



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia**

---

**CLÁUDIA BATISTA SIQUEIRA LEITE**

Nanoemulsão de Glucosamina e Condroitina para o Tratamento Tópico das  
Condrotias do Joelho, avaliadas em Ensaio Clínico Randomizado.

Brasília, DF

Março, 2018



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

## CLÁUDIA BATISTA SIQUEIRA LEITE

Nanoemulsão de Glucosamina e Condroitina para o Tratamento Tópico das  
Condrotias do Joelho, avaliadas em Ensaio Clínico Randomizado.

Tese de doutorado apresentada para a  
obtenção do título de doutor pelo  
Programa de Pós-Graduação em  
Nanociência e Nanobiotecnologia da  
Universidade de Brasília.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa - Faculdade de Ceilândia/UnB

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlman - Faculdade de Ceilândia/UnB

Brasília, 2018

*Dedico este trabalho ao meu esposo, José Vanderlei Leite, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos, e às minhas filhas, Beatriz e Jaqueline, pela inspiração para trabalhar com amor, almejando buscar o bem-estar humano.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A realização deste projeto só foi possível com o apoio de várias pessoas.*

*Agradeço aos colaboradores do Instituto de Ciências Biológicas (UnB), em especial ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pelo acolhimento no Laboratório de Nanobiotecnologia, e à Janaína Moreira Coelho, pela ajuda nos testes de citotoxicidade in vitro e na caracterização do sistema.*

*Agradeço aos colaboradores do Instituto de Química (UnB), em especial ao Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré, pelo acolhimento na Central Analítica e por ter viabilizado a utiliza o do Cromatógrafo e do CHN.*

*Agradeço aos colaboradores do Departamento de Farmácia (UnB), em especial ao Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso, pelo acolhimento no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos e por ter tornado possível as avalia es de segurança e eficácia in vitro. Agradeço também ao Ricardo Nunes Ferreira, pela grande ajuda na realiza o das avalia es.*

*Agradeço aos colaboradores do Hospital das Forças Armadas (HFA), em especial ao Capitão José Luiz Fontoura de Andrade, Chefe da Se o de Pesquisa, e   1  Tenente Magali Francisca de Oliveira Silva, Chefe da Se o de Fisioterapia, por viabilizarem a tramita o administrativa de aprova o do projeto e disponibilizarem estrutura física para o ensaio clínico. Agradeço também aos profissionais fisioterapeutas do Ambulatório de Fisioterapia, que apoiaram e incentivaram o estudo.*

*Agradecimento muito especial aos meus orientadores Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa e Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlman, pelo grande apoio, direcionamento e conhecimento que me foi transmitido.*

## RESUMO

O tratamento das condropatias, ou lesões de cartilagens, ainda é um grande desafio na reabilitação, principalmente pelas próprias características da cartilagem, que promovem um baixo potencial de regeneração. A degeneração das cartilagens, acompanhada de alterações das estruturas ósseas vizinhas, é conhecida como osteoartrite. Essa afecção trata-se de uma causa frequente de dor, limitação funcional e pode levar à incapacidade, ocasionando considerável perda da qualidade de vida. A alternativa de tratamento com agentes modificadores de estrutura – como os sulfatos de Glucosamina (GS) e a Condroitina (CS) – é comumente prescrita para os pacientes e vem sendo muito pesquisada. Meta-análises apontam que esses fármacos, usados via oral, têm efeitos incertos como modificadores da estrutura articular. O objetivo do estudo foi propor uma nova abordagem terapêutica para a recuperação das lesões condrais e osteocondrais do joelho de humanos. Essa abordagem é formada por aplicação transdérmica (nanoemulsão associada ao ultrassom e oclusão) e exercícios terapêuticos. O delineamento metodológico iniciou-se, primeiramente, com o desenvolvimento e a caracterização da Nanoemulsão de GS e CS, seguidos das análises *in vitro* do potencial citotóxico, de irritabilidade e de permeação da nanoemulsão. O ensaio clínico, por meio de estudo piloto, foi a fase final do processo metodológico. Uma nanoemulsão transparente, do tipo óleo-em-água (O/A), mostrou estabilidade por 150 dias na temperatura ambiente e a 4°C. Seus reagentes foram o Cremophor ELP (9%), o Óleo de Rícino (3%), Água Ultrapura (78%), GS (5%) e CS (5%). Seu diâmetro hidrodinâmico de 29,3 nm, potencial zeta de -2,44 mV, índice de polidispersão de 0,11 e pH de 4,23 evidenciaram características desejáveis para realização de análises seguintes. A Cryo-Tem mostrou morfologia esférica e diâmetros menores do que 100 nm. O sistema em estudo não apresentou citotoxicidade *in vitro* na linhagem NIH-3T3, por um período de 24 horas, utilizando o ensaio MTT. No teste de membrana corioalantóide, tanto a nanoemulsão como seu homólogo em branco apresentaram-se no limite inferior da faixa considerada “moderadamente irritante”. A Análise Elementar (CHN) foi utilizada para quantificação dos fármacos após teste de permeação em célula de difusão. Quando utilizado a Nanoemulsão, houve menor retenção de carbono no estrato córneo, maior retenção de carbono na pele viável e maior dose de carbono foi quantificada no líquido receptor. Esses índices foram significativamente maiores em comparação à formulação controle. O estudo piloto foi de fundamental importância para detectar algumas necessidades de ajustes na metodologia da pesquisa, como a alteração no número de sessões por semana, no tempo total de intervenção, na rotina de aplicação dos instrumentos de avaliação e na forma de avaliação dos dados numéricos. Além disso, o estudo piloto mostrou relevância clínica da proposta terapêutica, mesmo que ainda não tenha sido possível identificar significância estatística no resultado entre os grupos. O Grupo-Nano teve superioridade em 4 dos 5 domínios (grupos de sintomas) avaliados, quando comparado com o Grupo-Controle. Além do mais, o Grupo-Nano mostrou em Ressonância Nuclear Magnética uma recuperação total de lesão de cartilagem patelar. Mediante os fatos expostos, a Nanoemulsão O/A de GS e CS, não tóxica e estável, associada ao ultrassom, à cinesioterapia e à oclusão, foi capaz de melhorar a absorção transdérmica e mostrar uma relevância clínica no alívio dos sintomas e na recuperação da estrutura articular em humanos com lesões condrais do joelho.

