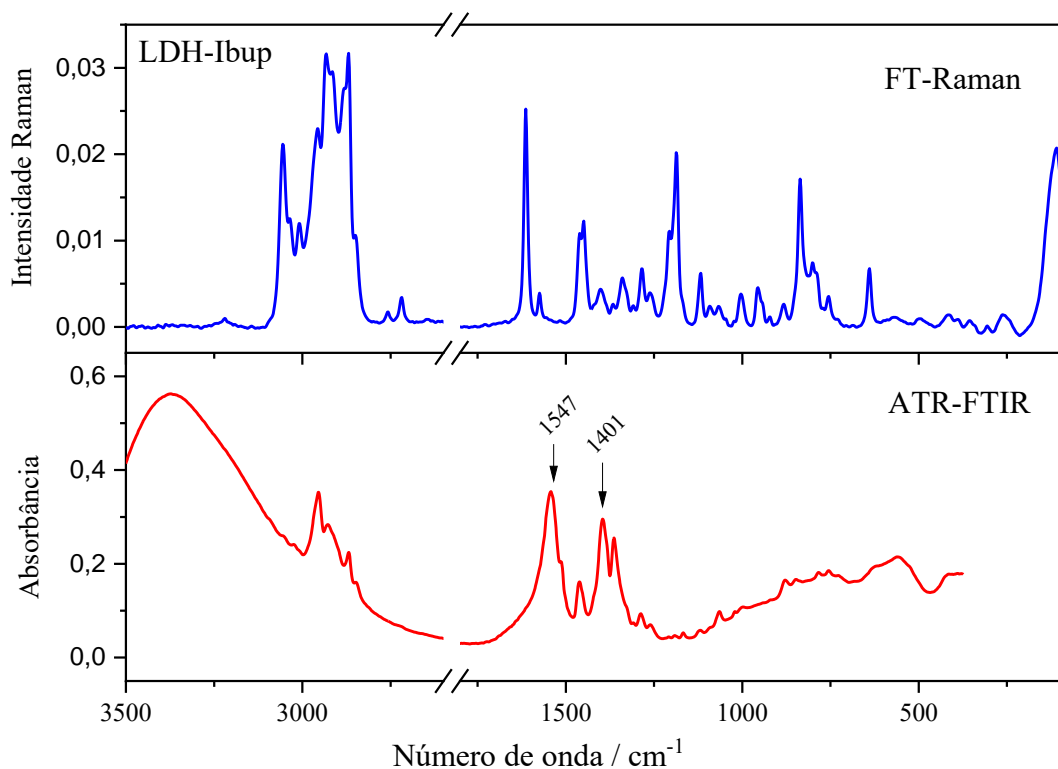


Figura 22: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$) e FTIR da matriz de LDH-Ibup.

A Figura 22 também apresenta o espectro FTIR da matriz de LDH-Ibup e nele é possível identificar as duas bandas mais intensas localizadas em 1547 e 1401 cm^{-1} , tais bandas são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{COO}^-)$ antissimétrico e simétrico, respectivamente, das moléculas de ibuprofeno desprotonadas, confirmando sua intercalação por interação eletrostática na região interlamelar da matriz.

As matrizes de LDH-Cl e LDH-Ibup também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e as imagens obtidas são mostradas na Figura 23.

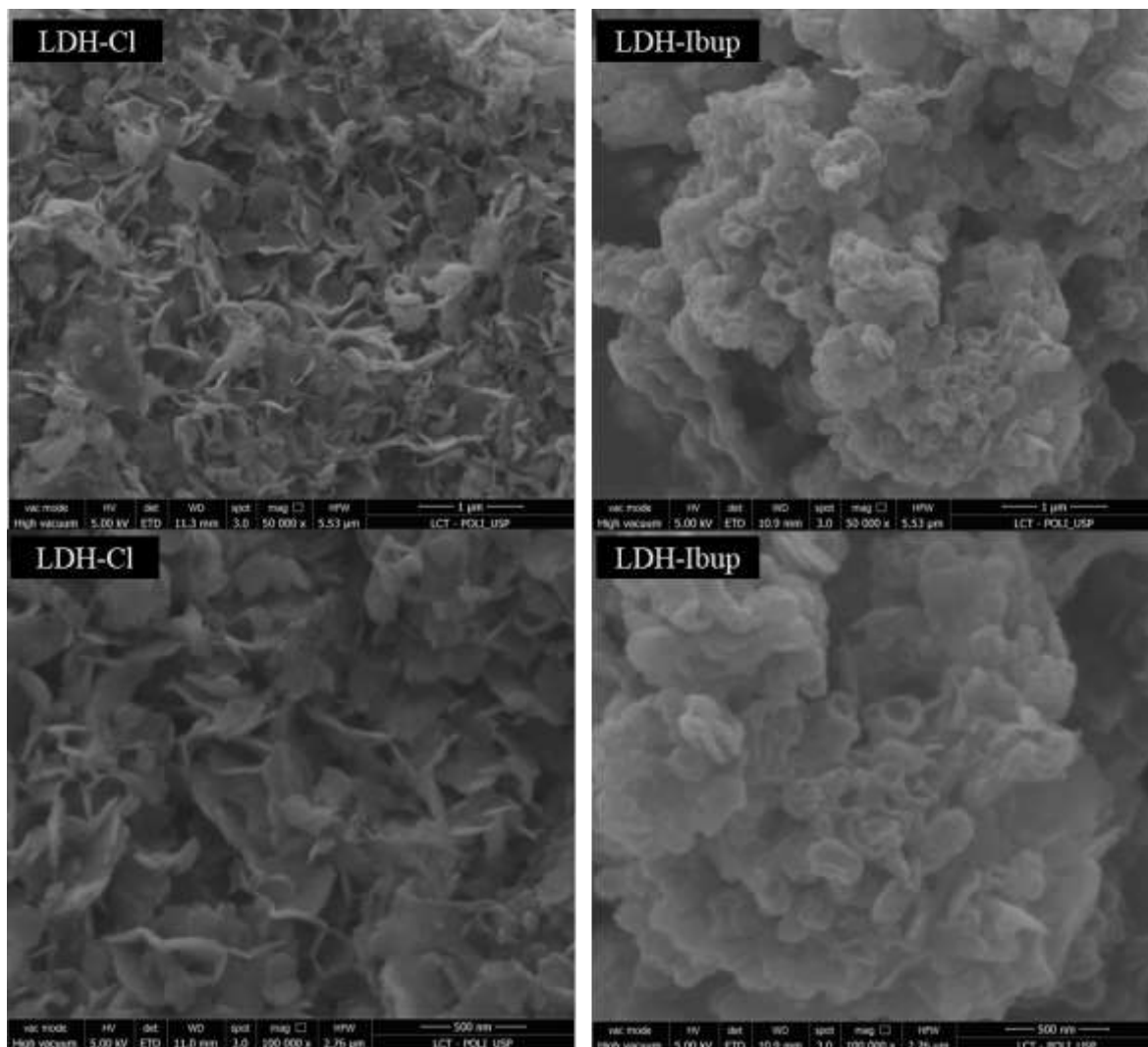


Figura 23: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras LDH-CI e LDH-Ibup nas magnificações de x50.000 (superior) e x100.000 (inferior).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da matriz de LDH-CI mostram grandes agregados de estruturas lamelares com cerca de 300 nm no eixo dos planos lamelares, estruturas características e já esperadas para matrizes do tipo hidróxido duplo lamelar com íons cloreto intercalados (Eulálio, 2019; Rocha, 2015; Rocha, *et al.*, 2016).

Matrizes de LDH com moléculas orgânicas além das estruturas lamelares características desses materiais também podem apresentar estruturas modificadas resultantes do aumento do espaçamento interlamelar; tal fato pode gerar estruturas do tipo *nanoscrolls* na qual as folhas lamelares se curvam formando uma nanoestrutura tubular (Rocha, *et al.*, 2016). Nas amostras de LDH-Ibup, Figura 23, foram observadas

as estruturas lamelares e também uma nova estrutura que se assemelha com conchas ocas, *hollow nanoshells*, de diâmetro aproximado de 100 nm, muito similares a estruturas reportadas para materiais do tipo óxidos duplos lamelares formados a partir de moldes de sacrifício de nanoesferas de carbono para posterior recobrimento com a síntese de LDHs de magnésio, níquel e alumínio seguido de calcinação (Zhang, *et al.*, 2019).

4.1.3. Caracterização das matrizes de Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs) esterilizadas por radiação ionizante

Como nesta Tese o objetivo foi utilizar essas matrizes como carreadores de fármacos aplicados a sistemas *in vivo*, bem como avaliar a ação que a própria matriz tem sobre os processos inflamatórios dos tecidos biológicos, a esterilização dos LDHs sintetizados se faz extremamente necessária, visto que é essencial para garantir que o processo inflamatório observado seja resultante apenas do material implantado e não proveniente de possíveis micro-organismos contaminantes. Além disso, sua caracterização também é necessária a fim de se garantir que o sistema não foi degradado e apresenta as mesmas características mesmo após o processo de esterilização por radiação ionizante (Abuhanoğlu e Özer, 2014).

Os materiais esterilizados utilizados no tratamento dos animais foram nomeados, para fim de comparação neste tópico, de LDH-Cl Irradiado e LDH-Ibup Irradiado e foram submetidos às mesmas análises elementares a fim de se verificar alguma possível influência que a radiação ionizante poderia causar à matriz ou ao intercalato.

Para as duas amostras, considerou-se que o processo de irradiação não seria capaz de alterar a composição dos metais, portanto os valores reportados de ICP-OES aqui são os mesmo já reportados na caracterização dos LDHs sem irradiação.

O LDH-Cl irradiado não sofreu alteração sendo a razão molar de Zn/Al obtida por ICP-OES igual a 2,02 e por análise termogravimétrica chegou-se numa porcentagem de H₂O igual a 11,3%, desta forma, chega-se a uma fórmula mínima de [Zn_{2,06}Al(OH)_{6,12}]Cl·2,1H₂O.

Para o LDH-Ibup irradiado, considerou-se os valores de razão molar de Zn/Al = 1,9, já por análise elementar CHN, foram obtidas as porcentagens em massa de C, H e H₂O iguais a 27,67 %, 4,85 %, e 8,6 %, respectivamente, fornecendo assim uma fórmula mínima igual a [Zn_{1,9}Al(OH)_{5,7}](C₁₃H₇O₂)_{0,75}Cl_{0,25}·2H₂O. Analisando a fórmula

mínima deste material antes da irradiação, $[Zn_{1,9}Al(OH)_{5,7}](C_{13}H_7O_2)_{0,8}Cl_{0,2} \cdot 1,9H_2O$, a máxima carga de fármaco na matriz, 100% de intercalação, é considerada apenas a possibilidade de intercalação via interação eletrostática, e se dá na razão de alumínio pelo intercalato iônico (Al/Ibup⁻) igual a 1, chega-se então pela fórmula mínima na porcentagem de 80% de carregamento inicial do fármaco neste sistema. Uma proposta possível, utilizando os valores obtidos para o LDH-bup irradiado e comparando-os com os valores de antes da irradiação é de uma perda aproximada de 6,3% do fármaco intercalado. A segunda proposta seria não a perda de material orgânico, mas sim a adsorção de moléculas de água, que levaria a fórmula proposta a uma diminuição da massa relativa do fármaco intercalado. Mais estudos são necessários para confirmação de uma das propostas.

A verificação da integridade estrutural da matriz e molecular do Ibup após irradiação foi realizada através de XRD e da análise vibracional, respectivamente.

A Figura 24 mostra os difratogramas de raios X obtidos para as amostras de LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.

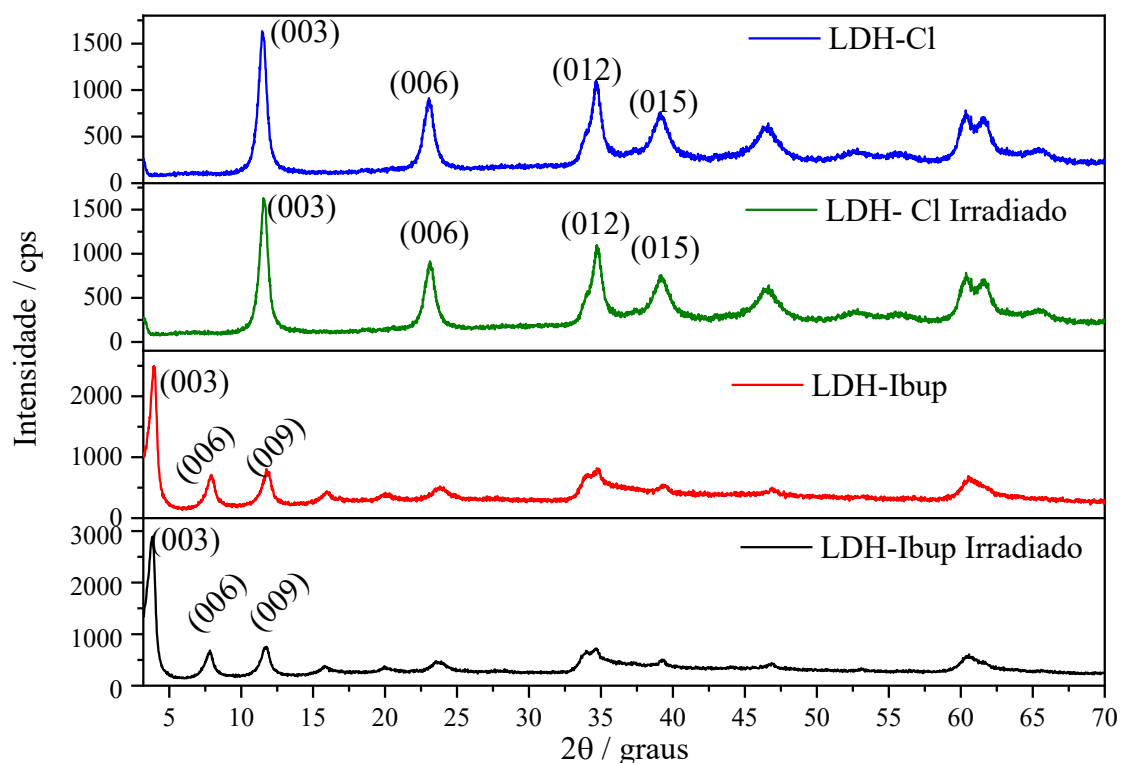


Figura 24: Difratogramas de raios X de LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.

Pela análise dos dados obtidos por XRD, Figura 24, para o LDH-Cl e LDH-Cl irradiado, os valores de 2θ para o pico de difração atribuído ao plano basal (003) se localizam em $11,6^\circ$ e, portanto, fornecem um valor atribuído a distância interlamelar de $7,7 \text{ \AA}$, valor compatível com a intercalação de íons cloreto como já discutido no tópico 4.1.2. Desta forma mostra-se que a estrutura da matriz inorgânica se mantém inalterada após o processo de irradiação.

Ainda na Figura 24 são mostrados os difratogramas de raios X das amostras de LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado. Analisado os valores de 2θ , plano basal (003), observa-se que para o LDH-Ibup irradiado tal pico sofre um deslocamento para $3,9^\circ$ (2θ), o que fornece uma distância interlamelar de $22,64 \text{ \AA}$. Comparativamente ao LDH-Ibup, que apresenta distância interlamelar de $21,87 \text{ \AA}$, com valor de 2θ igual a $4,04^\circ$, observa-se um aumento na distância interlamelar de $0,77 \text{ \AA}$. Tal distanciamento das lamelas, mesmo que pequeno, pode ter sido causado por uma desorganização e/ou degradação das moléculas intercaladas resultante da esterilização por radiação ionizante.

A fim de se garantir a integridade molecular do ibuprofeno intercalado, as amostras foram analisadas por espectroscopia vibracional FTIR e FT-Raman e seus espectros são mostrados nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

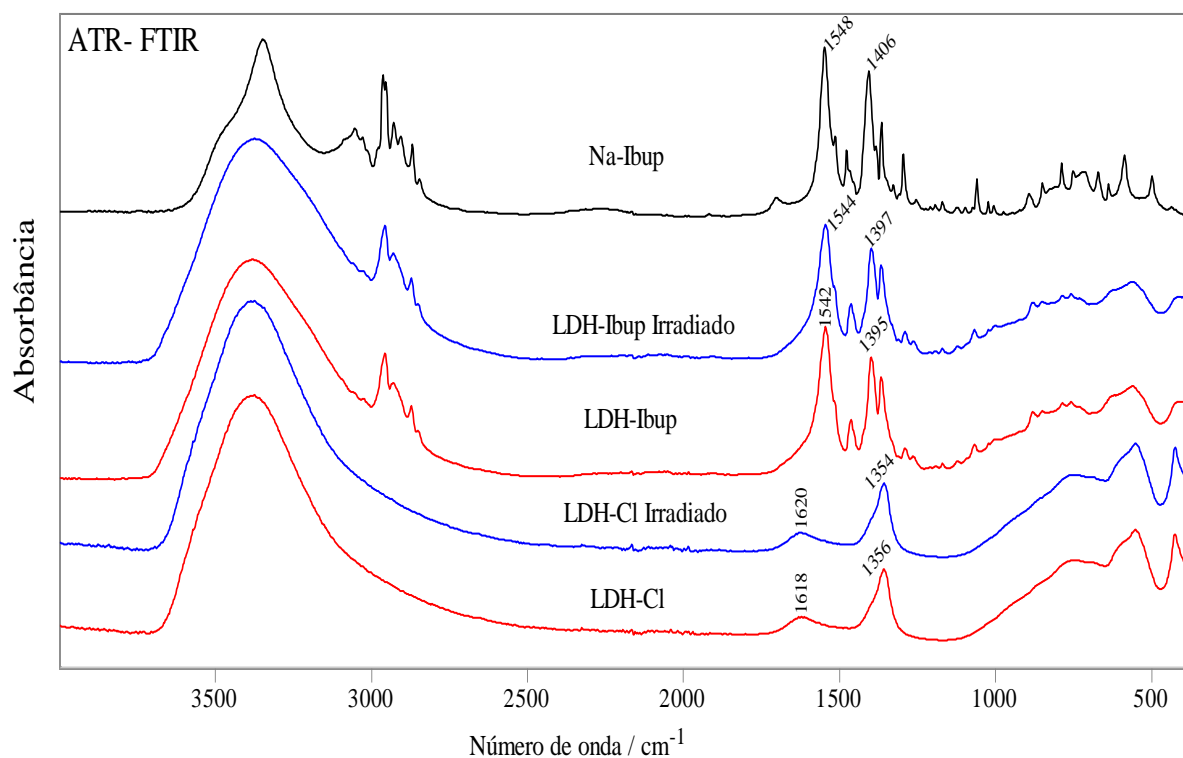


Figura 25: Espectros FTIR de Na-Ibup (ibuprofeno sódico), LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.

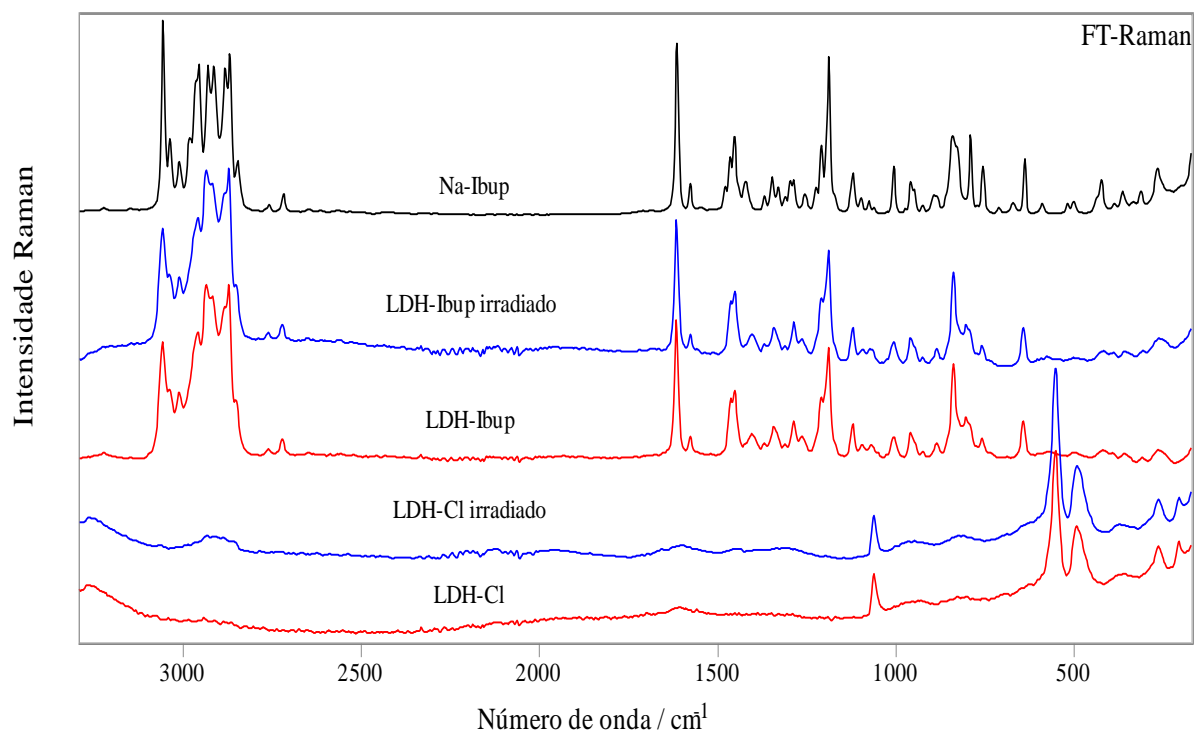


Figura 26: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) de Na-Ibup (ibuprofeno sódico), LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado.

Os espectros FTIR das matrizes irradiadas, apresentados na Figura 25, não mostraram mudanças significativas de posição e largura de banda, bem como também não houve surgimento de novas bandas quando comparados à seus espectros obtidos previamente a esterilização. De modo análogo, os espectros FT-Raman, Figura 26, também não mostraram alterações dos seus perfis espectrais.

Assim, pela comparação entre os espectros FTIR e FT-Raman mostrados para o LDH-Cl, LDH-Cl irradiado, LDH-Ibup e LDH-Ibup irradiado não é possível verificar evidências de modificações moleculares na estrutura da matriz inorgânica e nem do intercalato, porém, considerando os resultados obtidos por análise, por se tratar de uma variação pequena de massa e de composição das fórmulas mínimas propostas, tais modificações possivelmente não são passíveis de identificação pelas técnicas utilizadas já que a parcela majoritária do composto presente continua sendo o ibuprofeno desprotonado.

4.1.4. Ensaio de liberação *in vitro* no modo estático do ibuprofeno intercalado na matriz de hidróxido duplo lamelar

A fim de se verificar a capacidade de liberação modificada de ibuprofeno a partir da matriz de LDH e visando a sua aplicação específica em cápsula articular, a qual considerou-se um sistema parcialmente fechado já que a cápsula articular comparativamente a outros tecidos biológicos como músculos e tecidos do trato gastrointestinal, possui pouca irrigação de vasos sanguíneos (Culemann, *et al.*, 2019; Orr, *et al.*, 2017), foi proposto testes de dissolução em modo estático e com meio de dissolução simulando o fluido sinovial, *Simulated Synovial Fluid* (SSF) com pH = 7,4 (Marques, 2011).

Para as análises de perfil de dissolução, fez-se necessário o preparo de uma curva de calibração, em que foram preparadas soluções de ibuprofeno sódico dissolvido em SSF em diferentes concentrações, sendo a máxima concentração de 25 ppm, visto que seria ao equivalente de ibuprofeno em aproximadamente 53,0 mg de LDH-Ibup. As soluções preparadas foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis,

Figura 27, e com os valores de absorbância em 272 nm foi obtida a curva de calibração mostrada na Figura 28.

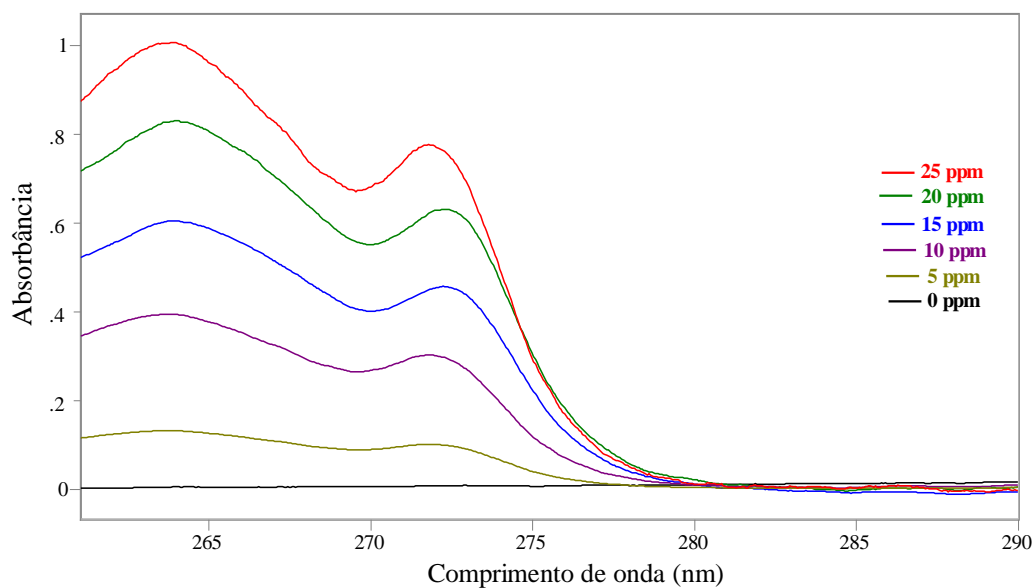


Figura 27: Espectros de absorção no UV-Vis das soluções de ibuprofeno sódico dissolvido em SSF com máxima concentração de 25 mg L^{-1} (25 ppm).

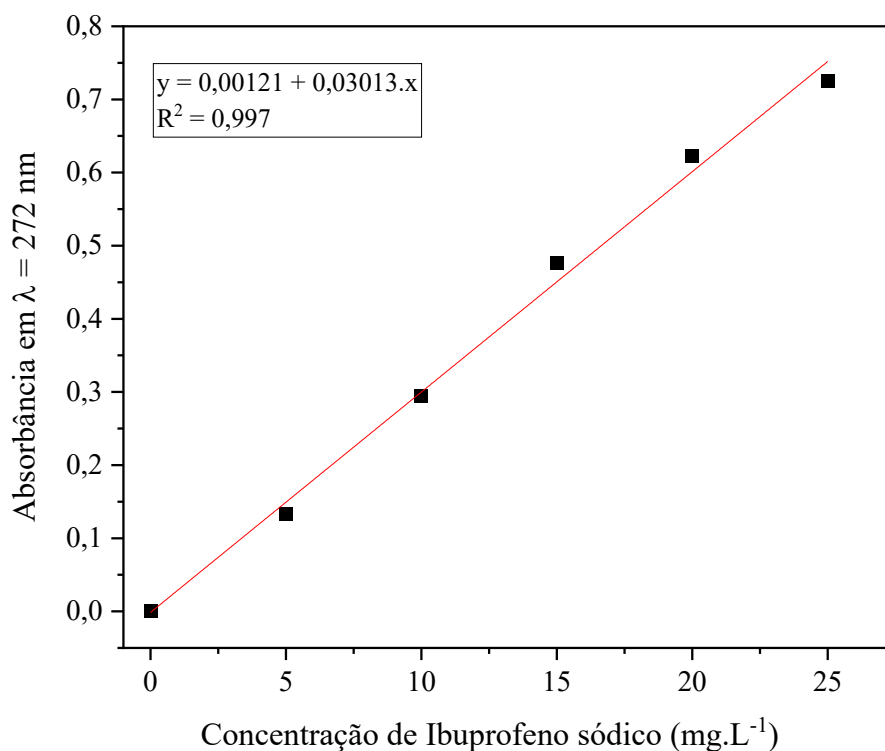


Figura 28: Curva de calibração de ibuprofeno sódico obtida pelo máximo de absorbância em 272 nm.

Como descrito na parte experimental, o perfil de liberação foi feito no modo estático, em microtubos do tipo eppendorf de 2 mL à temperatura de 37 °C utilizando 65,0 mg de LDH-Ibup em pó, equivalente a 30 mg de ibuprofeno, e a cada coleta de 1 mL igual volume de SSF foi repostado. O experimento foi feito em triplicata e os valores médios obtidos são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores médios de quantidade de Ibuprofeno liberado a partir da matriz de LDH-Ibup em SSF (37 °C) utilizando o método estático.

Tempo (horas)	Ibuprofeno liberado (mg L⁻¹)*	Ibuprofeno liberado (%)	Desvio padrão
0,25	0,379	1,26	0,02
0,5	1,411	4,70	0,05
0,75	1,868	6,22	0,12
1	2,265	7,55	0,08
1,25	2,650	8,83	0,01
1,5	3,481	11,60	0,03
1,75	3,936	13,12	0,01
2	4,295	14,31	0,04
2,25	4,663	15,54	0,04
2,5	5,065	16,88	0,09
2,75	5,365	17,88	0,07
3	5,829	19,43	0,03
3,5	6,334	21,11	0,08
4	6,734	22,44	0,10
4,5	7,152	23,84	0,09
5	7,584	25,28	0,04
5,5	7,990	26,63	0,07
6	9,222	30,75	0,02
7	9,659	32,19	0,06
8	10,19	33,98	0,13
9	10,76	35,87	0,05
10	11,36	37,88	0,11
11	13,51	43,05	0,16
12	15,71	45,38	0,12
24	17,59	58,63	0,20
36	19,57	65,24	0,14
48	21,72	72,40	0,13

72	22,84	76,13	0,18
----	-------	-------	------

*média da triplicata

A partir dos valores médios obtidos de ibuprofeno liberado, obteve-se a curva de perfil de liberação do ibuprofeno mostrada na Figura 29. Nota-se que a curva tende a atingir um patamar de liberação máxima, aproximadamente 76%, após 72 horas, semelhante a materiais híbridos estudados por colaboradores do grupo que apresentam características de liberação modificada (Constantino, *et al.*, 2023; Eulálio, 2019).

Nota-se também que, apesar de ser utilizado um volume disponível de 2 mL a massa de 60 mg de LDH-Ibup, aproximadamente 30 mg de ibuprofeno, e sabendo que a solubilidade do ibuprofeno em pH 7,4 a 25 °C é aproximadamente 0,432 g L⁻¹ (Herzfeldt e Kümmel, 1983; Janus, *et al.*, 2020) a condição do teste pode ser considerada uma condição *sink*, em que o volume utilizado de meio de liberação deve ser maior que três vezes o volume necessário para dissolução de 100% do fármaco (Liu, *et al.*, 2013), já que a máxima contração obtida foi de 22,84 mg L⁻¹.

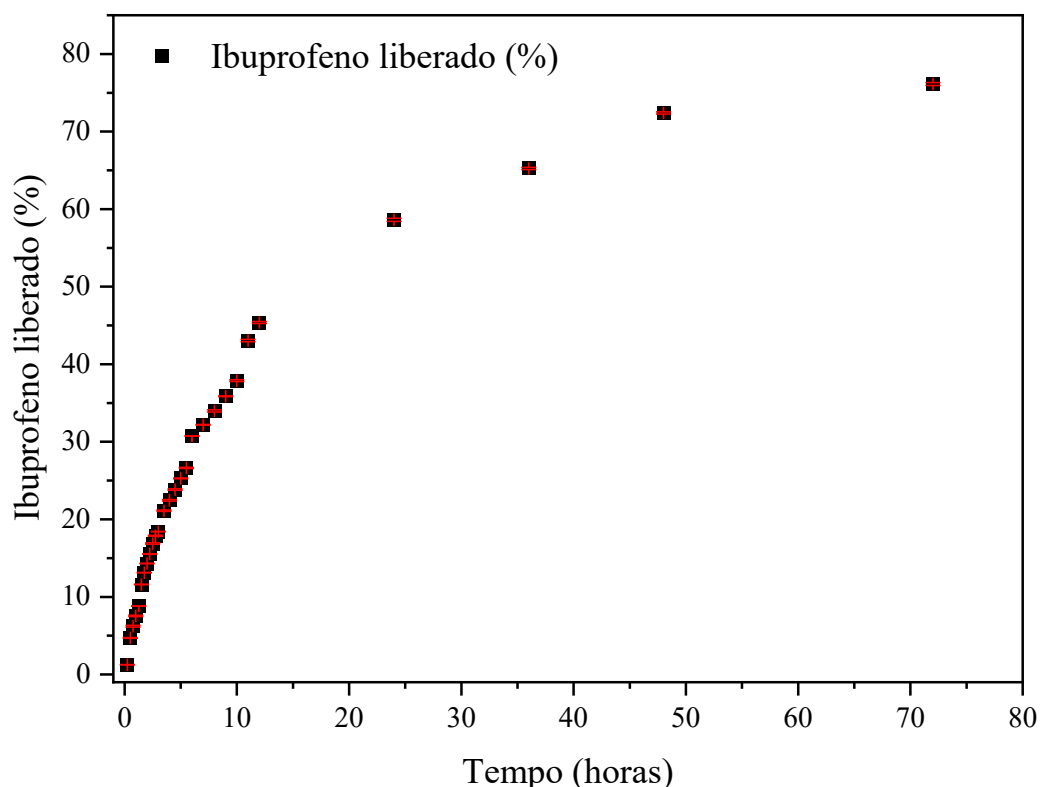


Figura 29: Perfil de liberação do ibuprofeno em porcentagem a partir da matriz de LDH-Ibup. Ensaios realizados em triplicata (n=3).

Com os dados obtidos do perfil de dissolução, foi realizado o estudo da cinética de liberação do ibuprofeno a partir da matriz inorgânica. Para tal, foram propostos cinco modelos cinéticos descritos abaixo.

O modelo de ordem zero, o qual pode ser utilizado para descrever processos de liberação em que a matriz não é degradada no processo e segue a seguinte equação:

$$1 - \frac{M_t}{M_0} = k_0 t$$

onde M_t e M_0 são a concentração do fármaco dissolvido no tempo (t) e a concentração inicial, respectivamente, e k_0 a constante de liberação de ordem zero. Assim, um gráfico de $1 - (M_t/M_0)$ pelo tempo deve ser linear.

O modelo de primeira ordem leva em consideração a proporcionalidade do fármaco liberado e a sua quantidade resmanescente na matriz, ou seja, ao passar do tempo a quantidade de fármaco liberado deve diminuir seguindo a seguinte equação:

$$\ln(M_0 - M_t) = \ln M_0 - kt$$

onde M_0 é a quantidade inicial do fármaco na matriz e M_t a quantidade dissolvida no tempo t . Um gráfico de $\ln[(M_0 - M_t)/M_0]$ pelo tempo deve ser linear.

O modelo de Higuchi, primeiro modelamento matemático proposto em 1961 para descrever a liberação de fármacos a partir de matrizes porosas, considera que a concentração inicial de fármaco é superior à sua solubilidade; a difusão do fármaco é dada em uma única dimensão, desconsiderando efeitos de borda; que a matriz não é lixiviada e dissolvida; e que a difusão do fármaco é constante (Dash, *et al.*, 2010; Higuchi, 1963). Tal modelo pode ser descrito simplificada pela seguinte equação:

$$M_t = k_H \sqrt{t}$$

onde M_t é quantidade de fármaco dissolvido no tempo t e k_H a constante de Higuchi que inclui o coeficiente de difusão do fármaco no solvente e fatores de porosidade da matriz.

O modelo de Korsmeyer-Peppas, inicialmente utilizado para liberação de fármaco a partir de matrizes poliméricas, mas também aplicado para sistemas onde há relaxação estrutural da matriz, considera para a liberação de aproximadamente 60% da quantidade inicial do fármaco a combinação fatores de transporte do tipo Fickiano, difusional e aleatório gerando um gradiente, e não-Fickiano, quando a difusão não depende do gradiente de concentração no meio podendo gerar barreiras definidas de concentração. Tal modelo segue a equação a seguir:

$$\log\left(\frac{M_t}{M_0}\right) = \log k + n \log t$$

Onde M_t é quantidade de fármaco dissolvido no tempo t , M_0 a concentração inicial do fármaco e n o fator que pode indicar o modo de transporte do fármaco. O fator n quando maior que 1 indica transporte do tipo não-Fickiano, quando igual a 1 indica transporte de ordem zero, quando entre 0,5 e 1 um transporte misto do tipo Fickiano e não-Fickiano e quando menor que 0,5 há a indicação de um transporte puramente Fickiano (Dash, *et al.*, 2010; Korsmeyer, *et al.*, 1983).

O modelo de difusão parabólica, frequentemente empregado para descrever liberação de fármacos a partir de argilominerais presentes em solos, em que a velocidade de liberação é dada em função da difusão no interior das partículas da matriz. Neste modelo é considerada a difusão radial do fármaco a partir de um cilindro de concentração constante e homogênea, sendo a velocidade de liberação do fármaco dada proporcionalmente à capacidade de difusão no interior da matriz (Sparks, 2018). Esse modelo segue a seguinte equação:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{4}{\pi^{0.5}} \left(\frac{Dt}{r^2}\right)^{0.5} - \frac{Dt}{r^2}$$

onde M_t é a quantidade de fármaco liberada, M_0 a quantidade inicial em equilíbrio no interior do cilindro, r o raio do cilindro e D o coeficiente de difusão do fármaco no interior do cilindro, assim um gráfico de $(M_t/M_0)/t$ por $t^{0.5}$ deve ser linear.

Com base nos modelos apresentados, foi definida a utilização de valores de até 50% da liberação de ibuprofeno, aproximadamente 12 horas, para ajuste nos modelos cinéticos. Os valores ajustados nos cinco modelos são apresentados na Figura 30.

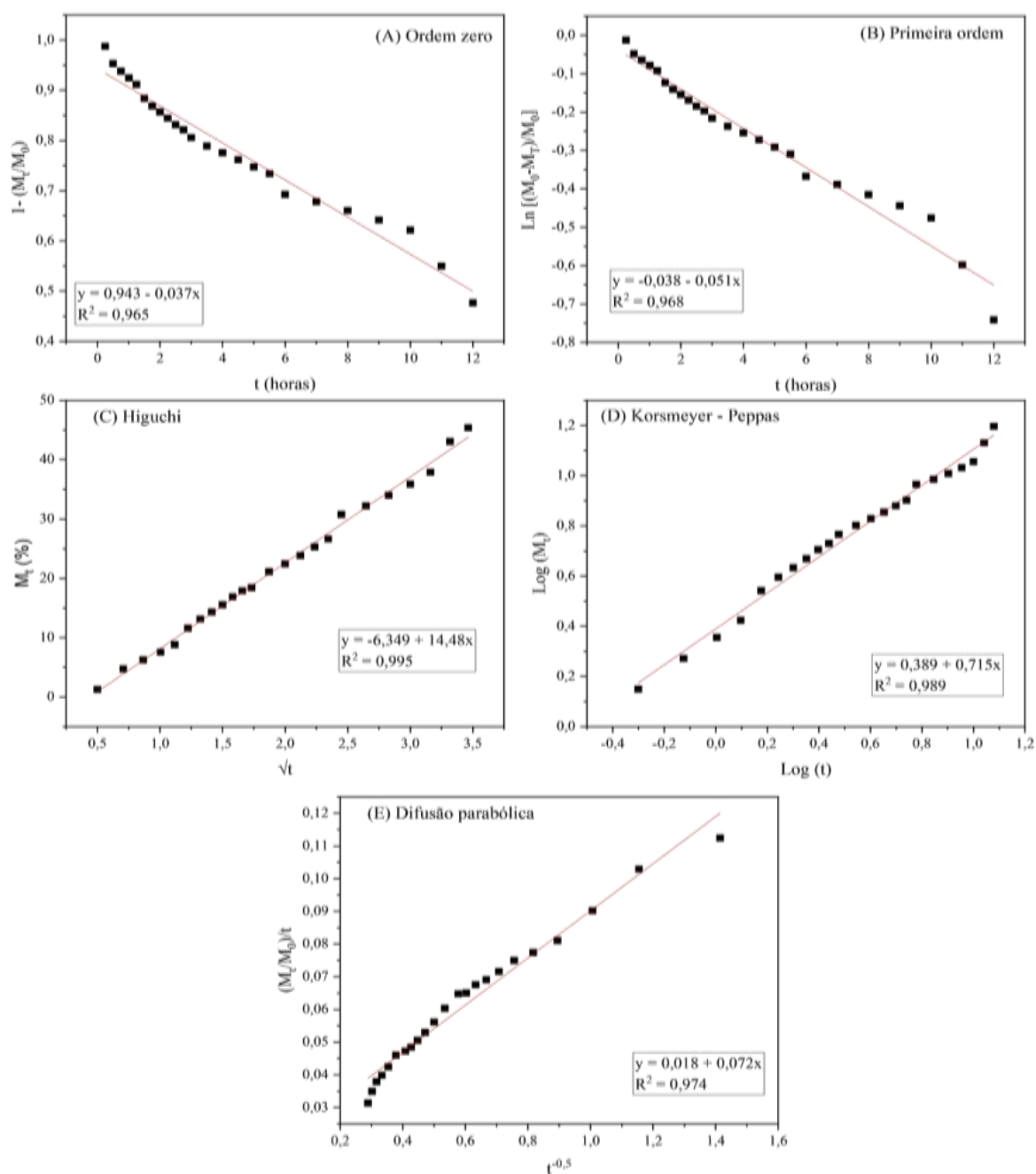


Figura 30: Modelos cinéticos aplicados à amostra LDH-Ibup considerando 12 horas de liberação em SSF (pH = 7,4). Modelos (A) de ordem zero, (B) de primeira ordem, (C) de Higuchi, (D) Korsmeyer-Peppas e (E) difusão parabólica.

Para a análise de qual modelo cinético se adequa melhor aos resultados obtidos, foi considerado o coeficiente de determinação, R^2 , por se tratar de uma medida de ajuste ao modelo linear utilizado.

Mostra-se desta forma que para a matriz de LDH-Ibup os modelos de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas foram os que melhor se ajustaram aos dados experimentais obtidos com R^2 iguais a 0,995 e 0,989, respectivamente. No modelo de Korsmeyer-

Peppas é possível observar que o valor do coeficiente angular da equação ajustada, equivalente ao fator n , possui um valor de 0,715, ou seja, indicativo de uma difusão mista do tipo Fickiana e não-Fickiana. Aliado ao modelo de Higuchi, que como descrito anteriormente, considera em sua constante cinética o fator de difusão do fármaco, pode-se sugerir que para esta matriz de LDH-Ibup em sua apresentação em pó a difusão do ibuprofeno tanto no interior das partículas da matriz quanto em seu exterior, soluto-solvente, é um dos principais fatores limitantes da velocidade de liberação.

O modelo da difusão parabólica, apesar de apresentar um coeficiente de determinação relativamente mais baixo aos outros dois modelos citados acima, R^2 igual a 0,974, também indica uma alta influência do fenômeno de difusão intra-partícula, mostrando-se concordante com a análise anterior.

Os modelos de ordem zero e de primeira ordem apresentaram os valores mais baixos de R^2 , 0,965 e 0,968, respectivamente. Tais modelos provavelmente não se ajustaram adequadamente por não possuírem fatores de correção suficientes em suas constantes cinéticas que considerem os processos relacionadas à geometria da matriz e a difusão interna do fármaco.

Além disso, vale ressaltar que na literatura a grande maioria os experimentos de liberação modificada de fármacos é feito seguindo as recomendações da farmacopeia norte-americana (United States Pharmacopeia - USP) (USP, 2008), por exemplo, com a utilização do aparato do tipo II (pás), ou do tipo I (cestas), que caracteriza-se por ser um método dinâmico de liberação em que há movimentação do meio de dissolução. Em sua maioria a apresentação do material a ser utilizado também é na forma de pó o que gera perfis de dissolução em que o máximo de fármaco liberado é atingido em minutos ou poucas horas, fato devido à maior área de contato do sólido com o meio de dissolução e uma maior dinâmica de movimentação do meio.

Comparando o experimento apresentado acima, modo estático, em que máximo de liberação foi atingido em cerca de 72 horas e considerando a grande diferença da dinâmica de liberação nos métodos em que há movimentação do meio de dissolução, como por exemplo o experimento de Ambrogi, *et al.*, 2001, em que foi sintetizada uma matriz de LDH de magnésio e alumínio intercalada com ibuprofeno e que utilizando o as pás do aparato II (USP) apresentou uma liberação de ibuprofeno de 60% aos 20 minutos e 100% aos 100 minutos de ensaio. Dessa forma, mesmo considerando as diferentes dinâmicas de liberação pode-se sugerir uma concordância entre os resultados mostrados aqui e os encontrados na literatura para materiais híbridos de hidróxidos

duplos lamelares intercalados com moléculas de interesse farmacêutico como por exemplo o sulindaco, cetoprofeno, diclofenaco e ibuprofeno, todos anti-inflamatórios não-esteriodais (Ambrogi, *et al.*, 2001; Ambrogi, *et al.*, 2015; Parello, *et al.*, 2010; Perioli, *et al.*, 2011; Rocha, 2015; Rocha, *et al.*, 2016; Rojas, *et al.*, 2014; Rojas, *et al.*, 2012).

4.2. Análises da evolução temporal do processo inflamatório dos componentes da cápsula articular de joelho de ratos Wistar

Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos do acompanhamento do processo inflamatório dos tecidos biológicos que compõem a cápsula articular de joelho de ratos por microscopia Raman com seus tratamentos estatísticos, e a comparação com análises histológicas.

4.2.1. Caracterização dos tecidos biológicos sadios (controle)

Como o objetivo deste trabalho foi de acompanhar a evolução temporal do processo inflamatório e os efeitos que implantes intra-articulares de LDH carregados com ibuprofeno neste processo inflamatório na cápsula articular de ratos Wistar, faz-se necessária a caracterização dos tecidos e regiões dos tecidos biológicos que a compõem.

Assim, foi determinado que o estudo fosse conduzido utilizando articulações de joelho dos membros posteriores de ratas da raça Wistar, por possuírem anatomia semelhante à encontrada em seres humanos, além de serem maiores quando comparadas com as articulações dos membros anteriores destes animais.

Serão mostrados os resultados da caracterização espectroscópica que foi feita para a membrana sinovial, cartilagens e ossos que são encontrados na cápsula articular.

No momento da coleta das amostras, foi capturada uma foto da articulação aberta em que estão indicadas as localizações de alguns dos seus componentes, como mostrado na Figura 31.

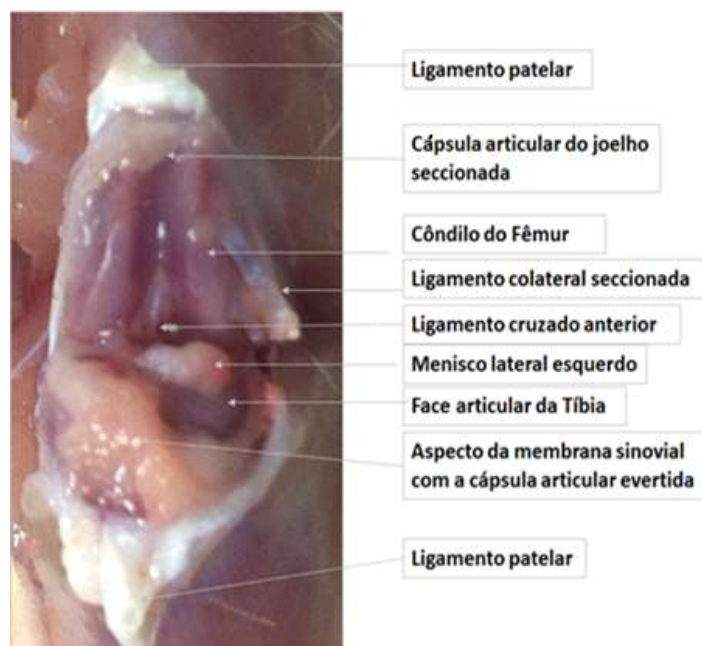


Figura 31: Fotografia da cápsula articular sem inflamação de joelho de rata Wistar com o nome de suas estruturas.

4.2.1.1 Caracterização da membrana sinovial

Como descrito na Introdução, a membrana sinovial é um tecido composto majoritariamente de dois tipos de células, as semelhantes a fibroblastos e as semelhantes a macrófagos, além da presença de matriz extracelular e fibras colágenas, componentes responsáveis pela garantia da homeostase e elasticidade. Este tecido específico apresenta poucos vasos sanguíneos que possuem função de fornecimento de compostos ao líquido sinovial (ácido hialurônico e fatores de crescimento) (Junqueira e Carneiro, 2008). Esse tecido é essencial também para o estudo do processo inflamatório articular já que é o primeiro tecido a ser afetado quando o processo se inicia (Schopf, *et al.*, 2006).

O espectro Raman médio foi obtido de diferentes pontos da membrana sinovial de ratos sadios (controle) e é mostrado na Figura 32.

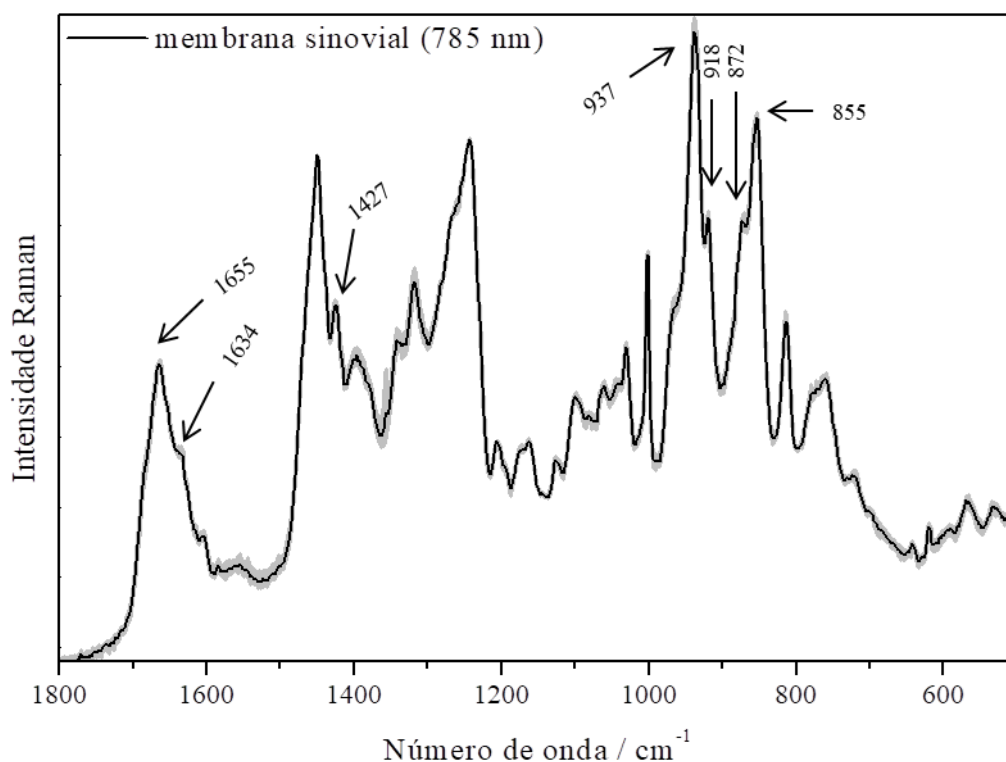


Figura 32: Espectro Raman médio obtido da membrana sinovial (preto) de ratos saudáveis e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.

O espectro médio da membrana sinovial, Figura 32, mostra um perfil característico encontrado em tecidos biológicos evidenciado principalmente pelos envelopes de bandas encontradas entre 1220 a 1370 cm^{-1} e 1600 a 1700 cm^{-1} atribuídos a estruturas secundárias de Amida III e Amida I, respectivamente (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014), além também do conjunto de bandas na região de 1400 a 1500 cm^{-1} atribuído a deformações angulares do tipo $\delta(\text{CH}_2)$ e $\delta(\text{CH}_3)$ presente nas proteínas que compõem o tecido. Nota-se também bandas bem intensas localizadas em 855 e 918 cm^{-1} que são atribuídas ao aminoácido prolina e em 872 e 937 cm^{-1} atribuídas a sua forma hidroxilada, a hidroxiprolina. Colágenos de forma geral apresentam essa sequência de bandas intensas já que possuem estrutura do tipo Gly-X-Y, onde Gly é glicina e X-Y sendo prolina e hidroxiprolina respectivamente; tal sequência de aminoácidos é repetida diversas vezes ao longo das fibras colágenas e em todos os tipos de colágenos (Ricard-Blum, 2011).