**Palavras chaves:** condropatia, osteoartrite, glucosamina, condroitina, nanoemulsão, fonoforese, ultrassom, nanotecnologia.

## ABSTRACT

The treatment of chondropathy, or lesions in cartilage, is still a major challenge in rehabilitation, principally due to the characteristics of cartilage itself, which promote low regeneration potential. The degeneration of cartilage, accompanied by alterations in the neighboring bone structures, is known as osteoarthritis. This condition is a frequent cause of pain and of functional limitations, and it can lead to incapacity, occasioning a considerable loss in the quality of life. The treatment option with structure-modifying agents, such as sulfates of Glucosamine (GS) and Chondroitin (CS), is commonly prescribed for patients and has been researched frequently. Meta-analyses indicate that these drugs, used via oral, have uncertain effects as articular structure modifiers. The objective of this study was to propose a new therapeutic approach to recovery from chondral and osteochondral lesions in the human knee. This approach consists of transdermal application (nanoemulsion associated with ultrasound and occlusion) and therapeutic exercises. The methodological design started with the development and characterization of the Nanoemulsion of GS and CS, followed by *in vitro* analyses of cytotoxic potential, irritability and nanoemulsion permeation. The clinical assay, by means of a pilot study, was the final phase of the methodological process. A transparent nanoemulsion, of the oil-in-water type (O/W), showed stability for 150 days at ambient temperature and at 4°C. Its reagents were Cremophor ELP (9%), and Castor Oil (3%), Ultrapure Water (78%), GS (5%) and CS (5%). Its hydrodynamic diameter was 29.3 nm, polydispersion index 0.11, zeta potential -2.44 mV and pH 4.23, and these values demonstrated desirable characteristics for carrying out the next analyses. Cryo-Tem showed spherical morphology and diameters smaller than 100 nm. The system under study did not present cytotoxicity *in vitro* in the NIH-3T3 lineage, for a period of 24 hours, using the MTT assay. In the Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (*HET-CAM*) method, both the nanoemulsion and its blank homologue were at the lowest limit of the category considered "moderate irritability". Elemental Analysis (CHN) was used to quantify the drugs after the permeation test in a diffusion cell. When the Nanoemulsion was used there was less retention of carbon in the stratum corneum, greater retention of carbon in the viable skin, and a greater dose of carbon was quantified in the receiver liquid. These indices were significantly higher than those for the control formulation. The pilot study was of fundamental importance in detecting some of the adjustments needed in the research methodology, such as the alteration in the number of sessions per week, in the total intervention time, in the routine for applying evaluation tools and in the way in which numerical data should be evaluated. In addition, the pilot study showed the clinical importance of the therapeutic proposal, although it has still not been possible to identify statistical significance in the result between groups. The Nano-Group was superior in 4 of the 5 domains (groups of symptoms) evaluated, when compared with the Control-Group. Moreover, the Nano-Group showed complete recovery of the patellar cartilage lesion, grade II, in nuclear magnetic resonance imaging. In this context, the O/W Nanoemulsion of GS and CS, which is non-toxic and stable, when associated with ultrasound, kinesiotherapy and occlusion, was capable of improving transdermal absorption and showed clinical significance in relieving symptoms and in improving articular structure in humans with chondral lesions of the knee.

**Key words:** chondropathy, osteoarthritis, glucosamine, chondroitin, nanoemulsion, phonophoresis, ultrasound, nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas de uma articulação sinovial	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Constituintes da cartilagem articular	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Etapas do processo de avaliação do paciente com condropatias ou osteoartrite do joelho	<b>9</b>
<b>Figuras 4a e 4b.</b> Instrumentos para medição da ADM	<b>11</b>
<b>Figura 5:</b> Radiografia de joelho direito AP e Perfil mostrando desgaste do Platô-tibial e estreitamento do espaço articular	<b>12</b>
<b>Figuras 6<sup>a</sup>, 6b e 6c.</b> Cartilagem íntegra. Cartilagem com aumento do sinal. Cartilagem com fissura ou erosão condral e óssea	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b> Fluxograma das principais ações do tratamento conservador	<b>15</b>
<b>Figura 8.</b> Ilustração de Enxerto osteocondral autólogo/mosaicoplastia	<b>16</b>
<b>Figura 9.</b> Corte histológico da cartilagem hialina	<b>20</b>
<b>Figura 10.</b> Estrutura química da Glucosamina 6-sulfato e da Condroitina 6-sulfato	<b>21</b>
<b>Figura 11.</b> O estrato córneo com seus corneócitos e desmossomas altamente organizados e coesos.	<b>23</b>
<b>Figura 12.</b> Vias de absorção cutânea	<b>24</b>
<b>Figura 13.</b> Ilustração de diferentes nanomateriais para entrega de fármacos	<b>31</b>
<b>Figura 14.</b> Ilustração representativa da transparência esperada de uma nanoemulsão	<b>34</b>
<b>Figura 15.</b> Diferentes sistemas de nanoemulsões	<b>35</b>
<b>Figura 16.</b> Diferentes nanoemulsões com seus surfactantes e co-surfactantes	<b>37</b>
<b>Figura 17.</b> Ondas ultrassônicas e efeito de cavitação estável ou instável no Estrato Córneo	<b>47</b>
<b>Figura 18.</b> Desordem da bicamada: aumento da permeabilidade após onda ultrassônica.	<b>48</b>
<b>Figura 19.</b> Fluxograma ilustrando as fases metodológicas da pesquisa.	<b>58</b>
<b>Figura 20.</b> Ilustração da nanoemulsificação espontânea.	<b>60</b>
<b>Figura 21a e 21b.</b> Tratamento e preparação das células no ensaio de MTT.	<b>63</b>
<b>Figura 22a e 22b.</b> Imagens do teste HET-CAM. Posicionamento do ovo para o teste e abertura para exposição da CAM.	<b>64</b>
<b>Figura 23.</b> Célula de difusão montada para teste de permeação	<b>66</b>
<b>Figura 24a 24b.</b> Procedimentos do teste de permeação. A pele sendo picotada após agitação da célula por 12 horas. Pele e fita (com estrato córneo) transferidas para frasco.	<b>66</b>
<b>Figura 25.</b> Diagrama ilustrando processo de randomização dos participantes.	<b>71</b>
<b>Figura 26.</b> Divisão em quadrantes da área a ser tratada para cálculo do tempo	<b>74</b>

de aplicação do ultrassom

<b>Figura 27.</b> Joelho ocluído com plástico insufilm após fonoforese.	<b>74</b>
<b>Figura 28.</b> Escala Visual Analógica de Dor de 10cm.	<b>76</b>
<b>Figura 29.</b> Fluxograma do Estudo Piloto.	<b>77</b>
<b>Figura 30.</b> Visualização macroscópica da Nanoemulsão após 48 horas	<b>82</b>
<b>Figura 31.</b> Representação ilustrativa da Nanoemulsão de GS e CS	<b>83</b>
<b>Figura 32.</b> Amostras de Nanoemulsão de GS e CS submetidas à centrifugação após 24 horas de armazenamento em distintas condições de temperatura	<b>84</b>
<b>Figura 33.</b> Resultados do DH e do PDI da amostra de Nanoemulsão de GS e CS mantida a 37 °C por 150 dias	<b>85</b>
<b>Figura 34.</b> Resultados do DH e do PDI da amostra de Nanoemulsão de GS e CS mantida em TA por 150 dias	<b>85</b>
<b>Figura 35.</b> Resultados do DH e do PDI da amostra de Nanoemulsão de GS e CS mantida a 4 °C por 150 dias	<b>86</b>
<b>Figura 36.</b> Mudanças do pH da Nanoemulsão de GS e CS, durante 150 dias, mantidas na temperatura ambiente	<b>86</b>
<b>Figura 37.</b> Resultados do Pz. a: Pz da formulação mantida em TA; b: Pz da formulação mantida à 4 °C e c: Pz da formulação mantida à 37 °C	<b>87</b>
<b>Figura 38.</b> Cryo-Tem das Nanopartículas de Óleo de Rícino em Nanoemulsão de GS e CS.	<b>88</b>
<b>Figura 39.</b> Viabilidade de células NIH-3T3 após exposição à Nanoemulsão de GS e CS e meio de cultivo (Controle) por 24 horas	<b>89</b>
<b>Figura 40.</b> Índices de irritabilidade dos controles e das nanoemulsões.	<b>89</b>
<b>Figura 41.</b> Concentrações (%) Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio em amostras (2,5 mg) analisadas antes de serem submetidas ao teste de permeação	<b>91</b>
<b>Figura 42.</b> Análise CHN após teste de permeação.	<b>92</b>
<b>Figura 43.</b> Fluxograma da triagem, alocação e análises dos participantes.	<b>93</b>
<b>Figura 44a e 44b.</b> . Dispersão das idades dos participantes do Grupo-Controle (20 aos 55 anos). Dispersão das idades dos participantes do Grupo-Nano (20 aos 55 anos)	<b>95</b>
<b>Figura 45.</b> Dor avaliada por VAS nas primeiras 10 sessões. Linha azul: resultados do Grupo-Controle. Linha vermelha: resultados do Grupo-Nano. Os 2 grupos com evolução significativa. Diferença entre os grupos: $p = 0,9657$	<b>97</b>
<b>Figura 46.</b> Dor avaliada por VAS em 20 sessões. Linha azul: resultados do Grupo-Controle. Linha vermelha: resultados do Grupo-Nano. Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os dois grupos: $p = 0,77$	<b>98</b>
<b>Figura 47.</b> Rigidez avaliada pelo WOMAC nas primeiras 10 sessões. Linha azul: resultados do Grupo-Controle. Linha vermelha: resultados do Grupo-Nano. Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Grupo-Controle com regressão do quadro	<b>98</b>