Neste mesmo espectro médio, mostrado na Figura 32, notam-se duas bandas localizadas em 1634 cm^{-1} , que se destacam do envelope de bandas atribuídas a Amida I,

e a banda em 1427 cm^{-1} atribuída a deformações angulares do tipo $\delta(\text{N-H})$ (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014). Essas duas bandas são características de colágenos do tipo III e IV e evidenciam a presença das duas espécies moleculares. Colágenos do tipo IV são encontrados em pequena quantidade na lâmina basal de tecidos epiteliais e uma vez que a membrana sinovial se assemelha a esse tecido é esperado encontrá-lo. Porém, em relação à intensidade das bandas apresentadas pode-se concluir que também há a presença do colágeno tipo III visto que é um dos principais componentes da membrana sinovial e que confere a este tecido a sua elasticidade frente à movimentação.

A fim de comparação, são mostrados na Figura 33 os espectros Raman de colágenos do tipo I, III e IV obtidos nas mesmas condições e parâmetros das análises feitas para os tecidos de cápsula articular que foram amostrados.

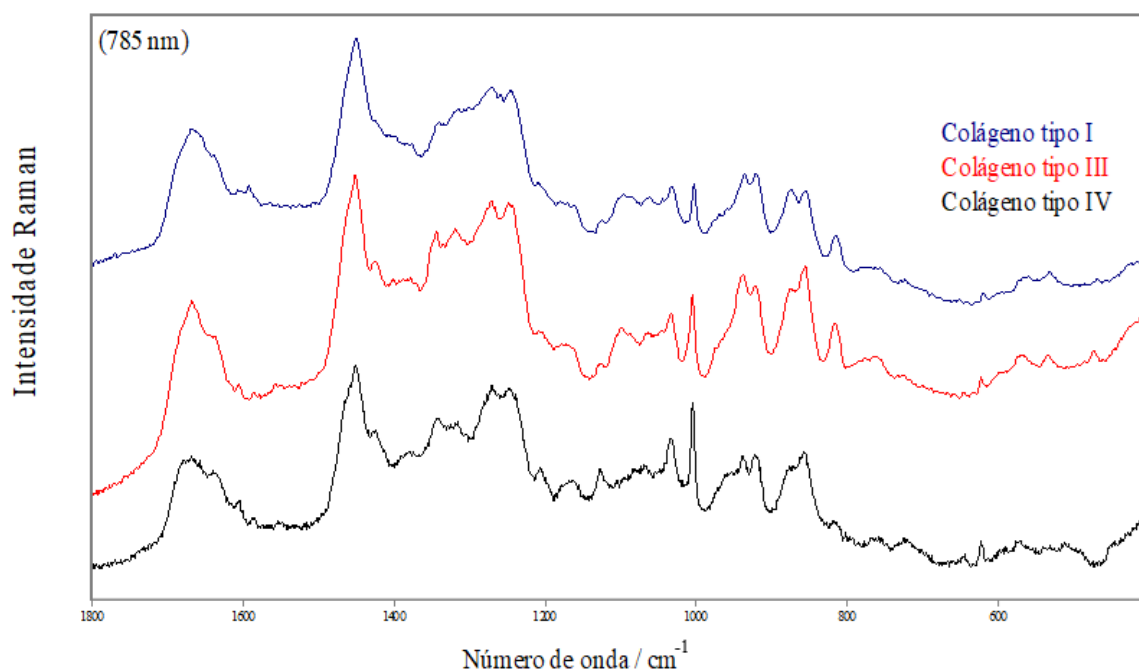


Figura 33: Espectros Raman (785 nm) de Colágeno tipo I, III e IV.

4.2.1.2 Caracterização do tecido cartilaginoso (menisco)

Como também descrito na Introdução, as cartilagens que compõem a cápsula articular são denominadas cartilagens de hialina; no caso das articulações, sua composição é conhecida e possui matriz extracelular (ácido hialurônico, fibras colágenas do tipo II e glicosaminas, principalmente os sulfatos de condroitina pertencentes ao sub-grupo dos glicosaminoglicanos, GAGs), que conferem sua rigidez, e

condrócitos, que são células responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular citados acima.

O espectro Raman médio do menisco foi obtido de 10 diferentes pontos das amostras coletadas de ratos saudáveis (controle) e são mostrados na Figura 34.

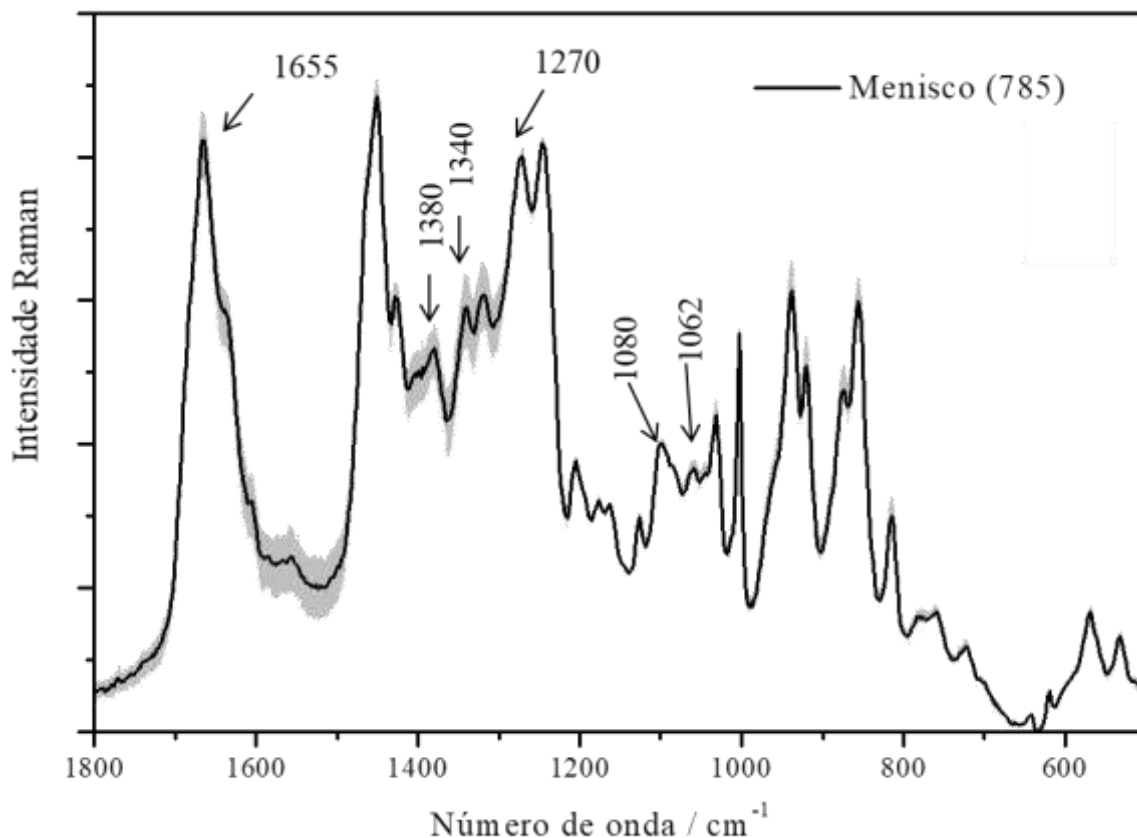


Figura 34: Espectro Raman médio obtido do menisco (preto) de ratos saudáveis e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.

O espectro médio do menisco, Figura 34, apresenta um perfil similar ao espectro médio da membrana sinovial apresentado na Figura 33 porém, é possível notar diferenças claras na região de Amida III, evidenciada pelas bandas em 1270 e 1380 cm^{-1} que ficam mais intensas e que são atribuídas a estruturas secundárias do tipo α -hélice de amidas e deformações angulares $\delta(\text{CH}_3)$ características de GAGs. Nesta região é também encontrada a banda em 1340 cm^{-1} que pode ser atribuída a deformações angulares de grupos CH_2 presentes nas cadeias colágenas (Pavlou, *et al.*, 2018; Rieppo, *et al.*, 2017) respectivamente. Além disso, também são evidenciadas bandas em 1062 e 1080 cm^{-1} ,

sendo a primeira atribuída a estiramentos $\nu(\text{C-O-C})$ referente à ligação covalente entre monômeros de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina que formam as cadeias de ácido hialurônico e a segunda banda atribuída à contribuição do estiramento $\nu_3(\text{SO}_4^{2-})$ proveniente originário das várias cadeias de condroitina sulfatada que se ligam eletrostaticamente ao colágeno II (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014).

4.2.1.3 Caracterização do tecido ósseo

O tecido ósseo é classificado como um material compósito, sendo sua constituição majoritariamente de uma matriz inorgânica formada por hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que pode estar carbonatada e que é depositada sobre uma rede orgânica que possui aproximadamente 85% da sua composição de colágeno I que é sintetizada pelas células denominadas osteoblastos durante a gênese do tecido. O modelo de articulação de joelho estudado é composto pelos chamados ossos longo (fêmur e tíbia), que tem estrutura dividida na porção da diáfise (parte central no eixo principal) e a porção das epífises (extremidades). Neste estudo, será apenas considerada a região da epífise, onde se encontra o côndilo, porção externa e localizada dentro da cápsula articular. Esta região é conhecida pela presença de ossos compactos (porção cortical), ou seja, região que possui seu processo de mineralização completo (Junqueira e Carneiro, 2008).

Na Figura 35 e 36 são mostrados os espectros Raman médios obtidos de 10 diferentes pontos da tíbia e do fêmur, respectivamente, de ratos sadios (controle).

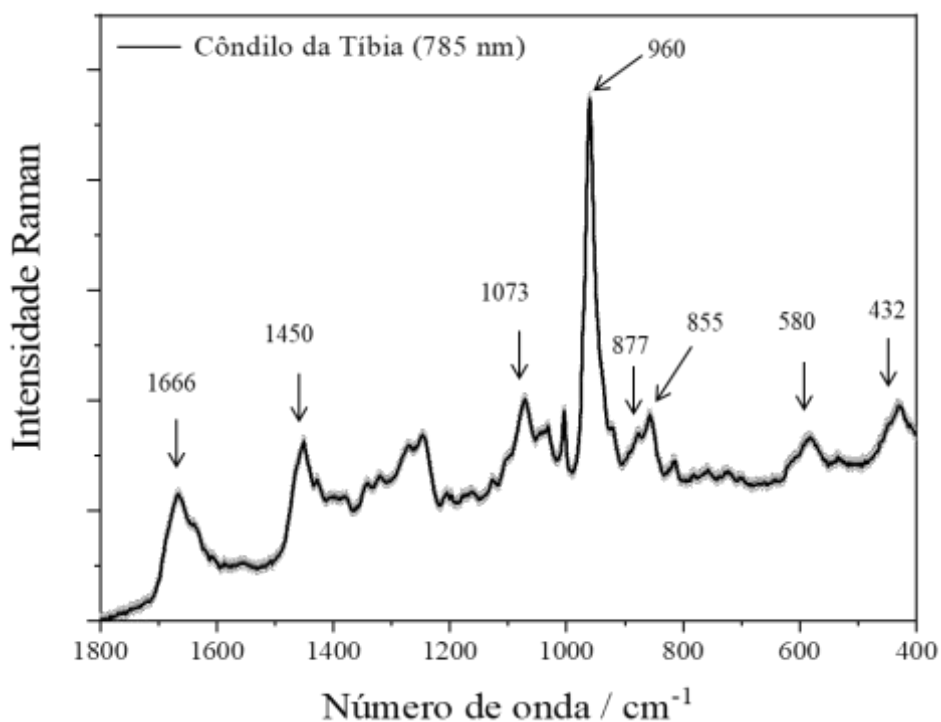


Figura 35: Espectro Raman médio obtido do côndilo da Tibia (preto) de ratos sadios e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.

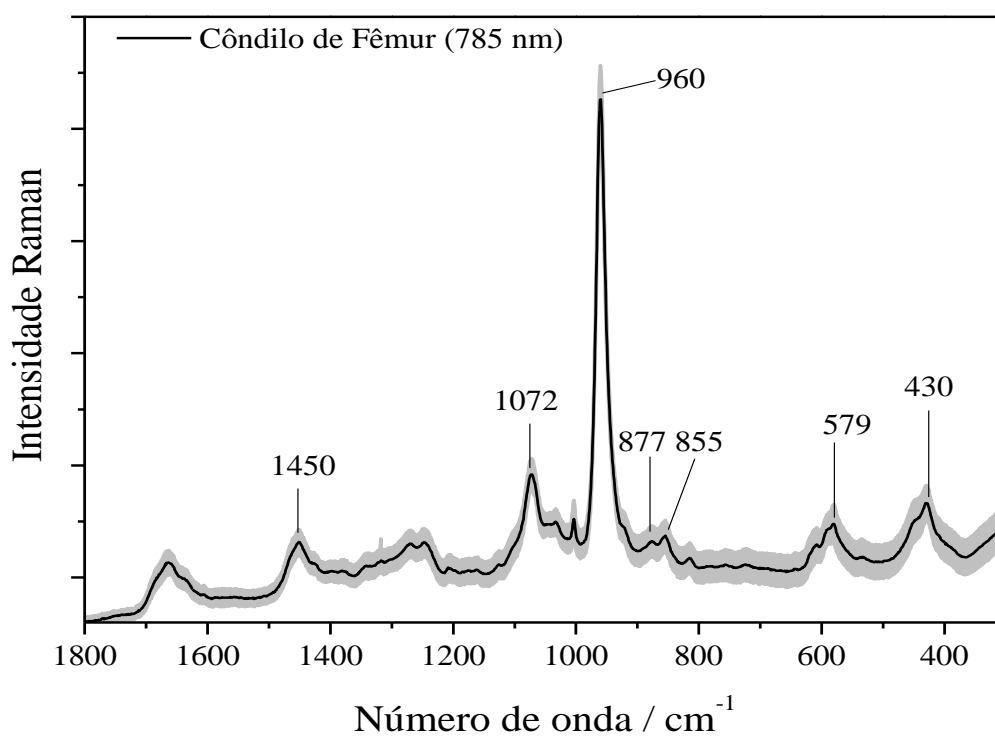


Figura 36: Espectro Raman médio obtido do côndilo do Fêmur (preto) de ratos sadios e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos.

Os espectros médios da tíbia e do fêmur, Figuras 34 e 35, mostram-se altamente concordantes entre si, ambos apresentam nitidamente as bandas em 430, 579 e 960 cm^{-1} que são atribuídas às vibrações $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ e $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$, respectivamente, do grupo fosfato presente na composição da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Talari, *et al.*, 2014).

A banda encontrada em 1072 cm^{-1} é composta por um envelope de bandas, fato este observado pela presença de ombros no perfil espectral gerando a assimetria observada. A composição e atribuição deste envelope de bandas torna-se complexa visto que há uma degenerescência acidental do estiramento $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ e o estiramento simétrico $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$, além da presença de bandas relativas à matriz orgânica de colágenos tipo I (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014).

Trabalhos recentes que envolvem estudos de acompanhamento de processos de biocompatibilidade de implantes, de reparo e/ou degradação em tecido ósseo por espectroscopia Raman atribuem tal banda diretamente ao estiramento simétrico do íon carbonato e relacionam sua intensidade com a intensidade da banda em 960 cm^{-1} , $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$, de forma que a razão dada por I_{960}/I_{1070} evidencia a taxa de remodelamento ósseo, em que íons PO_4^{3-} são substituídos por íons CO_3^{2-} . Esta troca iônica gera uma carga residual positiva que pode ser compensada pela perda de íons Ca^{2+} da matriz óssea (Bi, *et al.*, 2013; Farlay, *et al.*, 2019; Roschger, *et al.*, 2020; Von Euw, *et al.*, 2019).

Além das bandas relacionadas à parcela mineal dos ossos, é possível encontrar bandas referentes aos aminoácidos prolina e hidroxiprolina em 855 e 877 cm^{-1} , respectivamente, atribuídas à presença da rede orgânica de colágeno tipo I.

O envelope de bandas com máximo encontrado em 1450 cm^{-1} é atribuído a deformações angulares de grupos CH_2 (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014) e, portanto, sua intensidade pode ser relacionada ao conteúdo total de matéria orgânica presente nos ossos. Tal atribuição permite então que se meça a razão entre a quantidade de material orgânico total e de matriz inorgânica, I_{1450}/I_{960} , para fins de comparação entre diferentes grupos amostrais. Ainda referente à composição do material orgânico encontrado, é possível localizar a banda em 1666 cm^{-1} , que é atribuída à estrutura secundária do tipo α -hélice presente na composição do colágeno tipo I (Talari, *et al.*, 2014).

No espectro médio de côndilo de fêmur, Figura 36, observa-se o mesmo padrão espectral obtido para o côndilo da tíbia, sendo a única diferença a grande variância espectral evidenciada pela região em cinza. Tal fator, provavelmente, foi causado pela limpeza insuficiente da amostra no momento da obtenção dos espectros, o que gerou o surgimento de um fundo de luminescência que é muito característico e comum em amostras biológicas, tal luminescência altera a posição da linha de base e gera a variância observada.

4.2.2. Caracterização dos tecidos com inflamação induzida por administração de Adjuvante Completo de Freund (ACF) com e sem LDH-Ibup

Uma vez feita a caracterização dos tecidos controle, sem inflamação, foram realizados os experimentos em que os animais foram submetidos a administração intra-articular do indutor inflamatório Adjuvante Completo de Freund.

4.2.2.1. Teste de dose de Adjuvante Completo de Freund (ACF)

Para a confirmação e determinação do parâmetro de dose do ACF administrado intra-articularmente seguiu-se inicialmente o protocolo sugerido na literatura (Freund, 1947; Freund e McDermott, 1942) em que a dose de 0,1 mL de ACF por 100 g de massa do animal foi administrada em apenas 1 animal, porém, como o escopo deste trabalho consiste no acompanhamento do tratamento do processo inflamatório com suspensão de LDH-Ibup, o volume da cápsula articular não poderia ser completamente preenchido por ACF, motivo pelo qual a dose de ACF foi reduzida pela metade (0,05 mL / 100 g de massa) em um segundo animal. Os tecidos amostrais foram coletados após 7 dias da administração do ACF, período em que se espera a maior intensidade do processo inflamatório.

Foram realizados testes de deambulação nos dois animais previamente ao sacrifício para coletas dos tecidos amostrais. Os dois animais foram induzidos a movimentação dentro da gaiola e o animal em que a dose de ACF foi administrada foi maior não apresentou movimentação satisfatória comparada a um animal sadio e os animais em que a dose menor de ACF foi administrada.

Durante o preparo para a cirurgia de coleta de amostras foram capturadas fotografias comparativas dos dois joelhos posteriores de cada animal, Figura 37. Nelas é

possível notar no animal em que o maior volume de ACF foi administrado um grande edema local caracterizado pelo inchaço e vermelhidão dos tecidos causado pelo intenso processo inflamatório. Além disso, foi constatado uma capacidade muito reduzida de movimentação articular quando comparada ao joelho sadio, evidenciado pelas fotografias da Figura 37 que foram capturadas das articulações no máximo ângulo de extensão possível. Muito provavelmente estes foram os principais motivos da baixa movimentação do animal.

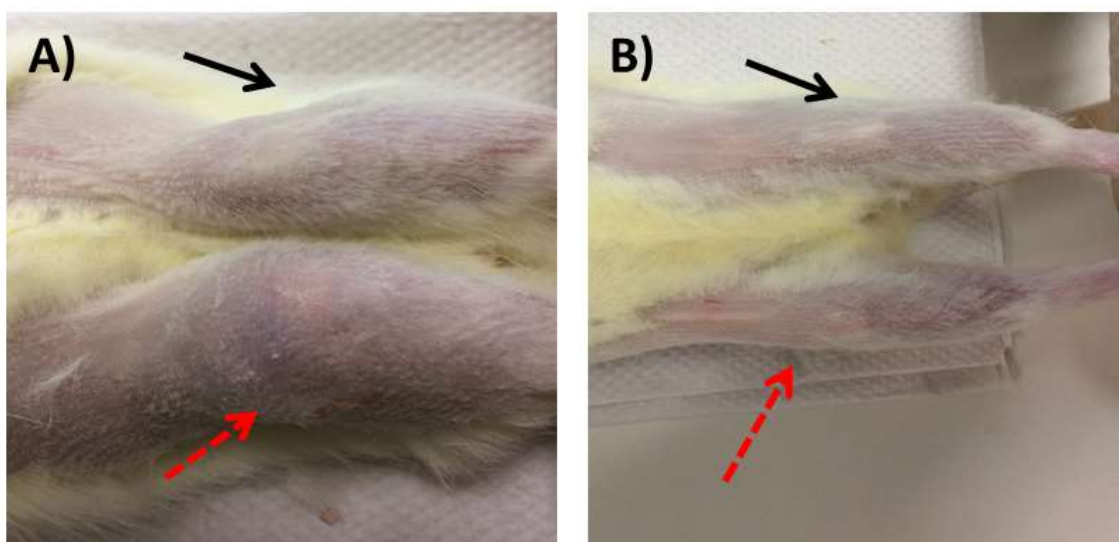


Figura 37: Fotografias da comparação entre o joelho sadio (seta preta) e do joelho com inflamação induzida (seta vermelha) após 7 dias pelas doses de 200 μL (A) e 100 μL (B) de ACF.

Após a coleta das amostras, a membrana sinovial, o menisco e os ossos (tíbia e fêmur) foram separados e encaminhados para análise por espectroscopia Raman.

Os espectros Raman foram obtidos de 10 diferentes pontos da membrana sinovial para obtenção de um espectro médio. A Figura 38 mostra os espectros médios do tecido controle (A), tecido com inflamação induzida por uma dose de 100 μL e 200 μL de ACF.

Na Figura 37, comparando-se o tecido controle (A) com o tecido com o tecido com inflamação induzida por 100 μL de ACF (B), nota-se que o espectro se mantém semelhante, porém com uma variância espectral maior, fato já observado em tecidos musculares inflamados em processo de reparo (da Silva, 2013; Gil, 2015).

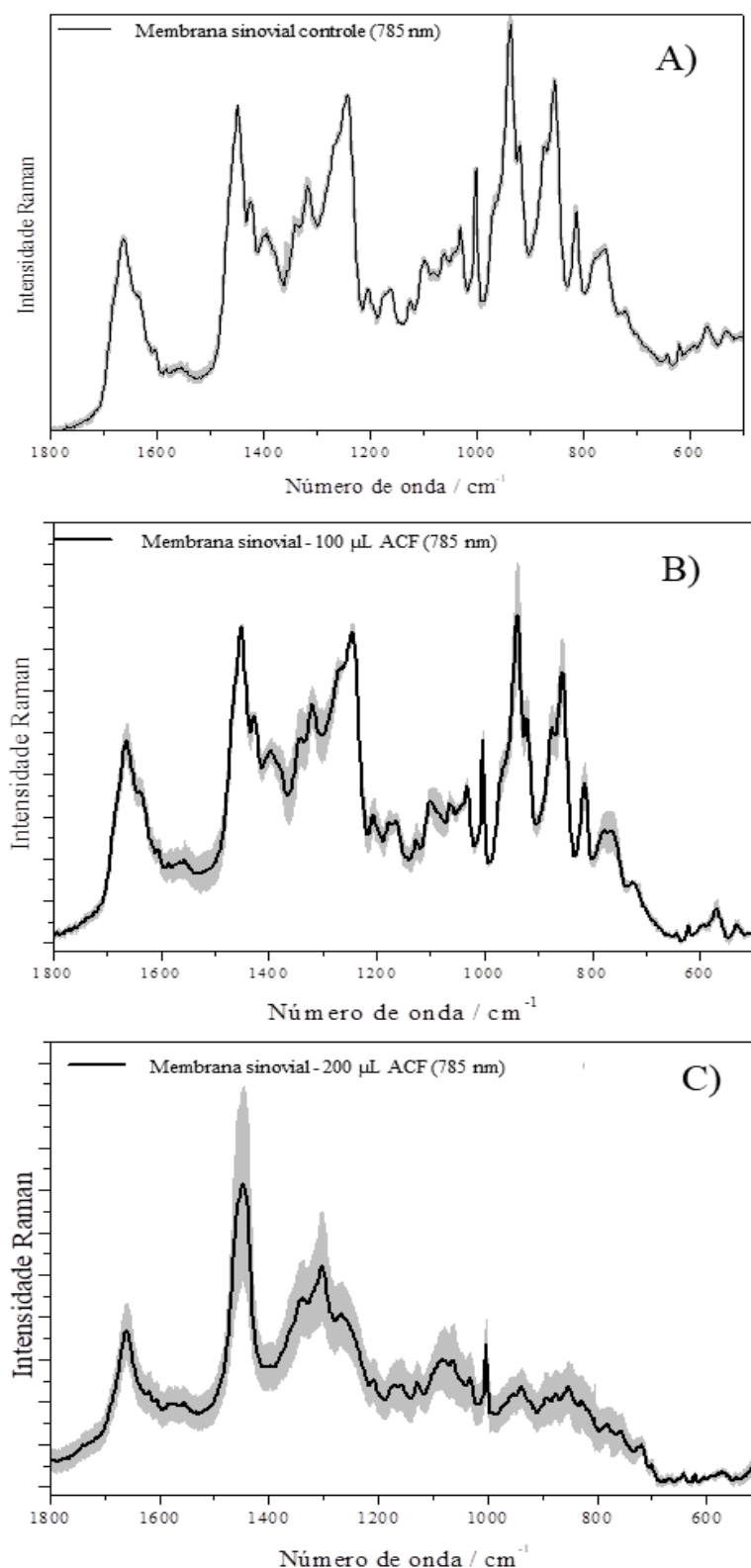


Figura 38: Espectro Raman médio obtido da membrana sinovial (preto) e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos do tecido controle (A), tecido com inflamação induzida por uma dose de 100 µL de ACF (B) e 200 µL de ACF (C).