- Figura 48.** Rigidez avaliada pelo WOMAC durante 20 sessões. Linha azul: resultados do Grupo-Controle. Linha vermelha: resultados do Grupo-Nano. Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os grupos:  $p = 0,84$ . **99**
- Figura 49.** WOMAC total nas primeiras 10 sessões. Linha verde: resultados do Grupo-Controle. Linha azul: resultados do Grupo-Nano. Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os grupos:  $p = 0,95$  **100**
- Figura 50.** WOMAC Total durante 20 sessões. Linha verde: resultados do Grupo-Controle. Linha azul: resultados do Grupo-Nano. Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os grupos:  $p = 0,58$  **100**
- Figura 51.** Evolução da rigidez articular durante 30 sessões. Linha roxa: resultados do Grupo-Controle. Linha azul: resultados do Grupo-Nano. Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença significativa entre os grupos:  $p = 0,0001$  **101**
- Figura 52.** Evolução da funcionalidade durante 30 sessões. Linha roxa: resultados do Grupo-Controle. Linha azul: resultados do Grupo-Nano. Diferença entre os grupos no final da 30ª sessão:  $p = 0,24$  **102**
- Figura 53a e 53b.** Ressonância Magnética Nuclear: aumento do sinal indicado pela seta vermelha, mostrando a lesão de Grau I da cartilagem patelar do Grupo-Controle. Exame pré-tratamento. Ressonância Magnética Nuclear: igual aumento de sinal indicado pela seta vermelha, mostrando a lesão de Grau I da cartilagem patelar do Grupo-Controle. Exame pós-tratamento com 30 sessões. **103**
- Figura 54a e 54b.** Ressonância Magnética Nuclear: cartilagem com aumento do sinal ou fissura, indicado pela seta vermelha, mostrando a lesão de Grau II da cartilagem patelar do Grupo-Nano. Exame pré-tratamento. Ressonância Magnética Nuclear: cartilagem sem alteração do sinal, mostrando integridade da cartilagem patelar do Grupo-Nano. Exame pós-tratamento com 30 sessões. **103**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> As três classes de proteínas que constituem a matriz cartilaginosa	<b>5</b>
<b>Tabela 2.</b> Classificação das lesões condrais de acordo com a <i>International Cartilage Repair Society</i>	<b>6</b>
<b>Tabela 3.</b> Citocinas mais representativas que agem na cartilagem articular.	<b>9</b>
<b>Tabela 4.</b> Testes de avaliação funcional	<b>10</b>
<b>Tabela 5:</b> Estratégias para um bom resultado cirúrgico nas lesões condrais	<b>19</b>
<b>Tabela 6.</b> Resumo de artigos a respeito de estudos randomizados com o uso tópico de Glucosamina e Condroitina entre os anos de 2003 até 2015	<b>28</b>
<b>Tabela 7.</b> Nanomateriais desenvolvidos para tratamento das lesões condrais e osteocondrais	<b>33</b>
<b>Tabela 8.</b> Reagentes e equipamentos utilizados no desenvolvimento da nanoemulsão	<b>59</b>
<b>Tabela 9.</b> Classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem	<b>62</b>
<b>Tabela 10.</b> Classificação quanto ao potencial de irritabilidade utilizando a metodologia HET-CAM	<b>65</b>
<b>Tabela 11.</b> Amostras avaliadas no CHN antes de serem submetidas à célula de difusão	<b>69</b>
<b>Tabela 12.</b> Amostras avaliadas no CHN após serem submetidas à célula de difusão	<b>69</b>
<b>Tabela 13.</b> Protocolo de exercícios terapêuticos aplicados aos voluntários submetidos ao estudo de eficácia da Nanoemulsão de GS e CS	<b>75</b>
<b>Tabela 14.</b> Produção do sistema com 15 diferentes composições, utilizando Span 80 e butanol (surfactantes), óleo de rícino e água destilada	<b>79</b>
<b>Tabela 15.</b> Produção do sistema com 5 diferentes composições, utilizando Tween 80 e butanol (surfactantes), óleo de rícino e água destilada	<b>80</b>
<b>Tabela 16.</b> Produção do sistema com 5 diferentes composições, utilizando Tween 80 e Transcutol® (surfactantes), óleo de rícino e água destilada	<b>80</b>
<b>Tabela 17.</b> Produção do sistema com 5 diferentes composições, utilizando Tween 80 e Transcutol® (surfactantes), octildodecanol e água destilada.	<b>80</b>
<b>Tabela 18.</b> Produção do sistema com 3 diferentes fases oleosas. Aoctildodecanol; TCC; óleo de rícino	<b>81</b>
<b>Tabela 19.</b> Componentes da formulação	<b>82</b>
<b>Tabela 20.</b> O Diâmetro Hidrodinâmico, o Índice de Polidispersão e o Potencial zeta	<b>83</b>
<b>Tabela 21.</b> Imagens da CAM durante o teste de irritabilidade. Resultados observados em 20 segundos, 2 minutos e 5 minutos	<b>90</b>
<b>Tabela 22.</b> Características gerais dos grupos e nível de significância para	<b>94</b>

suas semelhanças

**Tabela 23.** Médias obtidas pelos grupos para cada variável (grupo e sessão).  
Valores dos participantes que completaram as primeiras 10 sessões **96**

**Tabela 24.** Médias obtidas pelos grupos para cada variável (grupo e  
sessão).Valores dos participantes que completaram as primeiras 20 sessões **96**

**Tabela 25.** Médias obtidas pelos grupos para cada variável (grupo e sessão).  
Valores dos participantes que completaram as 30 sessões de tratamento. **101**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Abreviatura /Sigla</b>	<b>Significado</b>
A/O	Água em Óleo
AAOS	<i>American Academy of Orthopedic Surgeons</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADM	Amplitude de Movimento
AGE	<i>Advanced Glycation End Products</i>
AINE	Anti-Inflamatório Não Esteroides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAM	<i>Chorion Allantonic Membrane</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX	Enzima Ciclo-Oxigenase
CS	<i>Chondroitin Sulfate</i>
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERA	<i>Effective Radiating Area</i>
ESCEO	<i>European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
GAGs	Glicosaminoglicanas
GRADE	<i>Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation</i>
GS	<i>Glucosamine Sulfato</i>
HET-CAM	<i>Hens Egg Test-Chorion Allantonic Membrane</i>
HFA	Hospital das Forças Armadas
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
MI	<i>Mechanical Index</i>

MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Tetrazolio
NICE	<i>National Institute for Health and Care Excellence</i>
O/A	Óleo em Água
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	<i>Polydispersity Index</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
QDs	<i>Quantum dots</i>
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
SFB	Soro Fetal Bovino
SBR	Sociedade Brasileira de Reumatologia
SF-36	<i>Medical Outcomes Study 36 Item Short-Form Health Survey</i>
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor- <math>\alpha</math></i>
UnB	Universidade de Brasília
VAS	<i>Visual Analogue Scale</i>
WOMAC	<i>Western Ontario and McMaster Universities</i>
Zp	<i>Zeta potential</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>04</b>
2.1 CONDROPATIAS DO JOELHO	04
2.1.1 Anatomia das articulações do joelho	04
2.1.2 Fisiopatologia	05
2.1.2.1 <i>Classificação das Lesões</i>	06
2.1.2.2 <i>Degeneração e envelhecimento da cartilagem articular</i>	07
2.1.2.3 <i>Efeito das citocinas na cartilagem articular</i>	08
2.1.3 Diagnóstico Clínico	09
2.1.4 Diagnóstico por Imagens	12
2.1.5 Tratamento Conservador	13
2.1.6 Tratamento Cirúrgico	15
2.2 GLUCOSAMINA E CONDROITINA	18
2.2.1 Características químicas e mecanismo de ação	18
2.2.2 Uso tópico <i>versus</i> uso oral no tratamento das lesões condrais e osteocondrais	21
2.2.3 Uso tópico da Glucosamina e Condroitina	26
2.3 NANOBIOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DAS LESÕES CONDRAIS E OSTEOCONDRAIS	30
2.3.1 Nanomateriais na entrega de fármacos	30
2.3.2 Nanoemulsões tópicas	32
2.3.2.1 Reagentes químicos no desenvolvimento das nanoemulsões	35
2.3.2.2 Caracterização e testes <i>in vitro</i> das nanoemulsões	39
2.4 FONOFORESE E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NANOMATERIAIS	43
2.4.1 Efeitos físicos do ultrassom e suas implicações na entrega transdérmica	43
2.4.1.1 Frequência de onda	43
2.4.1.2 Efeito de cavitação	46
2.4.1.3 Intensidade de onda e efeito térmico	49
2.4.1.4 Ciclo de trabalho, tempo e técnica de aplicação	50
2.4.2 O efeito sinérgico do ultrassom com os nanomateriais	53
2.4.2.1 Vias de penetração dos nanomateriais	53
2.4.2.2 Energia física do ultrassom diminuindo barreiras aos nanomateriais	54
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	57

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>58</b>
4.1 ETAPAS METODOLÓGICAS	59
4.2 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO	59
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOEMULSÃO	60
4.3.1 Análise das propriedades coloidais	60
4.3.2 Avaliação da estabilidade da formulação	61
4.3.3 Análise morfológica por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (Cryo-Tem)	61
4.4 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA <i>IN VITRO</i>	61
4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	61
4.4.1.1 Cultivo celular	61
4.4.1.2. Análise de viabilidade celular pelo método MTT	62
4.4.2 Avaliação do potencial irritativo pelo método HET_CAM	63
4.4.3 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i>	65
4.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i>	68
4.5.1. Metodologia do Estudo Piloto	68
4.5.1.1 Local, tipo de estudo e população	69
4.5.1.2 Amostra de participantes	70
4.5.1.3 Formação dos grupos	70
4.5.1.4 Métodos e materiais de aplicação da fonoforese	73
4.5.1.5 Avaliação dos pacientes	76
4.5.1.6 Critérios de inclusão e exclusão	76
4.5.1.7 Controle dos riscos	77
4.5.1.8 Análise estatística	78
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>79</b>
5.1 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO	79
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	83
5.2.1 Análise das propriedades coloidais	83
Avaliação da estabilidade da formulação	84
5.2.3 Análise da morfologia – Cryo-TEM	87
5.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA <i>IN VITRO</i>	88
5.3.1 Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	88
5.3.2 Avaliação do potencial irritativo pelo método HET_CAM	89
5.3.3 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i>	91

5.4 ESTUDO PILOTO	92
5.4.1 Triagem, alocação e baixas de participantes	92
5.4.2 Características gerais dos grupos e segurança da formulação	93
5.4.3 Avaliação da dor, da rigidez articular e da funcionalidade	95
5.4.3.1 Avaliação da dor (VAS e WOMAC)	97
5.4.3.2 Avaliação da rigidez articular (WOMAC)	98
5.4.3.3 Avaliação da funcionalidade (WOMAC) e WOMAC total	99
5.4.4 VAS e WOMAC após 30 sessões de tratamento	100
5.4.5 Avaliação da modificação da estrutura articular	102
<b>6. DISCUSSÃO</b>	104
6.1 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA <i>IN VITRO</i>	104
6.2 ESTUDO PILOTO	110
6.2.1 Ajustes na metodologia da pesquisa	110
6.2.2 Relevância clínica e significância estatística	112
<b>7. CONCLUSÕES</b>	115
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	116
<b>ANEXO I</b>	142
<b>ANEXO II</b>	143
<b>ANEXO IV</b>	144
<b>ANEXO V</b>	145



## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento das condropatias, ou lesões de cartilagens, ainda é um grande desafio, principalmente pelas próprias características da cartilagem, que promovem um baixo potencial de regeneração. A degeneração das cartilagens, acompanhada de alterações das estruturas ósseas vizinhas, é conhecida como Osteoartrite ou Osteoartrose. Segundo o *American College of Rheumatology (ACR)*, trata-se de uma causa frequente de dor, limitação funcional e pode levar à incapacidade, ocasionando considerável perda da qualidade de vida do indivíduo acometido (Towheed *et al.*, 2005; Jimenez e Dodge, 1997; Mcalindon *et al.*, 2000; Richy *et al.*, 2003; Leeb *et al.*, 2000).