Ainda na Figura 38, ao analisar os resultados tecido com inflamação induzida por 200 μL de ACF, (C), o padrão espectral médio é totalmente diferente das outras duas amostras (controle e 100 μL de ACF), apresentando apenas a banda em 1650 cm^{-1} de amida I (α -hélice), que se caracteriza por não apresentar o envelope convencional de bandas atribuídas às demais estruturas secundárias das proteínas (folhas- β e desordenadas em 1675 e 1685 cm^{-1}) (Adar, 2022), e as bandas em 1450 cm^{-1} atribuída a $\delta(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ e 1003 cm^{-1} atribuída a estiramentos de fenilalanina (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014). Além disso, nota-se uma variância espectral muito grande. Tais mudanças podem ser atribuídas ao intenso processo inflamatório local, o que gera a produção de diversas proteínas envolvidas neste processo como citocinas e quimiocinas além da infiltração de células do sistema imune.

Os espectros Raman foram obtidos de 10 diferentes pontos do menisco para obtenção de um espectro médio. A Figura 39 abaixo mostra os espectros médios do menisco controle (A), menisco com inflamação induzida por uma dose de 100 μL (B) e 200 μL (C) de ACF.

Na Figura 39, para o menisco, na comparação entre os espectros obtidos do tecido do animal controle (A) e do tecido do animal com inflamação articular induzida por 100 μL de ACF (B), utilizando a banda em 1450 cm^{-1} como referencia, nota-se o aumento considerável da variância espectral com alterações nas intensidades relativas das bandas encontradas na região de 1200 a 1400 cm^{-1} , atribuídas a amida III (Adar, 2022). Nota-se também uma diminuição da intensidade relativa do envelope de bandas de amida I em 1650 cm^{-1} , porém, o padrão espectral se mantém o mesmo. Já para o menisco com inflamação induzida por 200 μL de ACF (C), observa-se um padrão espectral semelhante, exceto pela região de amida III que apresenta um aumento significativo da intensidade das bandas localizadas em 1320 e 1343 cm^{-1} , atribuídas a deformações angulares CH_2 das cadeias de colágenos (Pavlou, *et al.*, 2018; Rieppo, *et al.*, 2017).

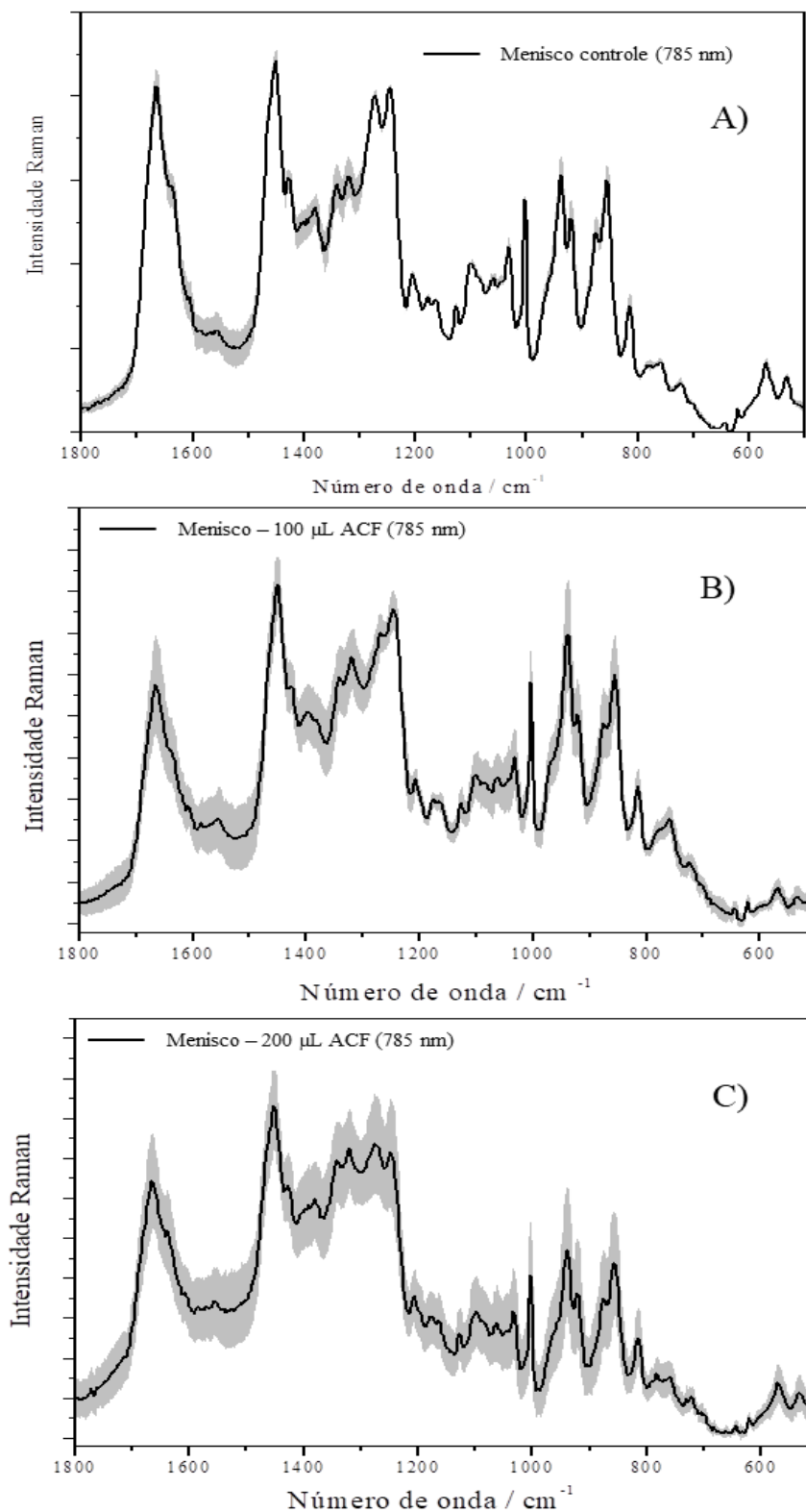


Figura 39: Espectro Raman médio obtido do menisco (preto) e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos do tecido controle (A), tecido com inflamação induzida por uma dose de 100 μL de ACF (B) e 200 μL de ACF (C).

Para os tecidos ósseos, tíbia e fêmur, foram obtidos os espectros Raman médio dos dois ossos encontrados a fim de se verificar sua integridade e realizar a comparação entre as doses de ACF administrada. As amostras foram devidamente limpas, para garantir que não haveria contribuição de material orgânico externo. Os espectros obtidos para os ossos controle e com inflamação induzida por 100 μL e 200 μL de ACF são mostrados na Figura 40.

Pela análise dos espectros médios dos tecidos ósseos mostrados na Figura 40, é possível localizar as bandas em 960 e 1075 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ e $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$, respectivamente e característicos da composição mineral (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014). Também se observam claramente as bandas em 855 e 877 cm^{-1} atribuídas à prolina e hidroxiprolina, além dos conjuntos de bandas em 1450 e 1655 cm^{-1} atribuídos a deformações angulares CH_2 e amida I, respectivamente, todas correspondentes à composição orgânica. Não foi possível observar grandes diferenças espectrais além do aumento da variância.

A fim de avaliar a relação entre quantidade de material orgânico e de matriz inorgânica, a razão entre as intensidades das bandas localizadas em 1450 e 960 cm^{-1} , I_{1450}/I_{960} , para o espectro médio do animal controle foi de $0,29 \pm 0,01$, enquanto que para o animal com inflamação induzida com 100 μL de ACF foi de $0,28 \pm 0,02$ e para o animal com dose de 200 μL de ACF igual a $0,30 \pm 0,01$. Tal análise mostra que o conteúdo de matéria orgânica não possui variação estatística considerável, tal resultado já era esperado já que o tecido ósseo é o último a ser afetado pela inflamação neste modelo (afetado após aproximadamente 28 dias, como sera visto adiante) e as amostras deste tecido foram obtidos após 7 dias do início do processo inflamatório.

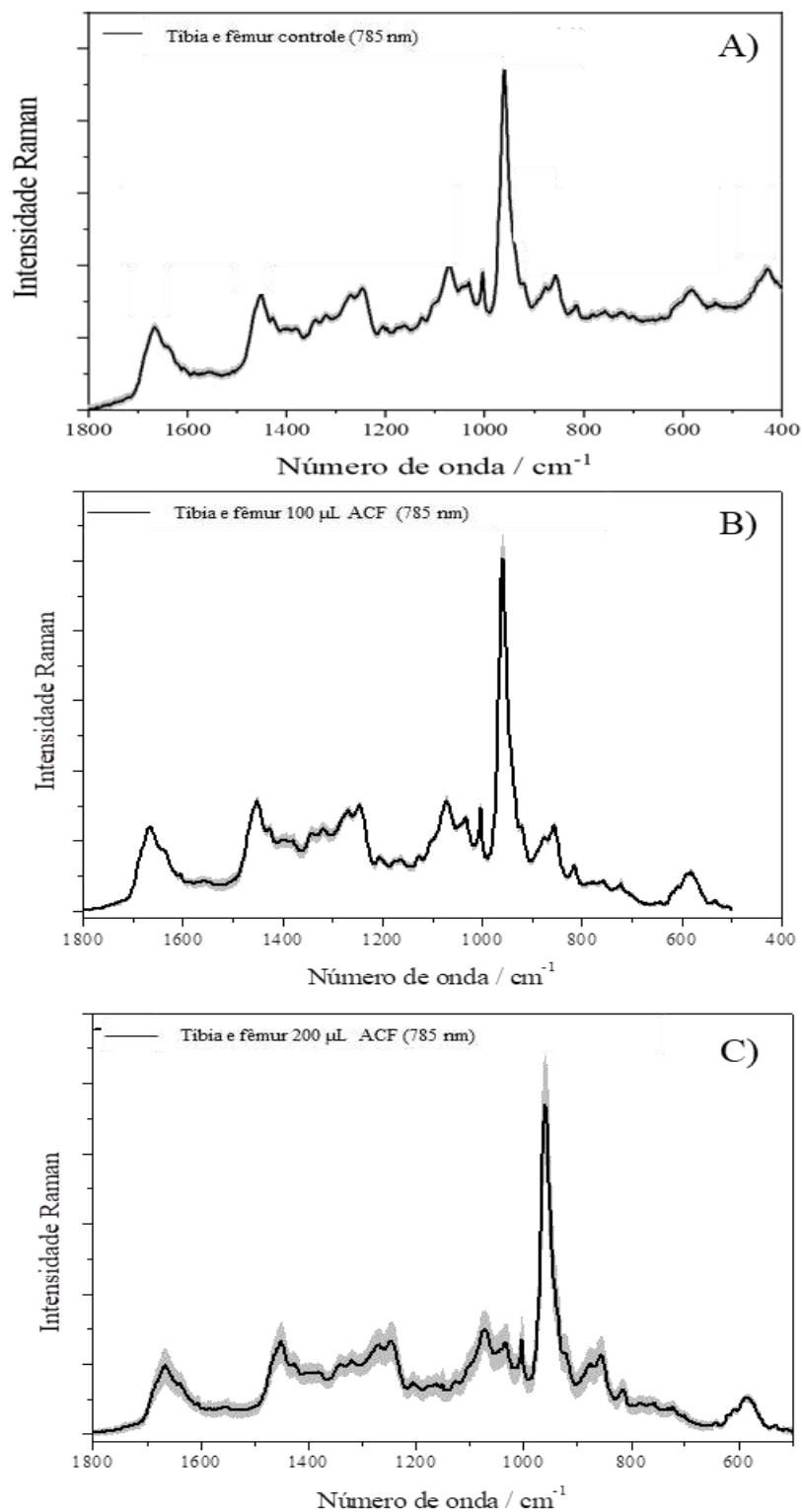


Figura 40: Espectro Raman médio obtido do côndilo do fêmur e da tibia (preto) e a sua respectiva variância (cinza), obtido com tratamento estatístico de 10 espectros em diferentes pontos do tecido ósseo controle (A), tecido ósseo com inflamação induzida por uma dose de 100 μL de ACF (B) e 200 μL de ACF (C).

Uma conclusão importante obtida por esses experimentos foi que a extensão do processo inflamatório quando o volume total da cápsula articular é preenchido com ACF (200 μ L) é muito intenso, gerando grande inchaço e modificando drasticamente as características espectrais dos tecidos moles da articulação, principalmente a membrana sinovial. Tal processo inflamatório pode gerar danos irreversíveis à articulação e, portanto, o tratamento não atingiria o objetivo desejado não pela ineficácia da matriz de LDH utilizada para liberação modificada do ibuprofeno, mas pela irreversibilidade dos danos. Dessa forma, foi padronizado que a dose de ACF utilizada em todos os experimentos deveria ser de 0,05 mL/100 g de massa do animal.

4.2.2.2. Análise da evolução temporal do processo inflamatório induzido por ACF para a membrana sinovial

Uma vez definida a dose de ACF de 0,05 mL/100 g de massa do animal, foram iniciados os experimentos para avaliação da evolução temporal do processo inflamatório por espectroscopia Raman a fim de se identificar bandas específicas que são indicativas da alteração da composição molecular do tecido.

Visando obter uma amostragem significativa de tais processos inflamatórios, definiu-se a coleta de amostras em estágios representativos para que as alterações espectrais fossem nítidas. Foram escolhidos os períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após a indução da inflamação por ACF.

Após 7 dias de indução da inflamação é esperado um processo inflamatório ainda muito intenso, no qual há migração de células de defesa como macrófagos e a liberação de proteínas, citosinas e quimiocinas (Neumann, *et al.*, 2010; Qu, *et al.*, 1994). No período de 14 dias o processo inflamatório deve estar reduzido com o tecido iniciando o processo de homeostase em que há o processo de proliferação celular a fim de se reparar os tecidos. Aos 21 dias o primeiro ciclo de proliferação celular deve apresentar-se em seu estágio final em que é esperado já a formação, em sua maioria, de novos tecidos conjuntivos para o reparo dos danos causados na região afetada. Aos 28 dias, o primeiro ciclo do reparo tecidual é finalizado e é seguido pelo remodelamento fino do tecido, estágio em que há o início da maturação de fibras colágenas, por exemplo (Medzhitov, 2008).

Como já evidenciado nos experimentos anteriores, o processo inflamatório induzido na cápsula articular apresenta-se muito complexo, visto que a inflamação afeta

inicialmente os tecidos moles em que há uma maior vascularização, o que possibilita a migração das células de defesa mais rapidamente. Desta forma a membrana sinovial além de ser o primeiro tecido afetado é também onde se deve encontrar o processo inflamatório mais intenso.

A seguir serão descritas, sequencialmente, as análises temporais do processo inflamatório induzido por ACF encontrados na membrana sinovial, no menisco e nos tecidos ósseos, tíbia e fêmur.

Os espectros Raman médios obtidos da membrana sinovial no períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de inflamação induzida são mostrados na Figura 41.

A partir dos espectros mostrados na Figura 41, junto com as respectivas análises de variância é possível notar uma grande modificação do perfil espectral que se inicia aos 7 dias, na região entre 1200 e 1380 cm^{-1} , região atribuída amida III, tal mudança sugerida utilizando a banda em 1450 cm^{-1} como referência, caracteriza-se principalmente pela diminuição da intensidade das bandas em 1240 e 1270 cm^{-1} , muito características deste tecido, e indica uma possível degradação ou desordem nas estruturas secundárias de amida III bem como a denaturação dos glicosaminoglicanos, GAGs, também presentes na composição deste tecido. Nota-se também que há uma tendência de aumento da banda em 1240 cm^{-1} a partir do período de 21 dias de inflamação, que sugere o início de uma regeneração do tecido. Vale ressaltar que as modificações observadas para amida III também podem ser evidenciadas quando se analisa a região de amida I em 1650 cm^{-1} .

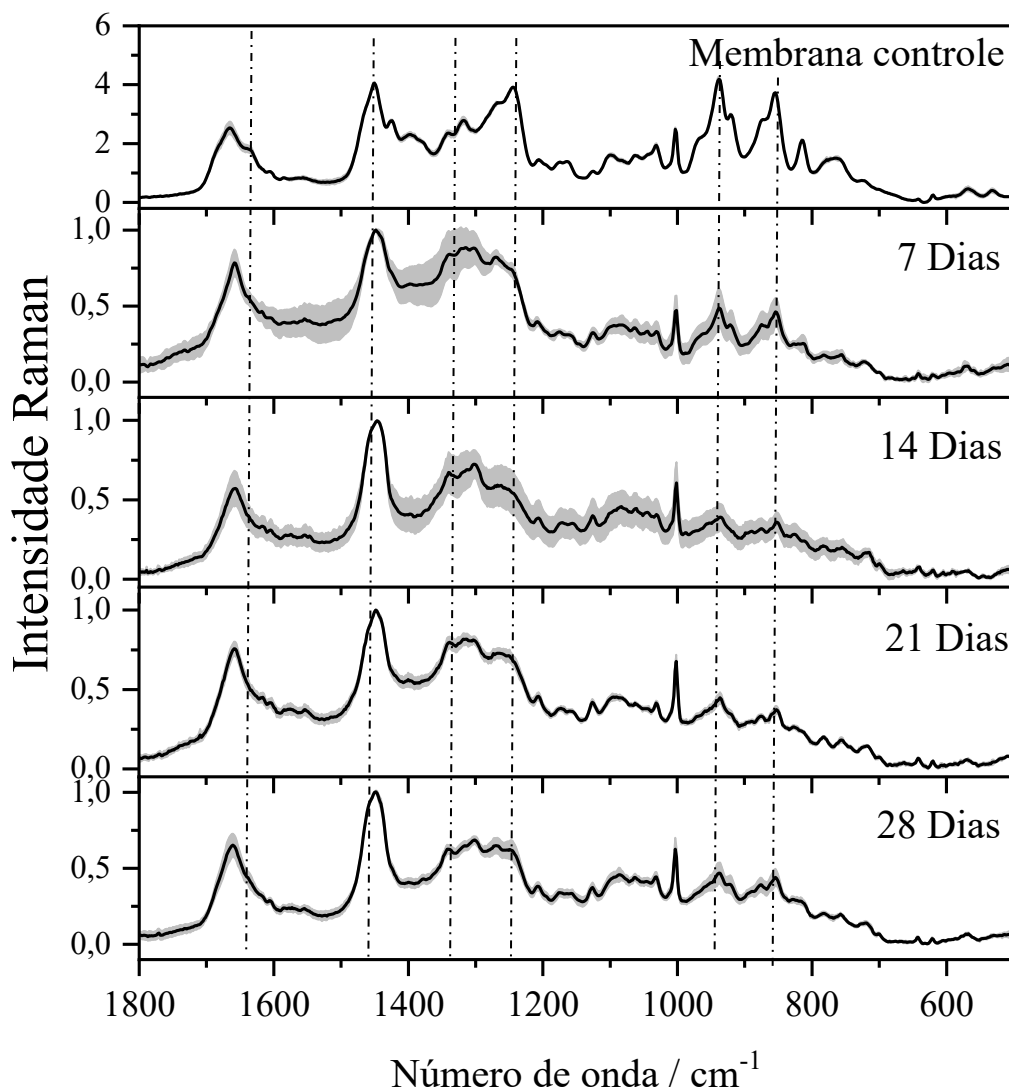


Figura 41: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. As linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.

Ainda analisando as bandas referentes à estrutura secundária das proteínas envolvidas, nota-se em 1634 cm^{-1} a diminuição da intensidade da banda atribuída à amida I em conformação α -hélice de colágenos (Talari, *et al.*, 2014), sugerindo um decréscimo da presença dos colágenos presentes inicialmente em sua composição. Tal constatação se confirma quando as bandas localizadas em 855 e 918 cm^{-1} que são atribuídas ao aminoácido prolina e em 872 e 937 cm^{-1} atribuídas à sua forma hidroxilada, a hidroxiprolina, tem também sua intensidade diminuída relativa à banda em 1450 cm^{-1} , tendo seu mínimo atingido aos 21 dias de inflamação. Após esse período

nota-se um ligeiro aumento na intensidade dessas bandas evidenciando a tendência já sugerida de regeneração tecidual, neste caso especificamente das fibras colágenas. A Figura 42 mostra os espectros Raman da evolução do processo inflamatório da membrana sinovial nas regiões de 1800 a 1550 cm^{-1} e 1050 a 800 cm^{-1} a fim de detalhar as proposições feitas acima.

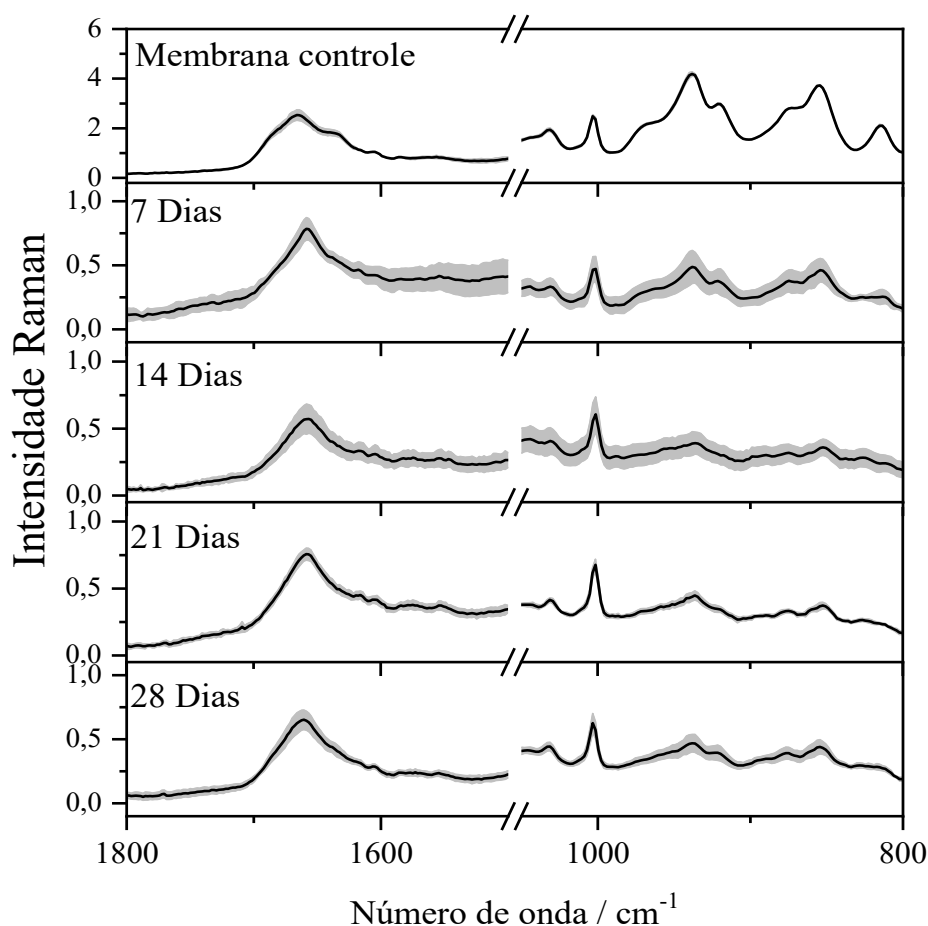


Figura 42: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório nas regiões de 1800 a 1550 cm^{-1} e 1050 a 800 cm^{-1} .

Outra análise importante a respeito dos espectros da membrana sinovial é a composição da banda encontrada em 1450 cm^{-1} atribuída a deformações angulares de grupos CH_2CH_3 , que no decorrer do processo inflamatório perde seu perfil espectral característico, tal observação permite propor que além da diminuição dos colágenos, já evidenciado pelas bandas de prolina e hidroxiprolina e também pelo desaparecimento da banda em 1427 cm^{-1} atribuída a deformações angulares $\delta(\text{N-H})$ (Talari, *et al.*, 2014), há a presença de outros componentes biológicos na membrana, como as citocinas e

macrófagos, que devem contribuir majoritariamente para essa mudança de perfil espectral, o que pode ter também influenciado nas mudanças das conformações dos envelopes de bandas atribuídos a amida I e III. Por se tratar de um processo inflamatório agudo, observa-se que tal mudança é persistente, mantendo-se até os 28 dias de inflamação. A Figura 43 mostra os espectros Raman da região de 1500 a 950 cm^{-1} para melhor visualização.

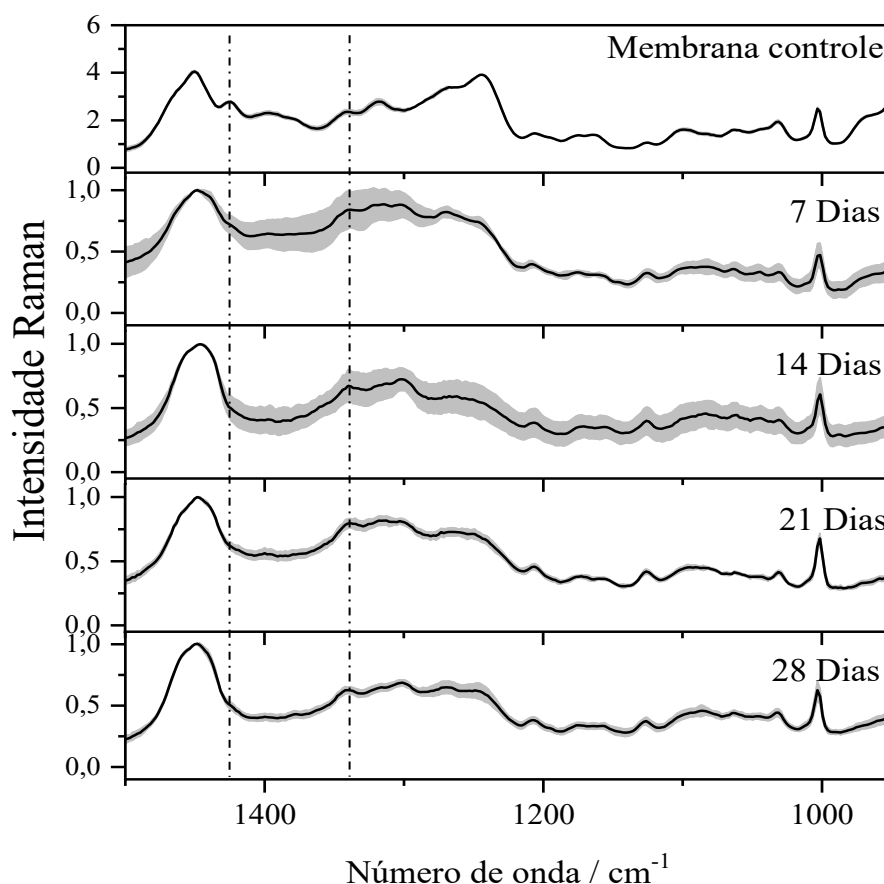


Figura 43: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório na região 1500 a 950 cm^{-1} .

Pode-se propor então que a mudança espectral observada é causada pela alta presença de macrófagos e monócitos que desorganizam a estrutura inicial das camadas celulares da membrana gerando uma hiperplasia local. A presença de monócitos pode ser confirmada pelo um aumento da banda encontrada 1320 cm^{-1} (Zinin, *et al.*, 2010) que também apresenta uma variância espectral elevada aos 7 e 14 dias devido a

presença dessas células e a heterogeneidade da composição do tecido. Tal hiperplasia é seguida de uma alta liberação de matriz extracelular devido a atividade metabólica das células de defesa, responsáveis por inchaço local e causando dor ao organismo (Neumann, *et al.*, 2010; Qu, *et al.*, 1994).

4.2.2.3. Análise da evolução temporal do processo inflamatório induzido por ACF para o menisco

Assim como para a membrana sinovial, foram obtidos os espectros médios do menisco nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de inflamação induzida por ACF que são mostrados na Figura 44.

Como mostra a Figura 44, há uma variação considerável das intensidades, ao longo do tempo, das bandas em 855 e 918 cm^{-1} e em 872 e 937 cm^{-1} , atribuídas a prolina e hidroxiprolina de colágenos. Nota-se uma diminuição relativa, utilizando a banda em 1003 cm^{-1} da fenilalanina como referencial, da intensidade dessas bandas até os 14 dias de inflamação e um aumento nos demais períodos.

O mesmo comportamento se observa para a banda em 1340 cm^{-1} , atribuída a deformações angulares $\delta(\text{N-H})$ de colágenos. Dessa forma, aliando as informações conhecidas sobre a atividade metabólica dos condrócitos que compõem a cartilagem articular durante o processo inflamatório, pode-se afirmar que a partir dos 14 dias de inflamação tal atividade metabólica é consideravelmente aumentada, confirmada pelo aumento dos sinais atribuídos a colágenos. Porém, sabe-se que na cronologia do processo inflamatório, após essa etapa de alta produção sintética de matriz extracelular pelos condrócitos, essas células deformam a superfície da cartilagem expondo seu interior e iniciando um processo de degradação das fibras colágenas, fato este que não foi observado. Sabendo disso, pode-se concluir que neste modelo inflamatório, apesar de sua resposta muito intensa inicialmente, os 28 dias de estudo não são suficientes para que haja o início do processo de degeneração tecidual da cartilagem articular.

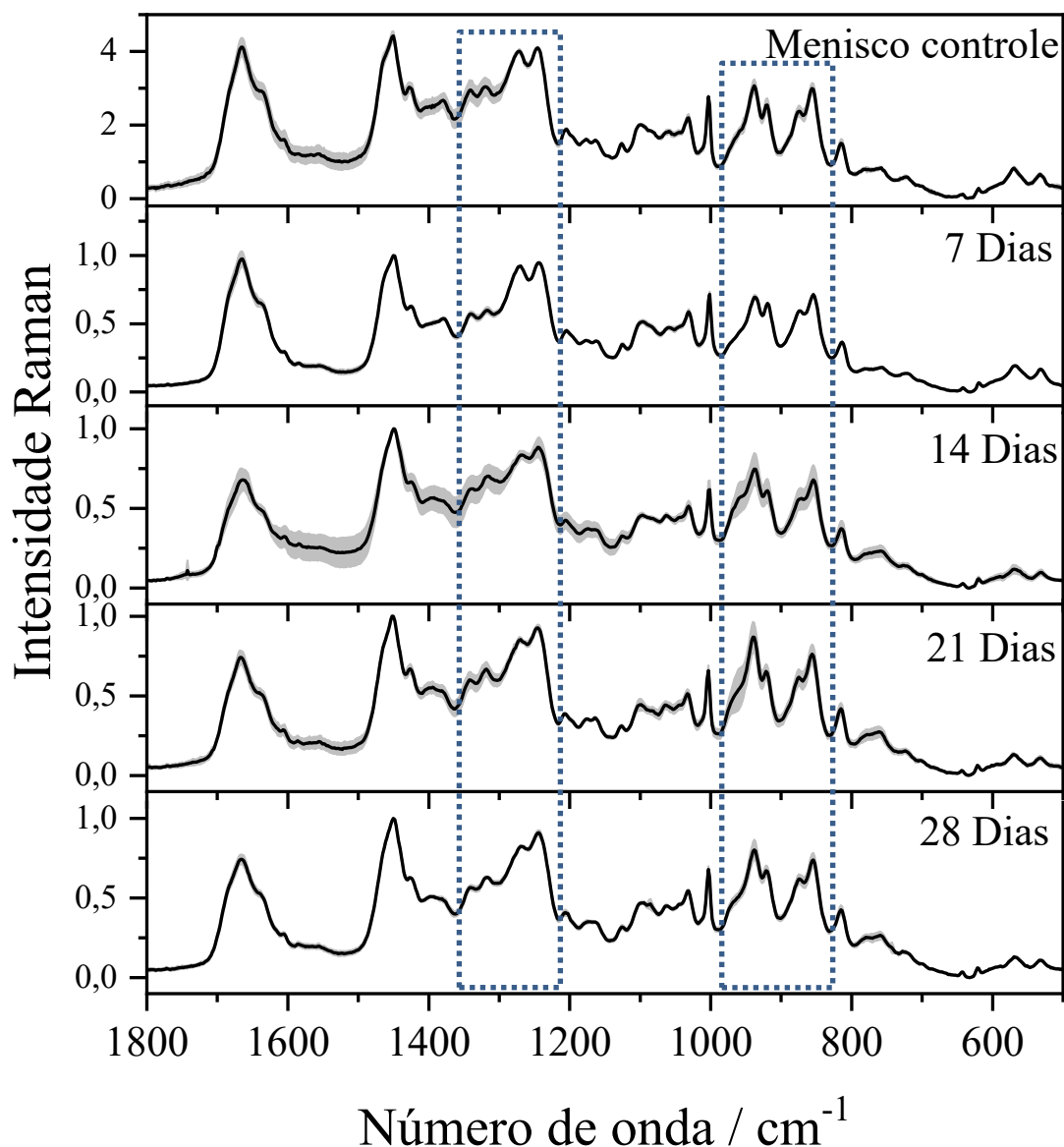


Figura 44: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da menisco controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. As áreas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.

4.2.2.4. Análise da evolução temporal do processo inflamatório induzido por ACF nos tecidos ósseos

Os espectros médios da tíbia e do fêmur em diferentes estágios do processo inflamatório induzido são mostrados nas Figuras 45 e 46, respectivamente.

Pela análise dos espectros médios de controles mostrados nas Figuras 45 e 46, nota-se que o padrão espectral se mantém o mesmo para os dois ossos estudados, tendo

apenas a variância espectral alterada para o fêmur, principalmente nas bandas referentes ao conteúdo proteico do tecido (Amida I em 1650 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ em 1450 cm^{-1} e Amida III de 1200 a 1380 cm^{-1}).

Ao acompanhar temporalmente a evolução do processo inflamatório nos dois tecidos ósseos estudados, nota-se que aos 7 dias de inflamação o conjunto de bandas na região de 1200 a 1380 cm^{-1} atribuídas à amida III sofre uma grande alteração de forma, quando comparado ao grupo control devido ao aumento do conjunto de bandas na região de 1300 a 1380 cm^{-1} . É possível observar também aos 7 dias que a variância espectral fica bastante evidente comparativamente aos demais períodos. Nota-se também que as bandas relacionadas aos aminoácidos prolina e hidroxiprolina de colágenos, 855 e 872 cm^{-1} , respectivamente, têm sua intensidade aumentada a partir dos 21 dias de processo inflamatório. Não foram observadas alterações significativas frente a composição mineral do tecido.

É possível sugerir que, assim como para o tecido cartilagino, há um aumento da função sintética dos condrócitos localizados na camada mais externa dos ossos analisados, camada não mineralizada, induzida pelo processo inflamatório. Comparativamente ao que foi observado para o tecido cartilaginoso, esse processo é observado nos ossos apenas a partir dos 21 dias de inflamação, enquanto que no menisco foi observado aos 14 dias. Assim, conclui-se que o tecido ósseo foi afetado durante o esse período da inflamação aguda, porém, em escala muito menor quando comparado aos outros tecidos (membrana e cartilagens) estudados.

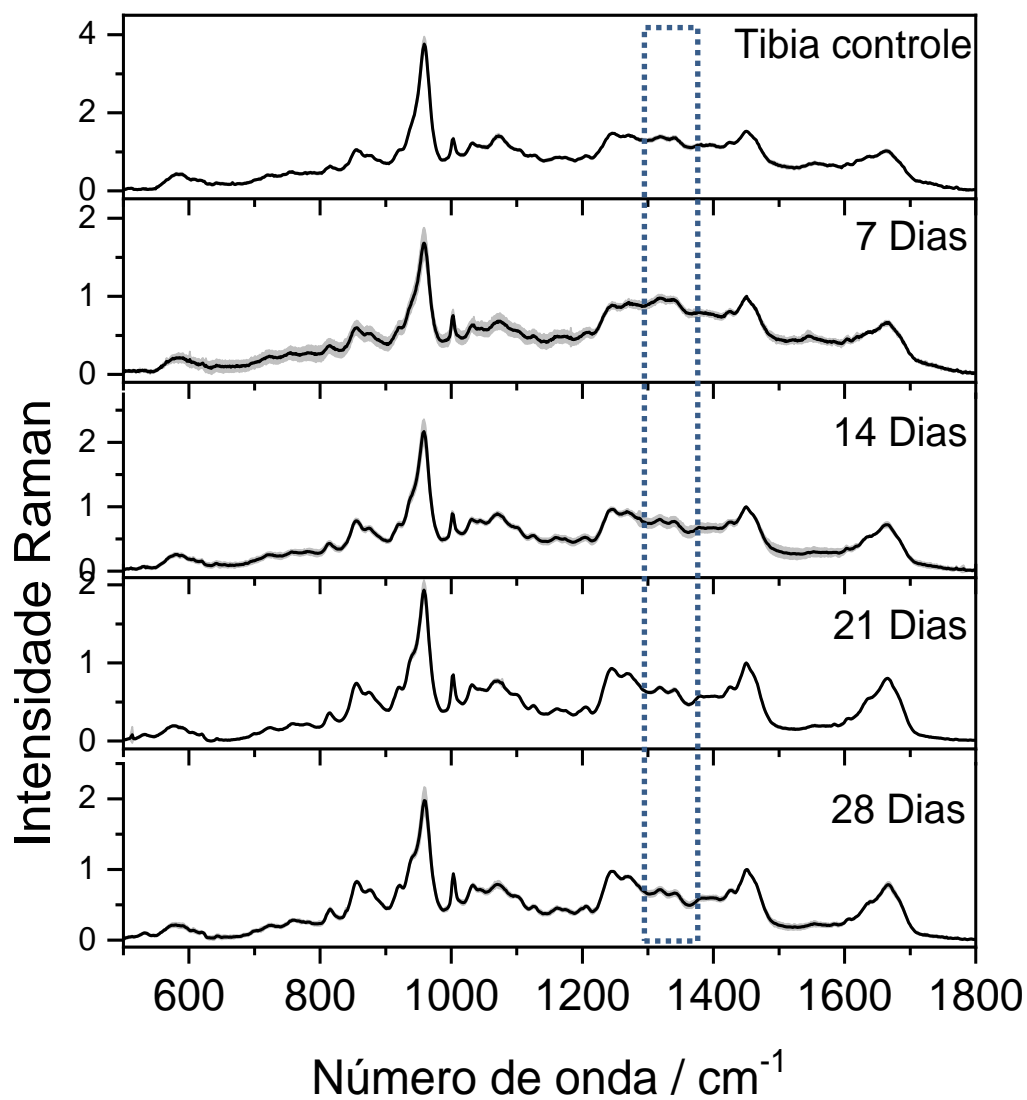


Figura 45: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da tíbia controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. A área tracejada evidencia a região de maior mudança espectral.

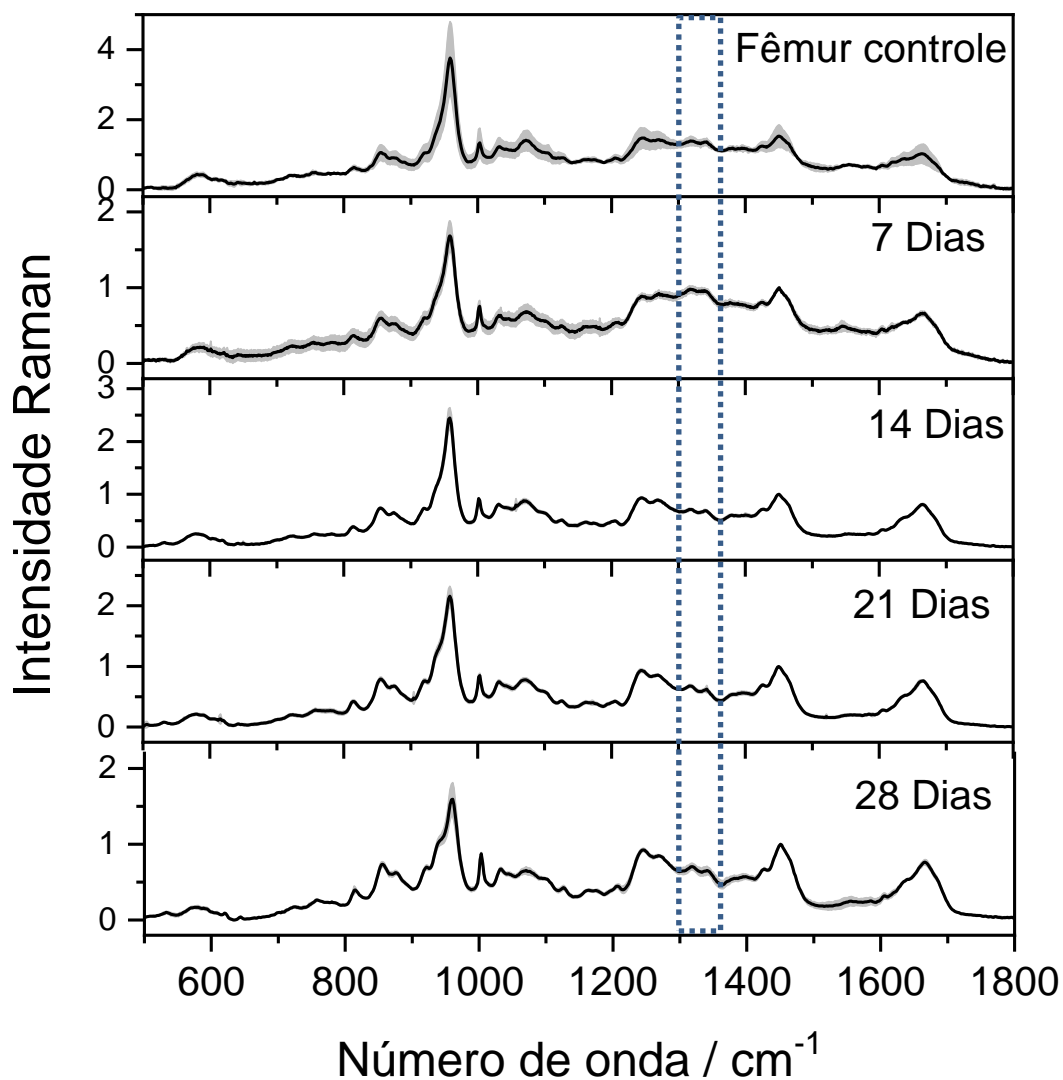


Figura 46: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos do fêmur controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório. A área tracejada evidencia a região de maior mudança espectral.

4.2.2.5. Análise da evolução do processo inflamatório na membrana sinovial induzido por ACF e tratado com LDH-Ibup

Para os estudos apresentados nesta sessão, foram utilizadas as matrizes de LDH-Ibup previamente esterilizadas por radiação ionizante. Para cada administração, foram utilizados 65,0 mg de LDH-Ibup em pó, equivalente a 30 mg de ibuprofeno, suspensas em aproximadamente 100 μ L de ACF. Tal suspensão foi diretamente injetada na

articulação do joelho dos animais e as amostras foram coletadas após 7, 14, 21 e 28 dias.

A seguir são mostrados os espectros Raman médios obtidos da membrana sinovial sob indução inflamatória e tratamento com LDH-Ibup, Figura 47.

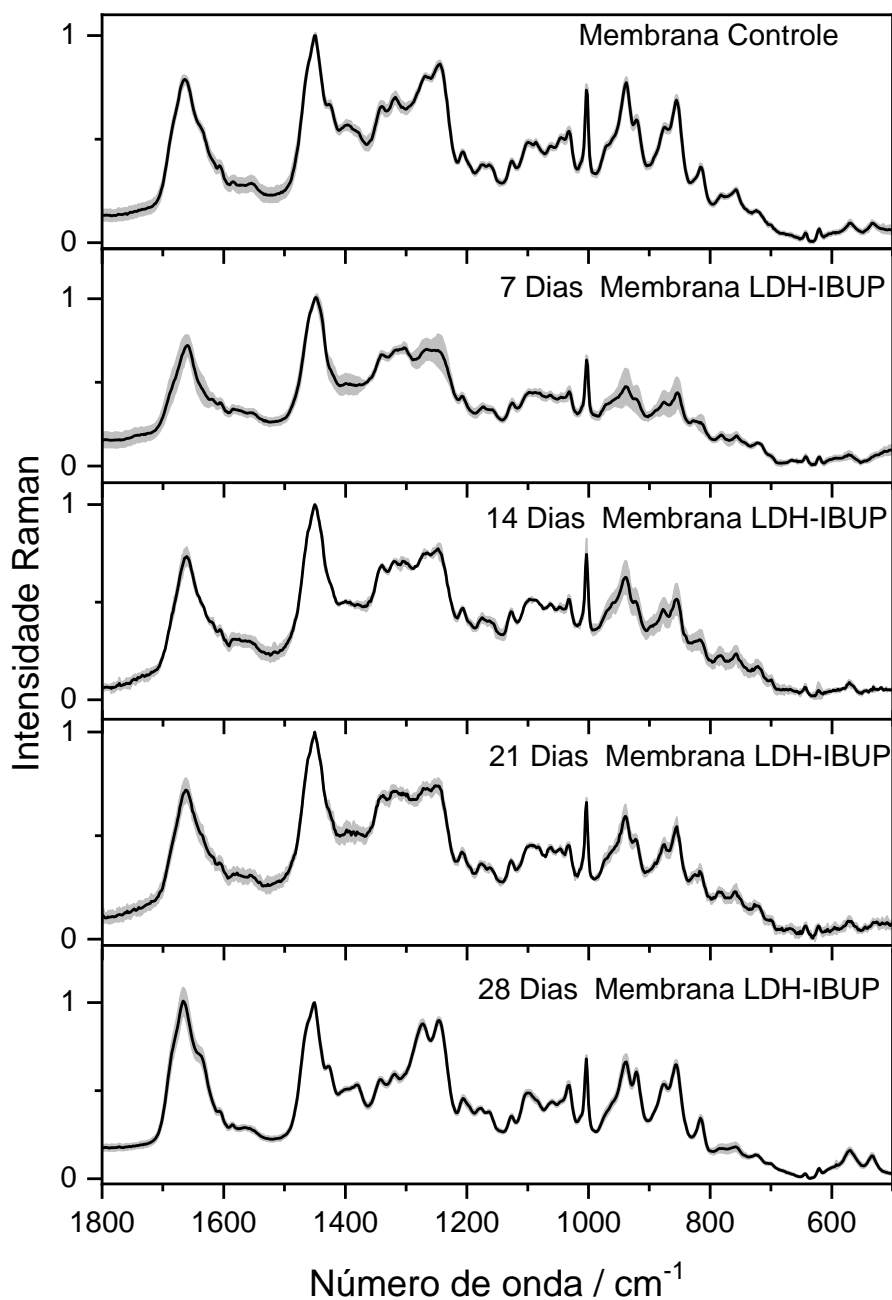


Figura 47: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da membrana sinovial controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório e tratamento com LDH-Ibup.

Ao se comparar temporalmente os espectros da membrana sinovial inflamada controle, Figura 41, com os espectros da mesma membrana tratada com LDH-Ibup, Figura 47, fica nítido que o material utilizado como tratamento possui um efeito benéfico ao tecido, principalmente quando se analisa a região entre 1200 e 1400 cm^{-1} atribuída à amida III. Especialmente focando nas variações da intensidade das bandas em 1240 e 1270 cm^{-1} atribuídas a amida III e GAGs, respectivamente, aos 7 dias de inflamação há nos dois sistemas comparados uma diminuição na intensidade dessas bandas no tecido que recebeu o tratamento com LDH-Ibup, o que evidencia que o processo inflamatório causa inicialmente a desordem nas estruturas secundárias de amida III bem como a denaturação dos glicosaminoglicanos. Nota-se pela Figura 47 que a partir dos 14 dias de inflamação tratada, as mesmas bandas iniciam um processo de aumento de intensidade, mostrando uma tendência de retorno às características do tecido controle, o que não ocorre quando o LDH-Iup não é administrado, fato este que pode ser diretamente associado à diminuição e controle do processo inflamatório.

Além disso, é possível comparar a intensidade das bandas de prolina e hidroxiprolina, 855 e 937 cm^{-1} , respectivamente, com a banda em 1003 cm^{-1} atribuída à fenilalanina, mostrando que tais bandas perdem significativamente suas intensidades aos 7 dias de inflamação, período inflamatório mais intenso, seguido também de aumento e retorno às condições similares às iniciais. Tal observação sugere fortemente que, de acordo com a proposta acima, há o controle do processo inflamatório.

É possível notar também que as mesmas bandas citadas acima, 855 e 937 cm^{-1} , apresentam uma melhora de sua definição aos 28 dias, sugerindo também que há a formação de novas fibras colágenas. Tal constatação aliada ao surgimento de uma banda em 1634 cm^{-1} , que é diretamente atribuída a presença dessas fibras, fortalece a proposta.

Estudos *in vivo* que utilizaram as mesmas matrizes de LDH de zinco e alumínio no reparo tecidual de músculos de rato mostraram uma indução local de fibras colágenas do tipo III, assim mostra-se que os dados obtidos neste trabalho concordam com experimentos da literatura (Cunha, *et al.*, 2016; Gil, *et al.*, 2015; Gil, *et al.*, 2016).

4.2.2.6. Análise da evolução do processo inflamatório no menisco induzido por ACF e tratados com LDH-Ibup

De modo análogo à análise feita para o processo inflamatório da membrana sinovial com inflamação induzida e tratada com LDH-Ibup, compararam-se os espectros

médios obtidos do menisco com inflamação induzida por ACF e dos tecido com inflamação induzida e tratada com LDH-Ibup. Os espectros Raman médios da evolução temporal da inflamação induzida e tratada com LDH-Ibup do menisco são mostrados na Figura 48.

Assim como descrito anteriormente na análise da evolução temporal do menisco inflamado por ACF, Figura 44, poucas modificações são observadas para a inflamação induzida e tratada. Há uma variação de intensidades do conjunto de bandas em 855 e 918 cm^{-1} e em 872 e 937 cm^{-1} atribuídas a prolina e hidroxipolina, respectivamente, de fibras colágenas e também da banda em 1340 cm^{-1} , atribuída a deformações angulares $\delta(\text{N-H})$ também desses colágenos. Essas variações acontecem seguindo o mesmo comportamento observado anteriormente, sendo diminuídas até os 14 dias de inflamação e em seguida apresentando uma tendência de retorno à condição inicial.

Desta forma, pode-se entender que o tratamento com LDH-Ibup pouco modificou as respostas imunológicas do no tecido cartilaginoso no período estudado. Vale ressaltar que como proposto anteriormente, talvez 28 dias de análise não seja tempo suficiente para que grandes modificações estruturais ocorram.

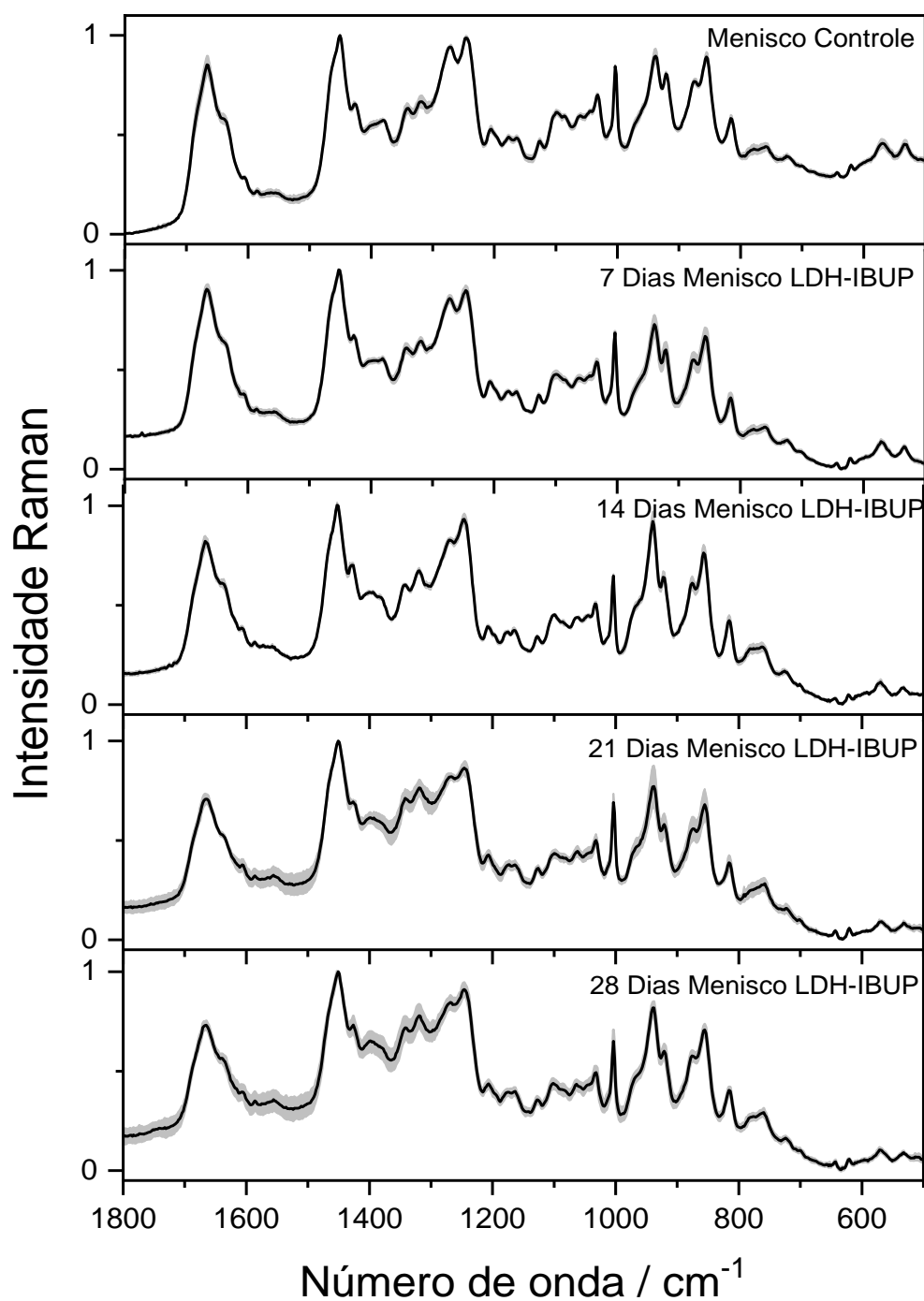


Figura 48: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos do menisco controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório e tratamento com LDH-Ibup

4.2.2.7. Análise da evolução do processo inflamatório na tíbia e fêmur induzido por ACF e tratados com LDH-Ibup

Os espectros médios do fêmur e da tíbia em diferentes estágios do processo inflamatório induzido e tratado com LDH-Ibup são mostrados nas Figuras 49 e 50, respectivamente.