O impacto socioeconômico da osteoartrite de joelho é mundialmente significativo, já que é uma das mais importantes causas de absenteísmo ao trabalho, além de gerar altos custos com tratamentos cirúrgicos nas formas avançadas. Os procedimentos conservadores são geralmente a primeira abordagem para tratar os sintomas das lesões no joelho e estes incluem fisioterapia, perda de peso e medicações (Altman *et al.*, 1990; Bastiaansen-Jenniskens *et al.*, 2008; Rosneck *et al.*, 2007).

Com relação às terapias farmacológicas para tratamento dessas lesões, relata-se a respeito dos fármacos modificadores de sintomas, que têm sua ação relacionada à melhora da dor e da função motora, como também, os fármacos modificadores de estrutura, que mostram mudanças estruturais nos espaços articulares. A alternativa de tratamento com agentes modificadores de estrutura – tais como os sulfatos de condroitina (*Chondroitin Sulfate - CS*) e glucosamina (*Glucosamine Sulfate - GS*) –, é comumente prescrita para os pacientes e vem sendo muito pesquisada (Wilson *et al.*, 2015; McAlindon e Underwood, 2014; Jevsevar, 2013). Meta-análises apontam que esses fármacos, usados via oral, têm eficácia superior à do placebo, com efeito predominante no alívio dos sintomas, mas os efeitos como modificadores de estrutura ainda são incertos (Towheed *et al.*, 2005; Jimenez e Dodge, 1997; Mcalindon *et al.*, 2000; Richy *et al.*, 2003; Leeb *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2015; McAlindon e Underwood, 2014; Jevsevar, 2013).

Nesse contexto, a utilização da via transdérmica para administração de GS e CS pode oferecer vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às

outras vias de administração. O metabolismo de primeira passagem hepática, comum para fármacos administrados pela via oral, é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. A via transdérmica impede que esse efeito de primeira passagem hepática ocorra (Silva *et al.*, 2010). Acrescente-se que a via transdérmica oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (Badran *et al.*, 2009; Chorilli *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2009).

Por outro lado, existem recursos físicos que podem aumentar o poder de penetração do fármaco através da pele. A associação do ultrassom com medicamentos tópicos, técnica que recebe o nome de fonoforese, é comumente utilizada por fisioterapeutas e representa uma forma transdérmica de administração de medicamentos. Esse recurso terapêutico consiste no método de aplicação direta, utilizando uma substância com propriedades terapêuticas, objetivando sua introdução através da pele, com ajuda da energia ultrassônica (Bare *et al.*, 1996; Trommer e Neubert, 2006; Polat *et al.*, 2010). Wu *et al.* (1998) revelaram que o ultrassom induziu um novo estado estrutural no estrato córneo humano. Verificaram que as dimensões dos defeitos foram de cerca de 20 microns, suficientemente grandes para permitir a passagem transdérmica de moléculas de alto peso molecular. Desde então, muitas pesquisas já ocorreram com diferentes drogas no tratamento de tendinites, bursites e epicondilites (Saliba *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Shiran *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Barja e Veloso, 2010; Silveira *et al.*, 2010; Kaya *et al.*, 2010; Meshali *et al.*, 2011; Gurney *et al.*, 2011).

Ainda nesse sentido, ressalta-se que o desenvolvimento de nanomateriais levou a melhorias na estabilidade das emulsões, com aumento da vida útil da medicação e redução do risco de separação entre as fases óleo e água (Zhao *et al.*, 2009; Morey *et al.*, 2006; Silva, Bedor *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012; Figen *et al.*, 2012; Kalaitzaki *et al.*, 2014; Tirnaksiz *et al.*, 2012; Schmidts *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014). A nanotecnologia envolve o design, a produção, caracterização e aplicações de materiais cujas dimensões estão em escala nanométrica, por isso chamados de nanomateriais (Baroli *et al.*, 2007).

Dessa forma, os estudos com fonoforese mudaram de direção. O novo alvo da pesquisa em entrega transdérmica é o de melhorar a permeação de

nanopartículas com ajuda de um tipo de agente físico. Um dos primeiros estudos, avaliando o efeito sinérgico de nanomateriais com o ultrassom, investigou lipossomas contendo diclofenaco incorporados em uma base de pomada para aplicação tópica. A disponibilidade sistêmica de fármaco após aplicação foi avaliada em ratos e foi melhor quando associado ultrassom com nanomateriais (Vyas *et al.*, 1995). Desde então, o efeito sinérgico do ultrassom e dos nanomateriais vem sendo estudado e os resultados são promissores no que se refere ao aumento na disponibilidade sistêmica do fármaco (Lee *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2011; Victor *et al.*, 2012; Prato *et al.*, 2015; Zortéa *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2016).

Este projeto foi proposto considerando principalmente que existe a necessidade de novas propostas de tratamento para as condropatias do joelho e suas complicações. Essa afecção ainda é um grande desafio, principalmente pelas próprias características da cartilagem, que promovem um baixo potencial de regeneração. O impacto socioeconômico da osteoartrite de joelho (grau avançado da condropatia) é mundialmente significativo, já que é uma das mais importantes causas de absenteísmo ao trabalho, além de gerar altos custos com tratamentos cirúrgicos, nas formas avançadas. Em relação aos efeitos da glucosamina e condroitina, a maioria das pesquisas avalia sua administração oral e tem mostrado resultados incertos. Percebe-se, então, a importância de considerar as vantagens da administração transdérmica e desenvolver novas formulações para aplicações desses fármacos, explorando essa via de administração. Existe uma carência de relatos na literatura do uso da glucosamina e condroitina em veículo tópico. E ainda não há ensaios clínicos na literatura que avaliam os resultados desses fármacos em veículo tópico com nanotecnologia. Outros relatos na literatura mostram que o ultrassom pode melhorar a entrega transdérmica de nanomateriais. Todos esses fatores motivaram a escolha do tema e o desenvolvimento da pesquisa.