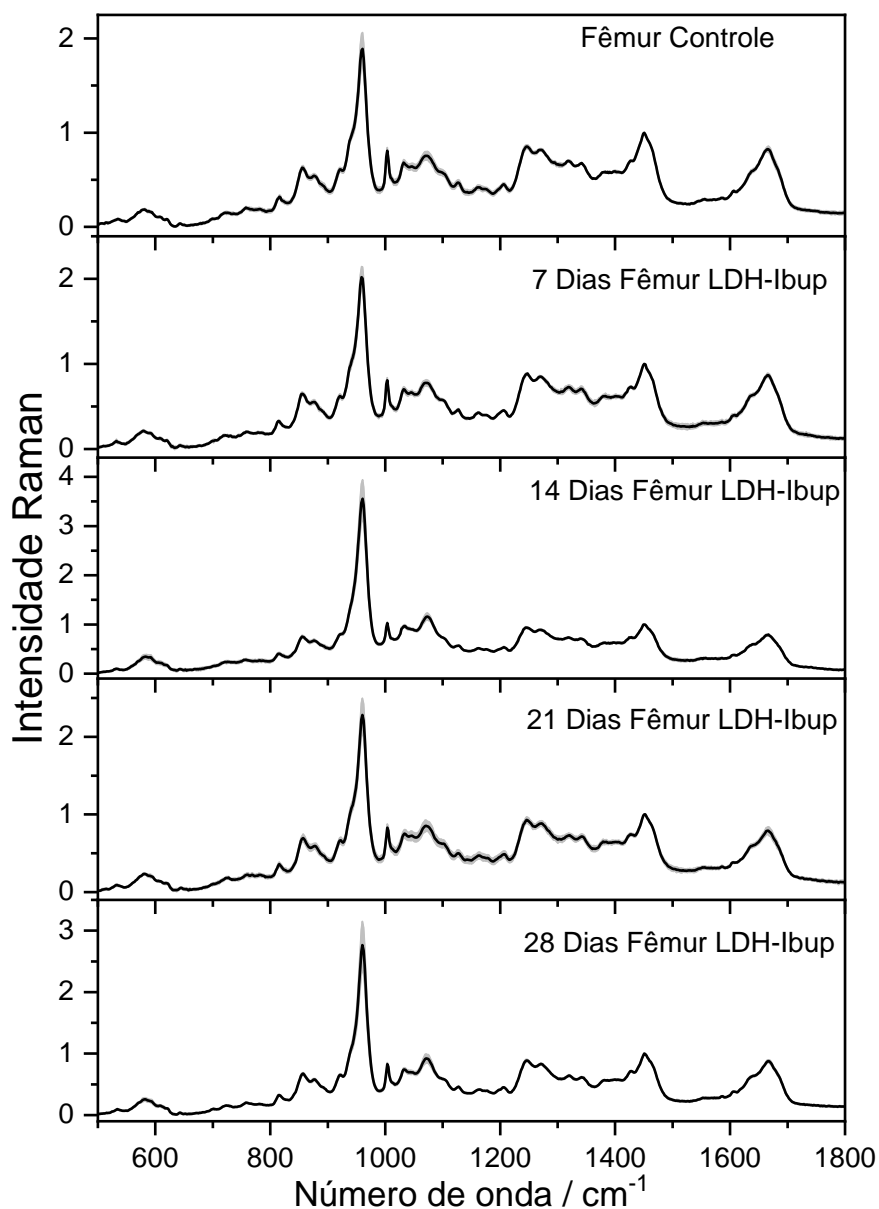


Figura 49: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos do fêmur controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório por ACF e tratamento com LDH-Ibup.

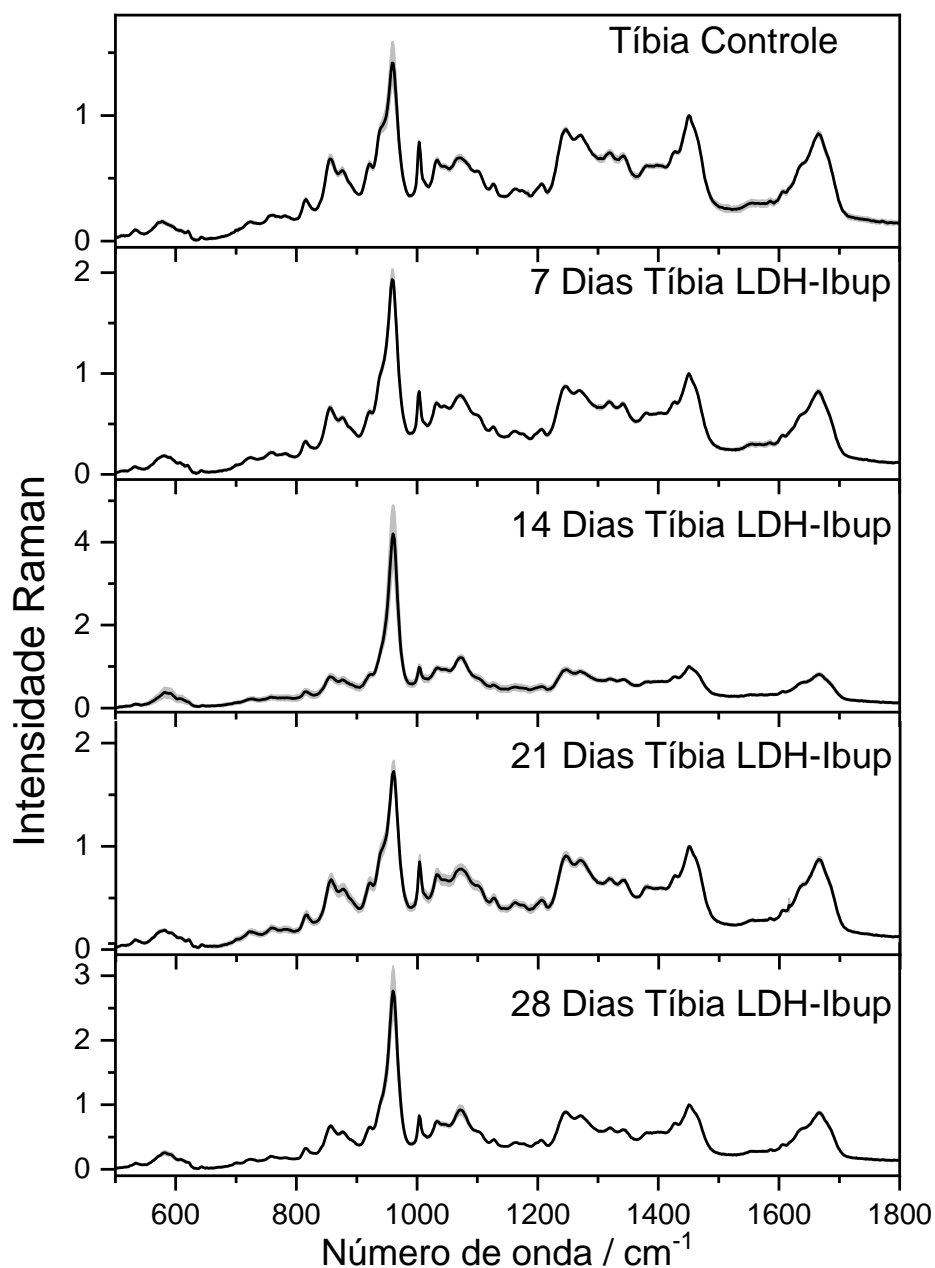


Figura 50: Espectro Raman médio (preto) e suas respectivas variâncias (cinza) obtidos da tíbia controle e em diferentes períodos após a indução do processo inflamatório por ACF e tratamento com LDH-Ibup

Assim como discutido para o tecido cartilaginoso, menisco, não foram observadas grandes mudanças de perfil espectral dos ossos articulares sob inflamação induzida e inflamação induzida, Figuras 45 e 46, e os ossos com tratamento de LDH-Ibup, Figuras 49 e 50. O mesmo comportamento citado anteriormente é visto para os

ossos sob tratamento de LDH-Ibup; observa-se uma diminuição das bandas atribuídas a componentes orgânicos aos 14 dias de inflamação e um aumento dessas mesmas bandas nos períodos seguintes, 21 e 28 dias.

Tal aumento de conteúdo orgânico neste sistema, se torna um ponto nebuloso para propostas, pois como sugerido anteriormente, pode ser devido ao aumento da função sintética dos condrócitos da camada não-mineralizada dos ossos induzido por sinalizações pró-inflamatórias como pode ocorrer em função da presença da matriz de LDH-Ibup. Desta forma, a análise histológica destes tecidos é um fator crucial para a proposição de uma explicação para os fatos observados.

4.2.2.8. Análises histomorfológicas dos tecidos da articulação

Foram utilizadas as técnicas histológicas de Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picrosirius Red. A técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E) é uma das técnicas de coloração mais amplamente utilizadas em análises histológicas e citopatológicas. Ela envolve o uso de dois corantes, a hematoxilina, que é um corante azul-violeta e a eosina, que é um corante vermelho. A hematoxilina cora principalmente os núcleos celulares, enquanto a eosina cora principalmente as proteínas do citoplasma das células. O resultado é a produção de imagens detalhadas das células com contraste claro entre os componentes celulares, tornando possível a identificação de características estruturais importantes, como o tamanho, forma e organização das células. Além disso, a H&E é útil para diferenciar tipos de tecidos e para identificar processos patológicos, como o crescimento ou degradação celular (Chan, 2014; Junqueira e Carneiro, 2008; Tolosa, *et al.*, 2003).

A técnica de Picrosirius Red é uma técnica de coloração utilizada para visualizar fibras colágenas em amostras de tecido. Ela se baseia na birrefringência do tecido corado em relação à luz polarizada. O corante Picrosirius Red é aplicado à amostra de tecido, que é então examinado sob luz polarizada. O resultado é a produção de imagens que mostram as fibras colágenas com diferentes gradações de coloração vermelha, dependendo da sua orientação frente à luz polarizada. Isso permite a diferenciação das fibras colágenas do tipo I, que são altamente birrefringentes e de coloração avermelhada, das fibras colágenas do tipo III, que são também birrefringentes e apresentam coloração esverdeada. Esta técnica é amplamente utilizada em estudos da estrutura e da organização do tecido conjuntivo, incluindo tecidos musculoesqueléticos,

tecidos de suporte e tecidos vasculares (Bernardes Coelho, *et al.*, 2018; López De Padilla, *et al.*, 2021).

São mostradas nas Figuras 51, 52 e 53 as fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação utilizando a técnica H&E.

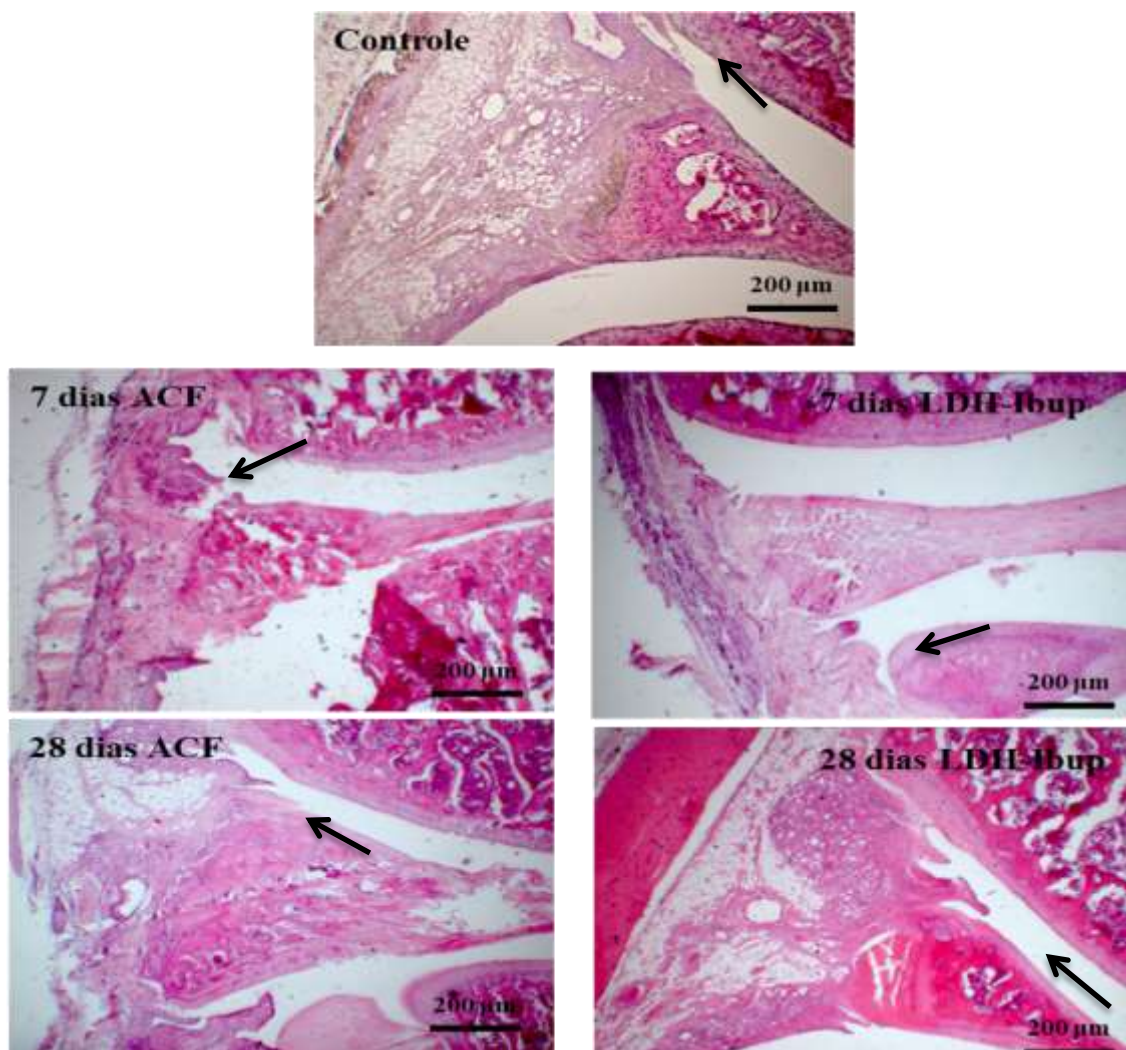


Figura 51: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação. À esquerda são mostradas as articulações de joelho com inflamação induzida por ACF e à direita as articulações com inflamação induzida por ACF e tratadas com LDH-Ibup, com aumento de 4x. As setas em preto indicam regiões de maiores modificações. Coloração por H&E.

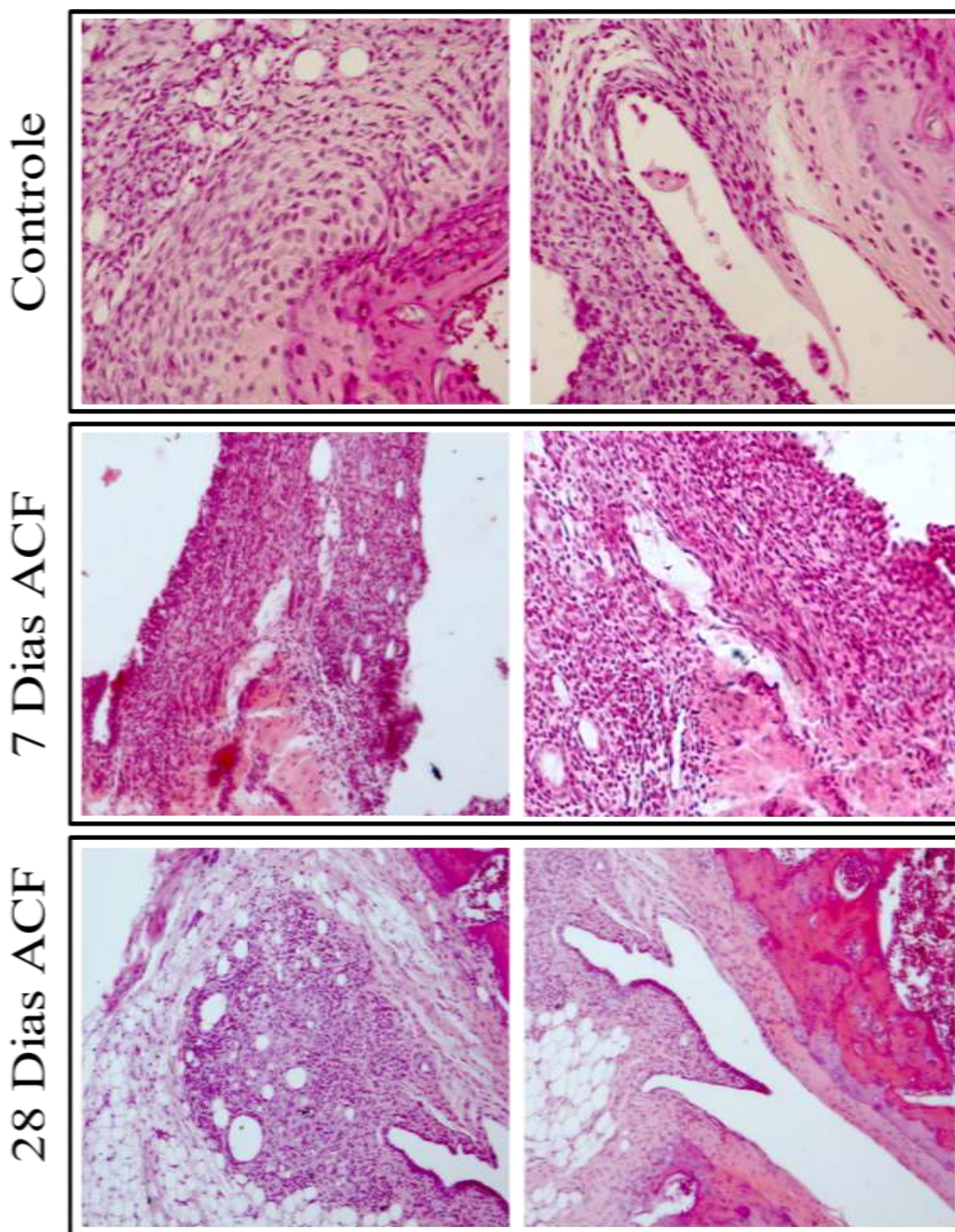


Figura 52: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação das regiões das articulações de joelho com inflamação induzida por ACF. Coloração por H&E.

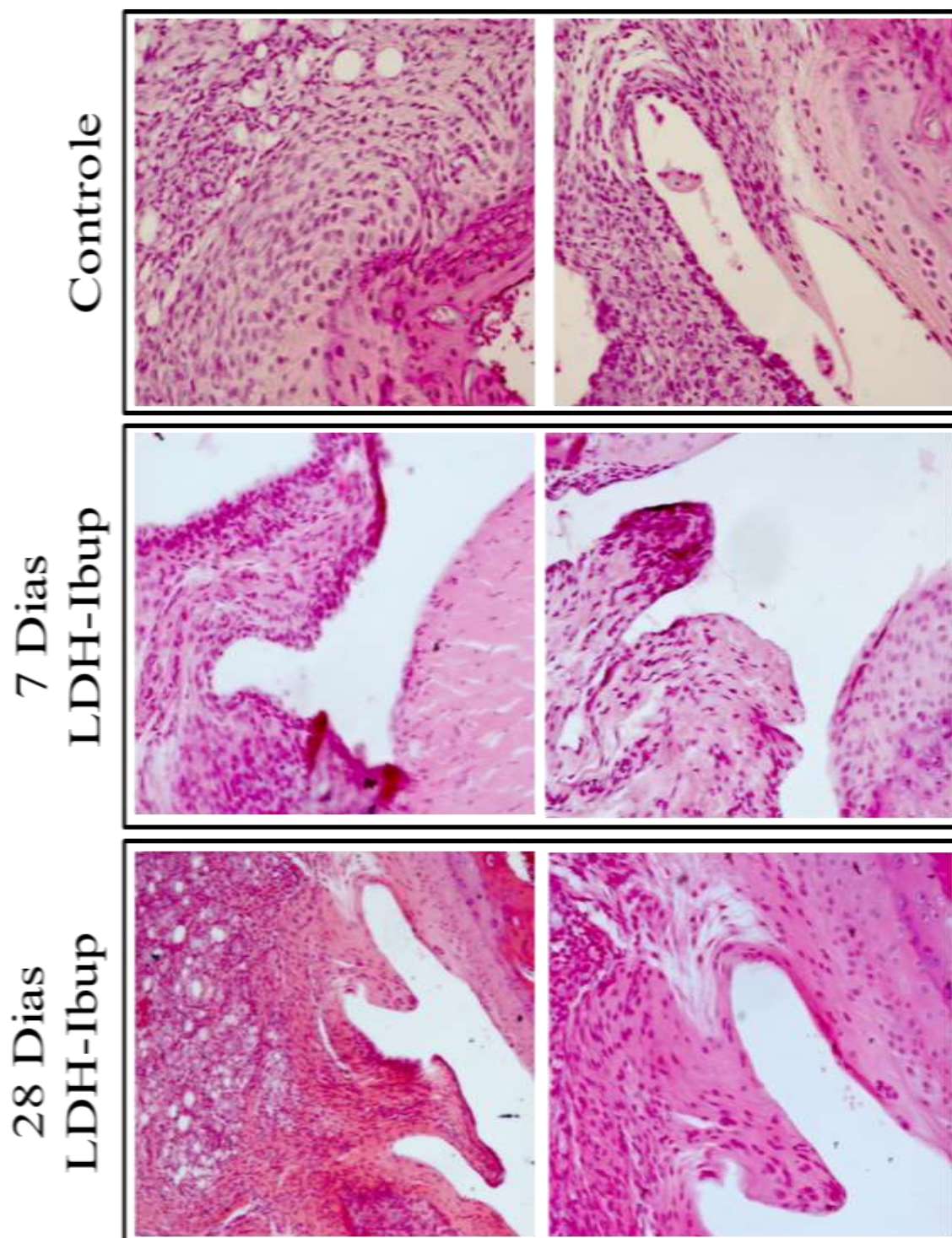


Figura 53: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação das regiões das articulações de joelho com inflamação induzida por ACF e tratadas com LDH-Ibup. Coloração por H&E.

Ao se analisar as fotos mostradas na Figura 51, nota-se, nas regiões da membrana sinovial evidenciadas pelas setas pretas contínuas e que são exibidas em

detalhes nas Figuras 52 e 53, que quando comparadas ao tecido controle os dois sistemas de inflamação induzida, ACF e ACF com LDH-Ibup, há uma hiperplasia da membrana sinovial, porém tal hiperplasia é diferenciada entre os dois sistemas.

Na inflamação induzida por ACF e sem tratamento, Figuras 51 e 52, há a presença inicialmente, 7 dias, de muitos núcleos celulares que pelo seu formato arredondado são atribuídos à macrófagos e leucócitos, evidenciando a reação inflamatória intensa. Aos 28 dias, ainda são encontrados muitos núcleos celulares na região hiperplásica, nota-se também uma região extrema à cápsula articular com a formação de um grande edema inflamatório envolto por células adiposas, também é notada a presença de matriz extracelular com características fibrilares no entorno do edema, ainda desorganizadas, mas indicando a formação de fibrose. Vale ressaltar que a formação do involucro no edema é um forte indicativo do persistente combate à inflamação.

Já nas fotomicrografias da articulação com inflamação induzida por ACF e tratada com LDH-Ibup, Figuras 51 e 53 é nítida a diferença de composição, a qual consiste de menos núcleos celulares atribuídos à macrófagos e leucócitos (pequenos e arredondados) e mais núcleos celulares de formato fusiformes, atribuídos à presença de fibroblastos. Nota-se também uma expansão dos tecidos para o interior da cavidade articular, mas com alta concentração de matriz extracelular com características fibrilares. Muito provavelmente composto por fibras colágenas.

As mesmas amostras também foram analisadas utilizando a técnica de Picrosirius Red e suas fotomicrografias são mostradas na Figura 54.

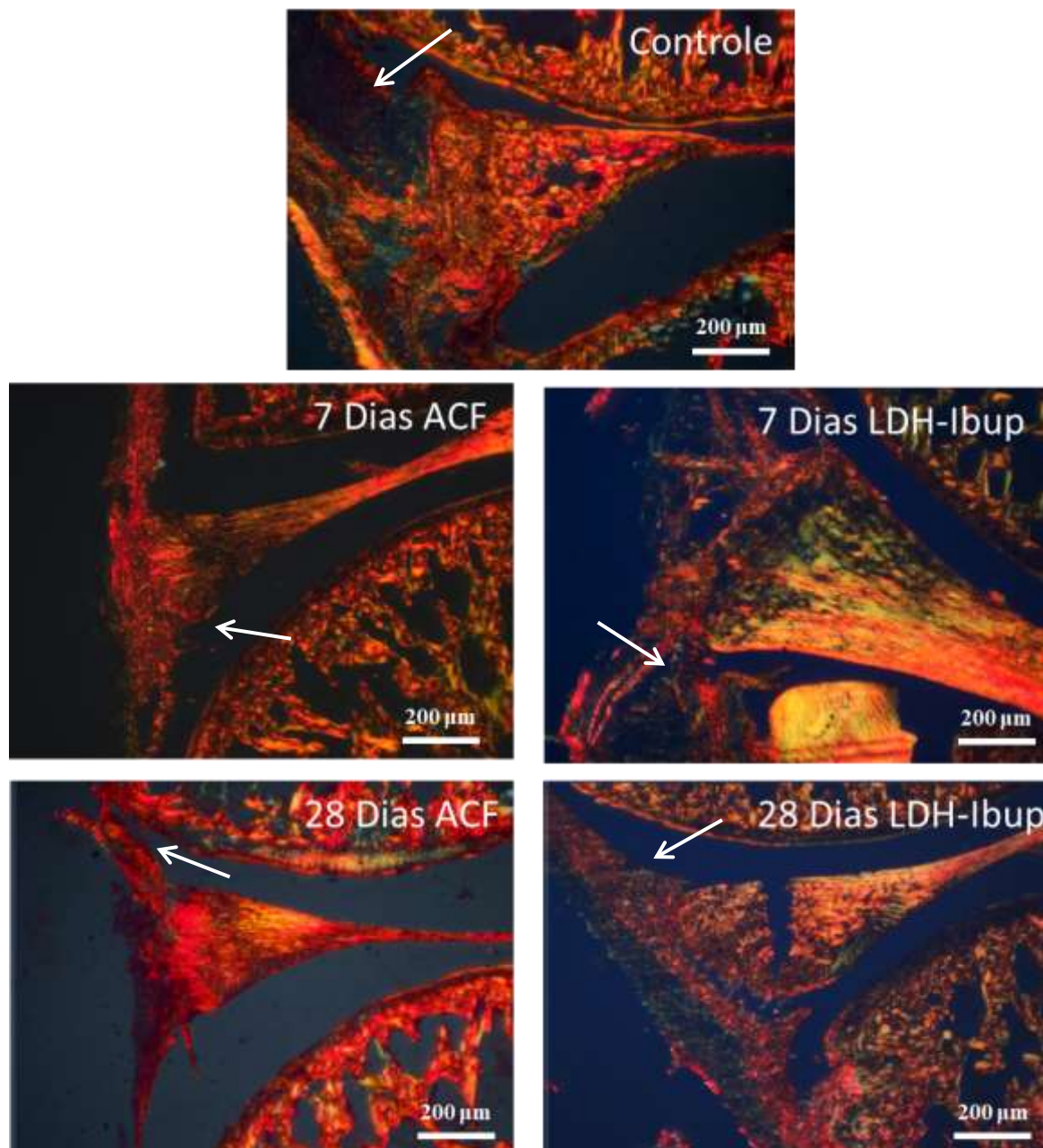


Figura 54: Fotomicrografias de cortes histológicos da articulação controle e nos períodos mais representativos do processo inflamatório, 7 e 28 dias de inflamação. À esquerda são mostradas as articulações de joelho com inflamação induzida por ACF e à direita as articulações com inflamação induzida por ACF e tratadas com LDH-Ibup, com aumento de 4x. As setas em branco evidenciam as regiões de maiores modificações. Técnica utilizada: Picrosirius Red

Como descrito no início deste tópico, a técnica de Picrosíríus Red permite a diferenciação de fibras colágenas pela sua birrefringência frente à luz polarizada, sendo

colorações avermelhadas atribuídas a fibras colágenas do tipo I e esverdeadas a colágenos tipo III.

Ao se analisar as fotomicrografias apresentadas na Figura 54, observa-se no tecido controle uma alta concentração de fibras colágenas tipo III, caracterizado pela presença de coloração esverdeada, (seta branca contínua) na região da membrana sinovial e alta concentração de colágenos tipo I nos tecidos ósseos e cartilagosos, como já era esperado.

Ao se analisar as amostras que sofreram indução inflamatória por ACF, em ambos os períodos é observado apenas a presença de regiões avermelhadas, características de colágenos tipo I tanto na membrana quanto nos demais tecidos, cartilagens e ossos. A presença desse tipo de colágeno na membrana sinovial permite indicar a formação de fibrose local.

Já para as amostras que foram submetidas a indução inflamatória por ACF e tratamento com LDH-Ibup, observa-se a presença de fibras colágenas do tipo I e III em ambos os períodos, 7 e 28 dias, sendo essa composição mista semelhante ao tecido controle, principalmente aos 28 dias de inflamação induzida.

As análises pelas duas técnicas histológicas apresentadas indicam fortemente que há uma ação anti-inflamatória local ao se tratar a inflamação induzida com LDH-Ibup, que já aos 7 dias de inflamação os tecidos mostraram um processo hiperplásico diferenciado, caracterizado pela concentração muito menor de células de defesa como macrófagos e linfócitos. Além disso foi possível também notar uma clara diferença de composição colágena após o tratamento, não sendo observada a formação de fibrose na membrana sinovial que apresentou uma composição heterogênea de colágenos tipo I e III.

Capítulo 5

CONCLUSÃO

5. Conclusão

O trabalho aqui apresentado mostra uma extensa caracterização vibracional da molécula de ibuprofeno que foi realizada utilizando as técnicas de espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção no infravermelho. Esses estudos foram suportados por cálculos DFT, que mesmo utilizando bases atômicas menos complexas que as encontradas na literatura, forneceram resultados muito satisfatórios para as suas atribuições vibracionais realizadas.

Mostra-se também uma detalhada caracterização da matriz sintetizada de LDH de zinco e alumínio com e sem ibuprofeno intercalado. Para tal, foram utilizadas as técnicas de análise elementar (ICP-OES e CHN), análise térmica (TG-DTG-MS), XRD, FT-Raman e FTIR, que possibilitaram a determinação da estrutura e composição destes LDHs.

As amostras sintetizadas de LDH-CI e LDH-Ibup foram analisadas também por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para o LDH-CI foram observadas estruturas lamelares características desses materiais, já para o LDH-Ibup foram observadas curiosas nanoestruturas semelhante ao que é conhecido na literatura por “hollow shells”. Tais estruturas podem ser geradas por meio de síntese conjunta de moldes e LDH, porém, parece inédita a sua formação pelo método “*one-pot*” de co-precipitação utilizada neste trabalho.

As matrizes de LDH, previamente aos implantes *in vivo*, foram submetidas à esterilização por radiação ionizante e posteriormente caracterizadas pelas mesmas técnicas já citadas, a fim de se garantir que sua estrutura e composição não houvessem sofrido alterações.

Foram realizados ensaios de perfil de liberação em modo estático com o intuito de compreender melhor os mecanismos cinéticos da liberação do ibuprofeno a partir da matriz de LDH. Tais ensaios foram adaptados utilizando um meio de dissolução simulante do fluido sinovial, SSF. Os resultados mostraram-se satisfatórios o suficiente para garantir que há uma liberação modificada do fármaco, que apresentou uma liberação de 76% após 72 horas de ensaio. Alguns modelos cinéticos foram aplicados à curva de liberação e evidenciaram que fatores difusionais do fármaco no interior da matriz são os principais limitantes da velocidade de liberação.

Foram caracterizados, por espectroscopia Raman, os tecidos encontrados na cápsula articular de joelho de ratos da raça Wistar, sendo eles a membrana sinovial, o menisco e os ossos. Mostrou-se que cada tecido apresenta um perfil espectral característico em condições normais e que é possível acompanhar o processo inflamatório induzido em cada um deles pela variação de seu perfil espectral entre os diferentes estágios da inflamação.

Especificamente para os tecidos cartilagosos e, principalmente, ósseos poucas alterações foram verificadas, porém sugere-se que o período de estudo, 28 dias, não tenha sido suficiente para que grandes modificações estruturais fossem observadas pelo modelo de inflamação utilizado, sendo o principal fator que pode ter influenciado diretamente nesta observação é referente à dose de ACF administrada nos animais, uma vez que neste estudo ela foi reduzida pela metade comparada ao modelo proposto na literatura, porém, caso a dose recomendada de ACF fosse mantida o processo inflamatório seria muito mais intenso o que poderia prejudicar a coleta das informações que eram almejadas ao se tratar a inflamação com LDH-Ibup.

Os tecidos que passaram pela indução inflamatória concomitantemente ao tratamento com LDH-Ibup apresentaram o processo inflamatório drasticamente reduzido, principalmente em seu estágio mais crítico, 7 dias de inflamação, fato constatado tanto por espectroscopia Raman, quanto por análise histológica, especialmente na membrana sinovial.

A utilização da microscopia Raman apresenta grandes potencialidades em investigações como a apresentada nesta Tese. Entre os principais pontos positivos está a possibilidade de estudar o tecido diretamente sem precisar de pré-tratamentos ou corantes e sem a interferência da água. Além disso, as análises são realizadas de forma mais rápida e específica do que as técnicas convencionais, como por exemplo as análises histológicas.

Esta Tese, em concordância com a comunidade acadêmica, mostrou que a microscopia Raman é uma eficiente ferramenta de diagnóstico clínico. Ainda há muito a ser explorado nesta área de pesquisa visto a grande variedade processos bioquímicos que ainda não são compreendidos totalmente a nível molecular.

Capítulo 6

REFERÊNCIAS

6. Referências

- Abuhanoğlu, G. e Özer, A. Y., Radiation sterilization of new drug delivery systems, **Interventional Medicine & Applied Science**, 6, 2, 2014.
- Adar, F., Interpretation of Raman Spectrum of Proteins, **Spectroscopy**, 37, 2, 2022.
- Alimova, A., Chakraverty, R., Muthukattil, R., Elder, S., Katz, A., Sriramoju, V., Lipper, S. e Alfano, R. R., In vivo molecular evaluation of guinea pig skin incisions healing after surgical suture and laser tissue welding using Raman spectroscopy, **J Photochem Photobiol B**, 96, 3, 2009.
- Ambrogi, V., Fardella, G., Grandolini, G. e Perioli, L., Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents — I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen, **Int J Pharm**, 220, 1, 2001.
- Ambrogi, V., Fardella, G., Grandolini, G., Perioli, L. e Tiralti, M. C., Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with anti-inflammatory agents, II: Uptake of diclofenac for a controlled release formulation, **AAPS PharmSciTech**, 3, 3, 2015.
- Andrioli, A., Prado, L. D., da Costa, M. A. e Rocha, H. V. A., Caracterização do insumo ibuprofeno e a correlação com propriedades de dissolução e de fluxo, **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, 35, 3, 2014.
- Barbour, K. E., Helmick, C. G., Theis, K. A., Murphy, L. B., Hootman, J. M., Brady, T. J. e Cheng, Y. J., Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation—United States, 2010–2012, **Morbidity and mortality weekly report**, 62, 44, 2013.
- Barbour, K. E., Helmick, C.G., Boring, M., Brady, T.J., Vital Signs: Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation— United States, 2013–2015, **MMWR Morb Mortal Wkly** 66, 2017.
- Berber, M. R., Hafez, I. H., Minagawa, K., Mori, T. e Tanaka, M., Nanocomposite formulation system of lipid-regulating drugs based on layered double hydroxide: synthesis, characterization and drug release properties, **Pharm Res**, 27, 11, 2010.
- Bergholt, M., Serio, A. e Albro, M., Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix, **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7, 2019.
- Bernardes Coelho, P. G., Gonçalves Conceição, L., Ortiz Bedoya, S. A., Souza, M. V. d. e Vargas Vitoria, M. I., Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy, **Anais Brasileiros de Dermatologia (Portuguese)**, 93, 3, 2018.
- Bi, X., Sterling, J. A., Merkel, A. R., Perrien, D. S., Nyman, J. S. e Mahadevan-Jansen, A., Prostate cancer metastases alter bone mineral and matrix composition independent of effects on bone architecture in mice — A quantitative study using microCT and Raman spectroscopy, **Bone**, 56, 2, 2013.

Bonina, F. P., Giannossi, M. L., Medici, L., Puglia, C., Summa, V. e Tateo, F., Diclofenac-hydroxalate: In vitro and in vivo release experiments, **Applied Clay Science**, 41, 3-4, 2008.

Bornstein, P. e Traub, W., 4 - The Chemistry and Biology of Collagen, In *The Proteins* (Third Edition), Academic Press, 1979, 411-632.

Brown, S., Kumar, S. e Sharma, B., Intra-articular targeting of nanomaterials for the treatment of osteoarthritis, **Acta Biomaterialia**, 93, 2019.

Burgos-Vargas, R., Cardiel, M. H., Loyola-Sánchez, A., De Abreu, M. M., Pons-Estel, B. A., Rossignol, M., Avouac, B., Ferraz, M. B. e Halhol, H., Characterization of Knee Osteoarthritis in Latin America. A Comparative Analysis of Clinical and Health Care Utilization in Argentina, Brazil, and Mexico, **Reumatología Clínica**, 10, 3, 2014.

Burrueco, M. I., Mora, M., Jiménez-Sanchidrián, C. e Ruiz, J. R., Raman microspectroscopy of hydroxalate-like compounds modified with sulphate and sulphonate organic anions, **Journal of Molecular Structure**, 1034, 2013.

Cabrero, J. F., Fernández, M., Colombo, M., Escribano, D., Gallego, P., Canchal, R., Belenguer, T., García-Martínez, J., Encinas, J., Bastide, L., Hutchinson, I., Moral, A., Canora, C., Prieto, J. A., Gordillo, C., Santiago, A., Berrocal, A. e Rull, F., RAMAN spectrometer: development of SPU FM based on enhanced qualification model for Exomars 2020, 2019.

Caporali, R., Caprioli, M., Bobbio-Pallavicini, F. e Montecucco, C., DMARDS and infections in rheumatoid arthritis, **Autoimmunity Reviews**, 8, 2, 2008.

Carvalho, H. W. P., Pulcinelli, S. H., Santilli, C. V., Leroux, F., Meneau, F. e Briois, V., XAS/WAXS Time-Resolved Phase Speciation of Chlorine LDH Thermal Transformation: Emerging Roles of Isovalent Metal Substitution, **Chemistry of Materials**, 25, 14, 2013.

Cavani, F., Trifirò, F. e Vaccari, A., Hydroxalate-Type Anionic Clays: Preparation, Properties and Applications, **Catalysis Today**, 11, 1991.

Chakraborti, M., Jackson, J. K., Plackett, D., Gilchrist, S. E. e Burt, H. M., The application of layered double hydroxide clay (LDH)-poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled release of antibiotics, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 23, 7, 2012.

Chan, J. K. C., The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology, **International Journal of Surgical Pathology**, 22, 1, 2014.

Charradi, K., Forano, C., Prevot, V., Madern, D., Ben Haj Amara, A. e Mousty, C., Characterization of hemoglobin immobilized in MgAl-layered double hydroxides by the coprecipitation method, **Langmuir**, 26, 12, 2010.

Chaudhary, N., Nguyen, T. N. Q., Ahmad, M., Harrington, R., Jefferies, C. A., Kearns, G., Meade, A. D. e Wynne, C., A spectroscopic diagnostic for rheumatoid arthritis using liquid biopsies, **Clinical Spectroscopy**, 3, 2021.

Cho, H., Kim, B. J., Park, S. H., Hasty, K. A. e Min, B. H., Noninvasive visualization of early osteoarthritic cartilage using targeted nanosomes in a destabilization of the medial meniscus mouse model, **International Journal of Nanomedicine**, 13, 2018.

Cho, H., Stuart, J. M., Magid, R., Danila, D. C., Hunsaker, T., Pinkhassik, E. e Hasty, K. A., Theranostic immunoliposomes for osteoarthritis, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 10, 3, 2014.

Choy, J. H., Jung, J. S., Oh, J. M., Park, M., Jeong, J., Kang, Y. K. e Han, O. J., Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives, **Biomaterials**, 25, 15, 2004.

Constantino, V. R. L., Figueiredo, M. P., Magri, V. R., Eulálio, D., Cunha, V. R. R., Alcântara, A. C. S. e Perotti, G. F., Biomaterials Based on Organic Polymers and Layered Double Hydroxides Nanocomposites: Drug Delivery and Tissue Engineering, **Pharmaceutics**, 15, 2, 2023.

Crane, N. J. e Elster, E. A., Vibrational spectroscopy: a tool being developed for the noninvasive monitoring of wound healing, **J Biomed Opt**, 17, 1, 2012.

Crepaldi, E. L. e Valim, J. B., Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações, **Quimica Nova**, 21, 1998.

Crofford, L. J., Use of NSAIDs in treating patients with arthritis, **Arthritis Research & Therapy**, 15, 3, 2013.

Culemann, S., Grüneboom, A. e Krönke, G., Chapter Three - Origin and function of synovial macrophage subsets during inflammatory joint disease, In *Advances in Immunology*, Academic Press, 2019, 75-98.

Cunha, V. R. R., de Souza, R. B., Martins, A. M. C. R. P. d. F., Koh, I. H. J. e Constantino, V. R. L., Accessing the biocompatibility of layered double hydroxide by intramuscular implantation: histological and microcirculation evaluation, **Scientific Reports**, 6, 2016.

Cunha, V. R. R., Ferreira, A. M. C., Constantino, V. R., Tronto, J. e Valin, J. B., Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico, **Quimica Nova**, 33, 1, 2010.

Cunha, V. R. R., Guilherme, V. A., de Paula, E., de Araujo, D. R., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R., Leite, J. R. S. A., Petersen, P. A. D., Foldvari, M., Petrilli, H. M. e Constantino, V. R. L., Delivery system for mefenamic acid based on the nanocarrier layered double hydroxide: Physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential, **Materials Science and Engineering: C**, 58, 2016.

Cunha, V. R. R., Petersen, P. A. D., Souza, R. B., Martins, A. M. C. R. P. F., Leroux, F., Taviot-Gueho, C., Petrilli, H. M., Koh, I. H. J. e Constantino, V. R. L., Phytochemical species intercalated into layered double hydroxides: structural investigation and biocompatibility assays, **New Journal of Chemistry**, 44, 24, 2020.

da Silva, M. A. B., Estudo comparativo das anastomoses vasculares com fio de polipropileno e laser de CO₂ em suínos avaliadas pela espectroscopia Raman, 2013, Tese

de doutorado - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

Das, D. e Pal, S., Modified biopolymer-dextrin based crosslinked hydrogels: application in controlled drug delivery, **RSC Advances**, 5, 32, 2015.

Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. e Chowdhury, P., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, **Acta Pol Pharm**, 67, 3, 2010.

de Faria, D. L. A., Constantino, V. R. L., Baldwin, K. J., Batchelder, D. N., Pinnavaia, T. J. e Chibwe, M., Raman microspectroscopy of phthalocyanine intercalates: tetrasulphonated cobalt and nickel phthalocyanines in layered double hydroxide, **Journal of Raman Spectroscopy**, 29, 2, 1998.

De Faria, D. L. A. e de Souza, M. A., Raman Spectra Of Human Skin And Nail Excited In The Visible Region, **Journal of Raman Spectroscopy**, 30, 1999.

del Arco, M., Gutiérrez, S., Martín, C., Rives, V. e Rocha, J., Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), **Journal of Solid State Chemistry**, 177, 11, 2004.

Delarco, M., Fernandez, A., Martin, C. e Rives, V., Release studies of different NSAIDs encapsulated in Mg,Al,Fe-hydrotalcites, **Applied Clay Science**, 42, 3-4, 2009.

Downes, A. e Elfick, A., Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine, **Sensors (Basel)**, 10, 3, 2010.

Eschweiler, J., Horn, N., Rath, B., Betsch, M., Baroncini, A., Tingart, M. e Migliorini, F., The Biomechanics of Cartilage—An Overview, **Life**, 11, 4, 2021.

Eulálio, D., Hidróxidos duplos lamelares: estudos da intercalação e liberação de N-acetil-L-cisteína, 2019, 162, - Universidade de São Paulo, 15-03-2019.

Eulálio, D., Pires Figueiredo, M., Taviot-Gueho, C., Leroux, F., dos Reis Serra, C.H., Faria, D.L.A.d., Constantino, V.R.L., Development of Dipeptide *N*-acetyl-L-cysteine Loaded Nanostructured Carriers Based on Inorganic Layered Hydroxides. **Pharmaceutics** 2023, 15, 955.

Evans, A. M., Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen, **Clinical Rheumatology**, 20, 1, 2001.

Evans, C. L. e Xie, X. S., Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine, **Annual Review of Analytical Chemistry**, 2008.

Farlay, D., Bala, Y., Rizzo, S., Bare, S., Lappe, J. M., Recker, R. e Boivin, G., Bone remodeling and bone matrix quality before and after menopause in healthy women, **Bone**, 128, 2019.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. d. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. e Cerri, P. S., Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells, **Biomed Res Int**, 2015, 2015.

Forano, C., Hibino, T., Leroux, F. e Taviot-Guého, C., Layered Double Hydroxides, In Handbook of Clay Science, Elsevier Ltd., 2006, 13.1, 1021-1095.

Freund, J., Some aspects of active immunization, **Annual Review of Microbiology**, 1, 1, 1947.

Freund, J. e McDermott, K., Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants, **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 49, 4, 1942.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. e Fox, D. J., Gaussian 09, Wallingford, CT, USA, 2009.

Frost, R. L., Scholz, R., López, A. e Theiss, F. L., Vibrational spectroscopic study of the natural layered double hydroxide manasseite now defined as hydrotalcite-2H-Mg₆Al₂(OH)₁₆[CO₃]₄H₂O, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 118, 0, 2014.

Gaskell, E. E., Ha, T. e Hamilton, A. R., Ibuprofen intercalation and release from different layered double hydroxides, **Therapeutic Delivery**, 9, 9, 2018.

Gaut, C. e Sugaya, K., Critical review on the physical and mechanical factors involved in tissue engineering of cartilage, **Regenerative Medicine**, 10, 5, 2015.

Gautam, R., Vanga, S., Madan, A., Gayathri, N., Nongthomba, U. e Umapathy, S., Raman spectroscopic studies on screening of myopathies, **Anal Chem**, 87, 4, 2015.

Gil, O. M., Espectroscopia Raman Aplicada ao Estudo da Resposta Bioquímica de Tecidos a Compostos Lamelares, 2015, Dissertação de Mestrado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Gil, O. M., Rocha, M. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J. e de Faria, D. L. A., Modified drug release system based on Sulindac and layered double hydroxide: An in vivo Raman investigation, **Vibrational Spectroscopy**, 87, 2016.

Goh, K. H., Lim, T. T. e Dong, Z., Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: a review, **Water Res**, 42, 6-7, 2008.

Goldring, M. B. e Goldring, S. R., Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis, **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1192, 1, 2010.

Goldring, S. R., Alterations in periarticular bone and cross talk between subchondral bone and articular cartilage in osteoarthritis, **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, 4, 4, 2012.

Gordijo, C. R., Barbosa, C. A., Da Costa Ferreira, A. M., Constantino, V. R. e de Oliveira Silva, D., Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides, **J Pharm Sci**, 94, 5, 2005.

Guilherme, V. A., Cunha, V. R. R., de Paula, E., de Araujo, D. R. e Constantino, V. R. L., Anti-Inflammatory and Analgesic Evaluation of a Phytochemical Intercalated into Layered Double Hydroxide, **Pharmaceutics**, 14, 5, 2022.

Hanna, K., Krzoska, E., Shaaban, A. M., Muirhead, D., Abu-Eid, R. e Speirs, V., Raman spectroscopy: current applications in breast cancer diagnosis, challenges and future prospects, **British Journal of Cancer**, 126, 8, 2022.

Herzfeldt, C. D. e Kümmel, R., Dissociation constants, solubilities and dissolution rates of some selected nonsteroidal antiinflammatories, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 9, 5, 1983.

Higuchi, T., Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, **J Pharm Sci**, 52, 12, 1963.

Hirschmann, M. T. e Müller, W., Complex function of the knee joint: the current understanding of the knee, **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, 23, 10, 2015.

Hollas, J. M., *Modern Spectroscopy*, 4^a ed., Chichester, England, 2008.

Imas, J. J., Ruiz Zamarreño, C., Zubiate, P., Sanchez-Martín, L., Campión, J. e Matías, I. R., Optical Biosensors for the Detection of Rheumatoid Arthritis (RA) Biomarkers: A Comprehensive Review, **Sensors**, 20, 21, 2020.

Iwami, R. S., Moura, M. D., Sorriha, F. B. e Bergamaschi, C. C., Effectiveness and safety of oral corticosteroids in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review, **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, 13, 1, 2022.

Jain, R., Calderon, D., Kierski, P. R., Schurr, M. J., Czuprynski, C. J., Murphy, C. J., McAnulty, J. F. e Abbott, N. L., Raman spectroscopy enables noninvasive biochemical characterization and identification of the stage of healing of a wound, **Anal Chem**, 86, 8, 2014.

Janus, E., Ossowicz, P., Kleboko, J., Nowak, A., Duchnik, W., Kucharski, Ł. e Klimowicz, A., Enhancement of ibuprofen solubility and skin permeation by conjugation with l-valine alkyl esters, **RSC Advances**, 10, 13, 2020.

Jie Lim, N., Hamed, Z., Yeow, C. H., Chan, C. e Huang, Z., Early detection of biomolecular changes in disrupted porcine cartilage using polarized Raman spectroscopy, **J Biomed Opt**, 16, 1, 2011.

Jr. da Costa Fernandes, C., Pinto, T. S., Kang, H. R., de Magalhães Padilha, P., Koh, I. H. J., Constantino, V. R. L. e Zambuzzi, W. F., Layered Double Hydroxides Are Promising Nanomaterials for Tissue Bioengineering Application, **Advanced Biosystems**, 3, 7, 2019.