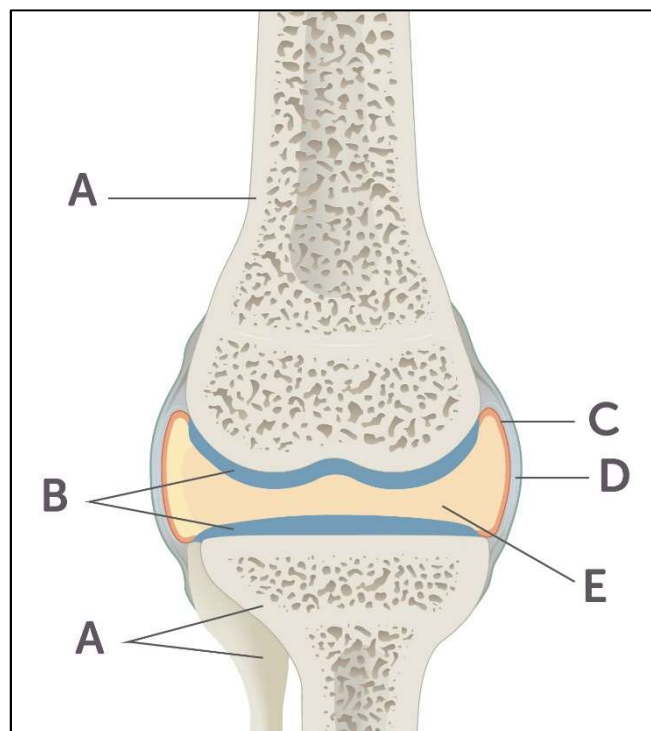
Diante do exposto e considerando que existe a necessidade de novas propostas de tratamento para as condropatias, que existe também uma carência de relatos na literatura do uso tópico desses fármacos, e que não há relato na literatura de ensaios clínicos utilizando a GS e CS em veículo nanoestruturado, o objetivo geral desta pesquisa é avaliar o efeito da nanoemulsão tópica desses fármacos, associada ao ultrassom e à cinesioterapia, na reabilitação do joelho de humanos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CONDROPATIAS DO JOELHO

#### 2.1.1 Anatomia das articulações do joelho

As articulações do joelho desempenham um papel fundamental no movimento humano, são as maiores e mais complexas articulações do corpo, e no movimento vertical suportam o peso no andar ou correr. O joelho é composto de duas articulações, a fêmuro-patelar e a fêmuro-tibial. São articulações sinoviais, por isso, apresentam uma grande variedade de movimentos. A Figura 1 ilustra uma articulação sinovial com suas estruturas fundamentais: cartilagem articular, membrana sinovial, cápsula articular e líquido sinovial (Tamer, 2013).



**Figura 1.** Estruturas de uma articulação sinovial: A: Osso; B: Cartilagem articular; C: Membrana sinovial; D: Cápsula articular; E: Líquido sinovial. Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa capacidade do joelho em suportar o peso corporal e amortecer o impacto deve-se à ação da cartilagem articular, uma camada lisa de hialina que envolve as extremidades dos ossos. A alta capacidade de retenção de água e as interações entre os componentes poliméricos que constituem o tecido cartilaginoso conferem à cartilagem essa propriedade de absorção do impacto. Outra

característica da cartilagem articular é a capacidade de resistência à compressão e tração, e essa função deve-se às interações entre os seus constituintes descritos na Tabela 1. Os principais constituintes da matriz cartilaginosa são representados por 3 classes de proteínas (Servaty *et al.*, 2001; Tamer, 2013). O líquido sinovial tem a função biológica lubrificante e fornece os nutrientes e as citocinas reguladoras. As moléculas presentes no líquido sinovial reduzem a fricção e o desgaste das superfícies das cartilagens. Esse líquido está contido na membrana sinovial e na cápsula articular (Musumeci *et al.*, 2014).

**Tabela 1.** As 3 classes de proteínas que constituem a matriz cartilaginosa.

---

**Principais constituintes da matriz cartilaginosa**

---

- Colágeno (principalmente do tipo II);
  - Proteoglicanos (principalmente agrecanos);
  - Proteínas não-colágenas (proteínas de ligação, fibronectina, proteína oligomérica).
- 

### 2.1.2 Fisiopatologia

A cartilagem articular é um tecido sem suprimento vascular, nervoso ou linfático, o que pode justificar a sua baixa capacidade de regeneração. É universalmente conhecido que a cartilagem, uma vez destruída, tem poucas possibilidades de sua regeneração. Em algumas específicas situações, com defeitos de pouca espessura, pode ocorrer regeneração, principalmente se os meniscos estiverem íntegros (Mesquita *et al.*, 2007).

Lesões condrais são lesões provocadas por degradação de cartilagem articular, em resposta aos estímulos metabólicos, genéticos, vasculares e traumáticos, podendo ocorrer devido a um único episódio de excesso de carga na articulação do joelho ou por causa de vários episódios cíclicos de pequena magnitude. Essas lesões são subdivididas de acordo com a espessura acometida, que vão desde microlesão, lesão condral, até lesão osteocondral, envolvendo todas as camadas da cartilagem articular, atingindo o osso subcondral. A lesão osteocondral é conhecida como Osteoartrite ou Osteoartrose (Cavalcanti *et al.*, 2012; Bastiaansen-Jenniskens *et al.*, 2008).

### 2.1.2.1 Classificação das lesões

Historicamente, as lesões de cartilagem já foram classificadas em diferentes formas. Em 1961, Outerbridge classificou as alterações macroscópicas em 4 graus: Grau I – amolecimento da cartilagem; Grau II – fragmentação e fissura em área de 1,5 cm de diâmetro ou menos; Grau III – fragmentação e fissura em área superior a 1,5 cm de diâmetro; e Grau IV – lesão que compromete toda a espessura da cartilagem com exposição do osso subcondral (Outerbridge, 1961).