Jubert, A., Legarto, M. L., Massa, N. E., Tévez, L. L. e Okulik, N. B., Vibrational and theoretical studies of non-steroidal anti-inflammatory drugs Ibuprofen [2-(4-isobutylphenyl)propionic acid]; Naproxen [6-methoxy- α -methyl-2-naphthalene acetic acid] and Tolmetin acids [1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrole-2-acetic acid], **Journal of Molecular Structure**, 783, 1, 2006.

Junqueira, L. C. U. e Carneiro, J., *Histologia Básica*, 11^a Ed., Rio de Janeiro, 2008.

Kaur, S., Bijjem, K. R. V. e Sharma, P. L., Anti-inflammatory and antihyperalgesic effects of the combination of ibuprofen and hemin in adjuvant-induced arthritis in the Wistar rat, **Inflammopharmacology**, 19, 5, 2011.

Kemble, S. e Croft, A. P., Critical Role of Synovial Tissue–Resident Macrophage and Fibroblast Subsets in the Persistence of Joint Inflammation, **Frontiers in Immunology**, 12, 2021.

Kloprogge, J. T., Hickey, L. e Frost, R. L., FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydroxalcalites, **Journal of Raman Spectroscopy**, 35, 11, 2004.

Kloprogge, J. T., Hickey, L. e Frost, R. L., The effect of varying synthesis conditions on zinc chromium hydroxalcalite: a spectroscopic study, **Materials Chemistry and Physics**, 89, 1, 2005.

Kong, X., Jin, L., Wei, M. e Duan, X., Antioxidant drugs intercalated into layered double hydroxide: Structure and in vitro release, **Applied Clay Science**, 49, 3, 2010.

Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. e Peppas, N. A., Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, **Int J Pharm**, 15, 1, 1983.

Krafft, C. e Popp, J., The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis, **Anal Bioanal Chem**, 407, 3, 2015.

Krafft, C., Schmitt, M., Schie, I. W., Cialla-May, D., Matthäus, C., Bocklitz, T. e Popp, J., Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches, **Angewandte Chemie International Edition**, 56, 16, 2017.

Labens, R., Lascelles, B. D. X., Charlton, A. N., Ferrero, N. R., Van Wettere, A. J., Xia, X.-R. e Blikslager, A. T., Ex vivo effect of gold nanoparticles on porcine synovial membrane, **Tissue Barriers**, 1, 2, 2013.

Lai, M. C. e Topp, E. M., Solid-state chemical stability of proteins and peptides, **J Pharm Sci**, 88, 5, 1999.

Lanas, A., Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Cyclooxygenase Inhibition in the Gastrointestinal Tract: A Trip From Peptic Ulcer to Colon Cancer, **The American Journal of the Medical Sciences**, 338, 2, 2009.

- Lee, E. J., Williams, K., Day, R., Graham, G. e Champion, D., Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man, **British journal of clinical pharmacology**, 19, 5, 1985.
- Li, B., He, J., Gevans, D. e Duan, X., Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system-intercalation and in vitro release of fenbufen, **Applied Clay Science**, 27, 3-4, 2004.
- Li, S., Li, Y., Yi, R., Liu, L. e Qu, J., Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Its Applications, **Frontiers in Physics**, 8, 2020.
- Liu, L. e Gao, H., Molecular structure and vibrational spectra of ibuprofen using density function theory calculations, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 89, 2012.
- Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Peltonen, L. e Laaksonen, T., Dissolution Studies of Poorly Soluble Drug Nanosuspensions in Non-sink Conditions, **AAPS PharmSciTech**, 14, 2, 2013.
- López De Padilla, C. M., Coenen, M. J., Tovar, A., De la Vega, R. E., Evans, C. H. e Müller, S. A., Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon, **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 69, 10, 2021.
- Makowski, A. J., Davidson, J. M., Mahadevan-Jansen, A. e Jansen, E. D., In vivo analysis of laser preconditioning in incisional wound healing of wild-type and HSP70 knockout mice with Raman spectroscopy, **Lasers Surg Med**, 44, 3, 2012.
- Marques, M. R. C. L., Raimar; Almukainzi, May, Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing, **Dissolution Technologies**, 18, 3, 2011.
- Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., Conaghan, P. G., Cooper, C., Goldring, M. B., Goldring, S. R., Jones, G., Teichtahl, A. J. e Pelletier, J.-P., Osteoarthritis, **Nature Reviews Disease Primers**, 2, 1, 2016.
- McAlindon, T. E., Bannuru, R. R., Sullivan, M., Arden, N., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S., Hawker, G., Henrotin, Y., Hunter, D. e Kawaguchi, H., OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis, **Osteoarthritis and Cartilage**, 22, 3, 2014.
- McVey, A. e Crain, J., Nonlinear Optical Methods for Cellular Imaging and Localization, **Methods**, 68, 2014.
- Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation, **Nature**, 454, 7203, 2008.
- Michalany, J., Técnica histológica em anatomia patológica, 2ª ed., São Paulo, 1990.
- Midwood, K. S., Williams, L. V. e Schwarzbauer, J. E., Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36, 6, 2004.

Minagawa, K., Berber, M. R., Hafez, I. H., Mori, T. e Tanaka, M., Target delivery and controlled release of the chemopreventive drug sulindac by using an advanced layered double hydroxide nanomatrix formulation system, **J Mater Sci Mater Med**, 23, 4, 2012.

Mishra, G., Dash, B. e Pandey, S., Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials, **Applied Clay Science**, 153, 2018.

Mora, M., Jiménez-Sanchidrián, C. e Rafael Ruiz, J., Raman spectroscopy study of layered-double hydroxides containing magnesium and trivalent metals, **Materials Letters**, 120, 2014.

Movasaghi, Z., Rehman, S. e Rehman, I. U., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, **Applied Spectroscopy Reviews**, 42, 5, 2007.

Mwangi, T. K., Berke, I. M., Nieves, E. H., Bell, R. D., Adams, S. B. e Setton, L. A., Intra-articular clearance of labeled dextrans from naive and arthritic rat knee joints, **Journal of Controlled Release**, 283, 2018.

Nabipour, H. e Sadr, M. H., Layered zinc hydroxide–ibuprofen nanohybrids: synthesis and characterization, **Bulletin of Materials Science**, 38, 6, 2015.

Nakamoto, K., Infrared spectra of inorganic and coordination compounds, 1963.

Neumann, A., Schinzel, R., Palm, D., Riederer, P. e Münch, G., High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF- κ B activation and cytokine expression, **FEBS Letters**, 453, 3, 1999.

Neumann, E., Lefèvre, S., Zimmermann, B., Gay, S. e Müller-Ladner, U., Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts, **Trends in Molecular Medicine**, 16, 10, 2010.

Nomura, H., Takanashi, S., Tanaka, M., Haniu, H., Aoki, K., Okamoto, M., Kobayashi, S., Takizawa, T., Usui, Y., Oishi, A., Kato, H. e Saito, N., Specific biological responses of the synovial membrane to carbon nanotubes, **Scientific Reports**, 5, 1, 2015.

Omar, S. N. e Abu Ali, H., New complexes of Zn(II) with the anti-inflammatory non-steroidal drug, ibuprofen and nitrogen donor ligands. Synthesis, characterization and biological activity, **Journal of Coordination Chemistry**, 70, 14, 2017.

Orr, C., Vieira-Sousa, E., Boyle, D. L., Buch, M. H., Buckley, C. D., Cañete, J. D., Catrina, A. I., Choy, E. H. S., Emery, P., Fearon, U., Filer, A., Gerlag, D., Humby, F., Isaacs, J. D., Just, S. A., Lauwerys, B. R., Le Goff, B., Manzo, A., McGarry, T., McInnes, I. B., Najm, A., Pitzalis, C., Pratt, A., Smith, M., Tak, P. P., Tas, S. W., Thurlings, R., Fonseca, J. E. e Veale, D. J., Synovial tissue research: a state-of-the-art review, **Nature Reviews Rheumatology**, 13, 8, 2017.

Owen, S. G., Francis, H. W. e Roberts, M. S., Disappearance kinetics of solutes from synovial fluid after intra-articular injection, **British journal of clinical pharmacology**, 38, 4, 1994.

P Bornstein, a. e Sage, H., Structurally Distinct Collagen Types, **Annual Review of Biochemistry**, 49, 1, 1980.

Palmer, S. J., Frost, R. L., Ayoko, G. e Nguyen, T., Synthesis and Raman spectroscopic characterisation of hydrotalcite with CO_3^{2-} and $(\text{MoO}_4)^{2-}$ anions in the interlayer, **Journal of Raman Spectroscopy**, 39, 3, 2008.

Palmer, S. J., Frost, R. L. e Spratt, H. J., Synthesis and Raman spectroscopic study of Mg/Al,Fe hydrotalcites with variable cationic ratios, **Journal of Raman Spectroscopy**, 40, 9, 2009.

Parello, M. L., Rojas, R. e Giacomelli, C. E., Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: a simple approach to describe drug release in acid media, **J Colloid Interface Sci**, 351, 1, 2010.

Pavlou, E., Zhang, X., Wang, J. e Kourkoumelis, N., Raman spectroscopy for the assessment of osteoarthritis, **Ann. Jt**, 3, 83, 2018.

Peng, Z., Sun, H., Bunpetch, V., Koh, Y., Wen, Y., Wu, D. e Ouyang, H., The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration, **Biomaterials**, 268, 2021.

Perioli, L., Posati, T., Nocchetti, M., Bellezza, F., Costantino, U. e Cipiciani, A., Intercalation and release of antiinflammatory drug diclofenac into nanosized ZnAl hydrotalcite-like compound, **Applied Clay Science**, 53, 3, 2011.

Pinto, M., Zorn, K., Tremblay, J.-P., Desroches, J., Dallaire, F., Aubertin, K., Marple, E., Kent, C., Leblond, F., Trudel, D. e Lesage, F., Integration of a Raman spectroscopy system to a robotic-assisted surgical system for real-time tissue characterization during radical prostatectomy procedures, **J Biomed Opt**, 24, 2, 2019.

Qu, Z., Garcia, C. H., O'Rourke, L. M., Planck, S. R., Kohli, M. e Rosenbaum, J. T., Local Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes Contributes to Synovial Hyperplasia, **Arthritis & Rheumatism**, 37, 2, 1994.

Rae, A., Stosch, R., Klapetek, P., Walker, A. R. H. e Roy, D., State of the Art Raman Techniques for Biological Applications, **Methods**, 68, 2014.

Ralbovsky, N. M. e Lednev, I. K., Raman spectroscopy and chemometrics: A potential universal method for diagnosing cancer, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 219, 2019.

Riaz, U. e M. Ashraf, S., Double Layered Hydroxides as Potential Anti-Cancer Drug Delivery Agents, **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 13, 4, 2013.

Ricard-Blum, S., The collagen family, **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3, 1, 2011.

Rieppo, L., Töyräs, J. e Saarakkala, S., Vibrational spectroscopy of articular cartilage, **Applied Spectroscopy Reviews**, 52, 3, 2017.

Rocha, M. A., Materiais Híbridos Nanoestruturados à Base de Hidróxidos Duplos Lamelares e o Fármaco Sulindaco, 2015, tese de doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo,

Rocha, M. A., Petersen, P. A. D., Teixeira-Neto, E., Petrilli, H. M., Leroux, F., Taviot-Gueho, C. e Constantino, V. R. L., Layered double hydroxide and sulindac coiled and scrolled nanoassemblies for storage and drug release, **RSC Advances**, 6, 20, 2016.

Rodrigues, L. A., Figueiras, A., Veiga, F., de Freitas, R. M., Nunes, L. C., da Silva Filho, E. C. e da Silva Leite, C. M., The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: a review, **Colloids Surf B Biointerfaces**, 103, 2013.

Rojas, R., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H. e Giacomelli, C. E., Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 463, 2014.

Rojas, R., Palena, M. C., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H. e Giacomelli, C. E., Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex, **Applied Clay Science**, 62, 2012.

Roschger, A., Wagermaier, W., Gamsjaeger, S., Hassler, N., Schmidt, I., Blouin, S., Berzlanovich, A., Gruber, G. M., Weinkamer, R., Roschger, P., Paschalis, E. P., Klaushofer, K. e Fratzl, P., Newly formed and remodeled human bone exhibits differences in the mineralization process, **Acta Biomaterialia**, 104, 2020.

Sacchetti, C., Liu-Bryan, R., Magrini, A., Rosato, N., Bottini, N. e Bottini, M., Polyethylene-Glycol-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes for Intra-Articular Delivery to Chondrocytes, **ACS Nano**, 8, 12, 2014.

Sala, O., Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho., 2^a ed., São Paulo, 2008.

Schopf, L., Anderson, K. e Jaffee, B., Rat models of arthritis: Similarities, differences, advantages, and disadvantages in the identification of novel therapeutics, In *In Vivo Models of Inflammation*, Birkhäuser Basel, 2006, 1, 1-34.

Seftel, E. M., Popovici, E., Mertens, M., Witte, K. D., Tendeloo, G. V., Cool, P. e Vansant, E. F., Zn-Al layered double hydroxides: Synthesis, characterization and photocatalytic application, **Microporous and Mesoporous Materials**, 113, 1-3, 2008.

Senna, E. R., De Barros, A. L. P., Silva, E. O., Costa, I. F., Pereira, L. V. B., Ciconelli, R. M. e Ferraz, M. B., Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach, **The journal of rheumatology**, 31, 3, 2004.

Silva, I. M. P. e., Profirio, D. d. M., de Paiva, R. E. F., Lancellotti, M., Formiga, A. L. B. e Corbi, P. P., A silver complex with ibuprofen: Synthesis, solid state characterization, DFT calculations and antibacterial assays, **Journal of Molecular Structure**, 1049, 2013.

Soliman, C., Tu, D., Mabbott, S., Coté, G. e Maitland, K., Portable, multi-modal Raman and fluorescence spectroscopic platform for point-of-care applications, **J Biomed Opt**, 27, 9, 2022.

Sousa, R., Jouin, J., Masson, O., Remondiere, F., Lemarchand, A., Colas, M., Thomas, P., Lameira, J., Bastos, G. N. T., Lima, A. B., Nascimento, J. L. M., Anicete-Santos, M., Monteiro, W. R. e Alves, C. N., Structure and analgesic properties of layered double

hydroxides intercalated with low amounts of ibuprofen, **Journal of the American Ceramic Society**, 100, 6, 2017.

Souza, C. M. D. d., Contribuições químicas à astrobiologia: estudo da interação entre biomoléculas e minerais por espectroscopia raman., 2017, - Universidade de São Paulo, Sparks, D. L., Kinetics and mechanisms of chemical reactions at the soil mineral/water interface, In Soil physical chemistry, CRC press, 2018, 135-192.

Stone, S., Malanga, G. A. e Capella, T., Corticosteroids: Review of the history, the effectiveness, and adverse effects in the treatment of joint pain, **Pain Physician**, 24, S1, 2021.

Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S. e Rehman, I. u., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, **Applied Spectroscopy Reviews**, 50, 1, 2014.

Tarushi, A., Karafrou, Z., Kljun, J., Turel, I., Psomas, G., Papadopoulos, A. N. e Kessissoglou, D. P., Antioxidant capacity and DNA-interaction studies of zinc complexes with a non-steroidal anti-inflammatory drug, mefenamic acid, **J Inorg Biochem**, 128, 2013.

Tetlow, L. C., Adlam, D. J. e Woolley, D. E., Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: Associations with degenerative changes, **Arthritis & Rheumatism**, 44, 3, 2001.

Thakur, S., Riyaz, B., Patil, A., Kaur, A., Kapoor, B. e Mishra, V., Novel drug delivery systems for NSAIDs in management of rheumatoid arthritis: An overview, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 106, 2018.

Tolosa, E. M. C., Rodrigues, C. J., Behmer, O. A. e Neto, A. G. F., Manual de técnicas para histologia normal e patológica, 2ª ed., Barueri, 2003.

Tortora, G. J. e Derrickson, B., Corpo Humano-: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia, 2016.

Traynor, D., Behl, I., O’Dea, D., Bonnier, F., Nicholson, S., O’Connell, F., Maguire, A., Flint, S., Galvin, S., Healy, C. M., Martin, C. M., O’Leary, J. J., Malkin, A., Byrne, H. J. e Lyng, F. M., Raman spectral cytopathology for cancer diagnostic applications, **Nature Protocols**, 16, 7, 2021.

Tu, H. e Boppart, S. A., Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microscopy: Overcoming Technical barriers for Clinical Translation, **Journal of Biophotonics**, 1, 2, 2014.

USP, U. S. P., USP–NF, D. R., MD;. pp. 267–274, 2008, - US Pharmacopeial Convention, van Breugel, S. J., Low, I., Christie, M. L., Pokorny, M. R., Nagarajan, R., Holtkamp, H. U., Srinivasa, K., Amirapu, S., Nieuwoudt, M. K., Simpson, M. C., Zargar-Shoshtari, K. e Aguergaray, C., Raman spectroscopy system for real-time diagnosis of clinically significant prostate cancer tissue, **Journal of Biophotonics**, n/a, n/a, 2023.

van der Laan, J. J. H., van der Waaij, A. M., Gabriëls, R. Y., Festen, E. A. M., Dijkstra, G. e Nagengast, W. B., Endoscopic imaging in inflammatory bowel disease: current developments and emerging strategies, **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, 15, 2, 2021.

van Eden, W., Wagenaar-Hilbers, J. P. A. e Wauben, M. H. M., Adjuvant Arthritis in the Rat, In *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 2001,
van Weeren, R., 11 - Joint physiology: Responses to exercise and training, In *Equine Sports Medicine and Surgery (Second Edition)*, W.B. Saunders, 2014, 213-222.

Viseras, C., Cerezo, P., Sanchez, R., Salcedo, I. e Aguzzi, C., Current challenges in clay minerals for drug delivery, **Applied Clay Science**, 48, 3, 2010.

Von Euw, S., Wang, Y., Laurent, G., Drouet, C., Babonneau, F., Nassif, N. e Azaïs, T., Bone mineral: new insights into its chemical composition, **Scientific Reports**, 9, 1, 2019.

Vueba, M. L., Pina, M. E. e Batista de Carvalho, L. A. E., Conformational stability of ibuprofen: Assessed by DFT calculations and optical vibrational spectroscopy, **J Pharm Sci**, 97, 2, 2008.

Wang, C. T., Lin, Y. T., Chiang, B. L., Lin, Y. H. e Hou, S. M., High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis, **Osteoarthritis and Cartilage**, 14, 12, 2006.

Wen, Z. Q., Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals, **J Pharm Sci**, 96, 11, 2007.

Wong, M. W., Vibrational frequency prediction using density functional theory, **Chemical Physics Letters**, 256, 4, 1996.

Zhang, B., Liu, W., Sun, D., Li, Y. e Wu, T., Hollow nanoshell of layered double oxides for removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solution: Synthesis, characterization, and adsorption performance study, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 561, 2019.

Zhang, K., Xu, Z., Lu, J., Tang, Z., Zhao, H., Good, D. e Wei, M., Potential for Layered Double Hydroxides-Based, Innovative Drug Delivery Systems, **International Journal of Molecular Sciences**, 15, 5, 2014.

Zinin, P. V., Misra, A., Kamemoto, L., Yu, Q., Hu, N. e Sharma, S. K., Visible, near-infrared, and ultraviolet laser-excited Raman spectroscopy of the monocytes/macrophages (U937) cells, **Journal of Raman Spectroscopy**, 41, 3, 2010.

Žuvela, P., Lin, K., Shu, C., Zheng, W., Lim, C. M. e Huang, Z., Fiber-Optic Raman Spectroscopy with Nature-Inspired Genetic Algorithms Enhances Real-Time in Vivo Detection and Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma, **Anal Chem**, 91, 13, 2019.

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados Pessoais

Nome: Otávio Mendes Gil

Filiação: Hector Alexandre Chaves Gil e Égle Ferraz Mendes

Nascimento: 03/01/1991 – São Paulo/SP – Brasil

2. Formação

Ensino Fundamental e médio

Escola Cooperativa de Cotia – Cotia/SP (2001-2005)

Colégio Objetivo Granja Viana – Cotia/SP (2006-2008)

Graduação

Bacharel em química – Universidade de São Paulo-SP-Brasil (2009-2013)

Pós-graduação

Mestrado em química – Universidade de São Paulo –SP-Brasil (2013-2015)

Título: Espectroscopia Raman aplicada a resposta bioquímica de tecidos a compostos lamelares. Sob orientação da Prof.^a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria.

3. Estágios

- Iniciação Científica no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do Instituto de Química da USP sob orientação da Prof.^a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria, realizada de 2011 a 2013, com bolsa concedida pelo CNPq durante todo o período.
- Título: Anatase em documentos histórico-culturais: investigação da formação de TiO₂ a partir de processamento de minerais.
- Bolsa de mérito acadêmico concedida pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo e realizada de janeiro a março de 2012 na University of Leicester para desenvolvimento do projeto “Biological markers in minerals exposed to extreme environments by Raman spectroscopy with portable equipment” sob orientação do Prof. Dr. Howell G. M. Edwards, Professor Honorário da University of Leicester e Professor Emérito da University of Bradford, ambas na Inglaterra.
- Monitor da disciplina QFL 2452 – Físico-Química II, realizada no Instituto de Química/USP sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Susana Ines Cordoba de Torresi. Primeiro semestre de 2012.
- Monitor da disciplina QFL 2143 – Química dos Elementos, realizada no Instituto de Química/USP sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Vera Regina Leopoldo Constantino. Segundo semestre de 2013.
- Monitor da disciplina QFL 2144 – Fundamentos de Espectroscopia e Métodos Espectroscópicos, realizada no Instituto de Química/USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Koiti Araki. Primeiro semestre de 2014 pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).
- Monitor da disciplina QFL 2441 – Físico-Química I, realizada no Instituto de Química /USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rômulo Augusto Ando.

Segundo semestre de 2014 pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

4. Ocupação

- Bolsista de Mestrado – CNPq (2013-2015)
- Bolsista de Doutorado – CAPES (2015-2019)
- Professor de nível superior em Centro Universitário FIEO – UNIFIEO - Osasco/SP; atuação nas disciplinas de Química Inorgânica, Físico- Química, Toxicologia e História da Ciência (2018-2021)
- Analista de Controle de Qualidade, Libbs Farmacêutica – Embu das Artes/SP; (2022-atualmente).

5. Produção acadêmica

- Gil, O. M., Faria, D. L. A., **Detection of anatase in cultural heritage. Workshop on Applied Raman Spectroscopy**, 2012. Apresentação oral.
- Gil, O. M., Rocha, M. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J., Faria, D. L. A., **Avaliação e acompanhamento do processo inflamatório em músculos de ratos por espectroscopia Raman**, 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015. Apresentação de pôster.
- Gil, O. M.; Aguayo, T., Faria, D. L. A., **Comparação entre espectrometros Raman de bancada e transportáveis: Perspectivas forenses**, 4º Encontro Nacional de Química Forense, 2014. Apresentação de pôster.
- Gil, O. M., D. L. A., **Anatase em carregadores de Pigmentos e suas implicações em documentos históricos**, 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013. Apresentação de pôster.
- Gil, O. M., Sala, O., D. L. A., **Medidas de fator de depolarização para atribuição de anatase como sólido policristalino**, 3º Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2013. Apresentação de pôster.
- Gil, O. M., D. L. A., **Efeitos de matriz na estabilização de anatase e implicações histórico-culturais**, 2º Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2011. Apresentação de pôster
- Gil, O. M., D. L. A., **Considerações químicas sobre a autenticidade de documentos medievais**, 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011. Apresentação de pôster.
- Gil, O. M., D. L. A., **Anatase em documentos histórico-culturais: Investigação da transformação de TiO₂ por processamentos minerais**, 28ª Semana da Química - "Ano Internacional da Química: celebrando as conquistas da Química para a Humanidade", 2011. Apresentação de pôster.
- de Araujo, G. L. B., Ferreira, F. F., Bernardes, C. E. S., Sato, J. A. P., Gil, O. M., de Faria, D. L. A., Loebenberg, R., Byrn, S. R., Ghisleni, D. D. M., Bou-Chacra, N. A., Pinto, T. J. A., Antonio, S. G., Ferraz, H. G., Zemlyanov, D., Gonçalves, D. S. e Minas da Piedade, M. E., **A New Thermodynamically**

Favored Flubendazole/Maleic Acid Binary Crystal Form: Structure, Energetics, and in Silico PBPK Model-Based Investigation, Crystal Growth & Design, 18, 4, 2018. Artigo completo.

- Gil, O. M., Rocha, M. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J. e de Faria, D. L. A., **Modified drug release system based on Sulindac and layered double hydroxide: An in vivo Raman investigation, Vibrational Spectroscopy**, 87, 2016. Artigo completo.
- FREIRE, T. B. ; DARIO, M. F. ; MENDES, O. G. ; OLIVEIRA, A. C. ; VETORE NETO, A. ; FARIA, D. L. A. ; SILVA, V. R. L. E. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . **Nanoemulsion containing caffeine for cellulite treatment: characterization and in vitro evaluation. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (ONLINE)** , v. 55, p. 1-11, 2019. Artigo completo.
- XXV ICORS – **Label-Free Raman microscopy for analysis of inflammatory process and tissue repair**. Otávio M. Gil, Michele A. Rocha, Vera R. L. Constantino, Ivan H. J. Koh and Dalva L. A. de Faria. 14 de agosto de 2019. Apresentação oral.
- IV EnBraER – **Hidróxidos duplos lamelares na liberação modificada de sulindaco em sistema biológico**. 15 de dezembro de 2019. Apresentação de pôster.
- V EnBraER - **Acompanhamento por espectroscopia Raman do processo inflamatório artrítico em diferentes tecidos articulares encontrados em modelo animal**. 03 a 06 de dezembro de 2017. Apresentação oral.
- III RAA – **Produção de Colágenos In Vivo Induzida por Hidróxidos Duplos Lamerares e Identificação por Espectroscopia RAMAN**. 7 e 8 de julho de 2017. Apresentação de pôster.
- V Congresso Latino Americano de Arqueometria – **Anatase em objetos arqueológicos não é evidência de falsificação**. Otavio M. Gil, Maria Terezinha C. Sansiviero, Howel G. M. Edwards, Dalva L. A. de Faria. 7 a 11 de novembro de 2016. Apresentação de pôster.