Existem outras classificações mais detalhadas e abrangentes (Peterson *et al.*, em 2000). A *International Cartilage Repair Society* (ICRS) desenvolveu seu sistema de classificação a partir da obra de Brittberg *et al.* (1994). Essa classificação vem sendo utilizada por muitos pesquisadores na avaliação do grau de lesão condral. Descrição apresentada na Tabela 2.

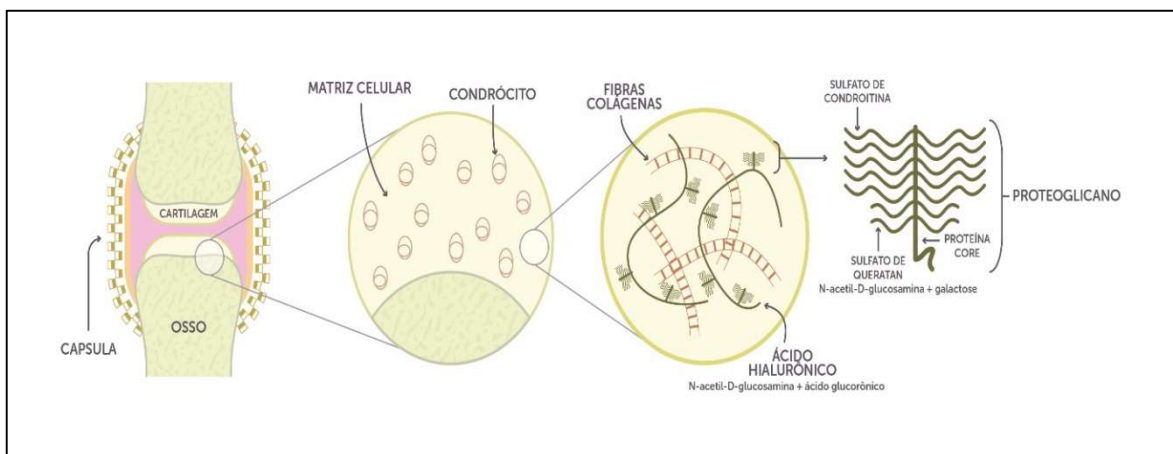
**Tabela 2.** Classificação das lesões condrais de acordo com a *International Cartilage Repair Society*.

Classificação	Grau
Normal	Grau 0.
Quase normal	Grau 1a – Lesões superficiais/amolecimento; Grau 1b – 1a e/ou fissuras ou fendas superficiais.
Anormal	Grau 2 – Extensão < 50% espessura. Grau 3a – Extensão > 50% espessura;
Lesão grave	Grau 3b – Até a camada calcificada; Grau 3c – Até a superfície do osso subcondral (sem penetração); Grau 3d – Inclui abaulamento da cartilagem ao redor da lesão.
Lesão muito grave	Grau 4a – Penetração do osso subcondral – não no diâmetro total da lesão; Grau 4b – Penetração do osso subcondral – em todo o diâmetro da lesão.

### 2.1.2.2 Degeneração e envelhecimento da cartilagem articular

A degeneração da cartilagem articular é iniciada com uma lesão local, provocando ruptura ou alteração da composição da matriz. As primeiras alterações incluem a perda de proteoglicanos. Os danos iniciais estimulam os condrócitos à proliferação da cartilagem articular. Quando ativados, os condrócitos produzem mediadores inflamatórios. Dando continuidade às reações, a fibronectina, os proteoglicanos e o colágeno são degradados e seus fragmentos estimulam, ainda mais, a destruição da matriz (Loeser, 2009).

Ao relacionar a degeneração da cartilagem articular com o envelhecimento, é importante relatar que a capacidade das células manterem o tecido saudável pode ser dependente do fator idade. O desgaste da cartilagem pode ocorrer paralelamente a decrescente hidratação durante o envelhecimento (Martin e Buckwalter, 2001; Loeser *et al.*, 2016). Os agreganos, altamente hidrofílicos, moléculas com inúmeras cargas negativas dos sulfatos que as constituem, são responsáveis pela manutenção do elevado conteúdo de água na cartilagem. As alterações nos agreganos provavelmente contribuem para a perda de resiliência e hidratação (Loeser *et al.*, 2012; Johnson e Hunter, 2014). A Figura 2 ilustra esses constituintes da cartilagem articular.



**Figura 2.** Constituintes da cartilagem articular. Em destaque a cartilagem articular, a matriz cartilaginosa e seus constituintes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Além da marcante desidratação, ressalta-se o processo de glicação. Nesse processo, os carboidratos ou os lipídeos ligam-se permanentemente às proteínas, sem a atuação de uma enzima, fazendo com que as proteínas sofram modificações.

Essa resposta levará à formação de *Advanced Glycation End Products (AGEs)* – Produtos Finais de Glicação Avançada –, substâncias responsáveis pela aceleração do envelhecimento. A acumulação dos produtos finais de glicação avançada resultará num aumento da formação de ligações com as moléculas de colágeno. Essas ligações, por sua vez, resultam num aumento da rigidez, alterando as propriedades biomecânicas (Chen *et al.*, 2002).

Um estudo espanhol publicado em 2014, com mais de 3 milhões de indivíduos, examinou a incidência de osteoartrite clinicamente diagnosticada e relatou que a osteoartrite de mão em mulheres tem um pico entre 60 e 64 anos, enquanto que a osteoartrite de quadril e joelho continuaram a aumentar com o avanço da idade (Prieto-Alhambra *et al.*, 2014). Um estudo realizado nos EUA usando dados do *National Health Entrevista Survey* relatou que a osteoartrite de joelho atingiu um pico entre as idades de 55 e 64 anos e a lesão aumentou com a idade de 85 anos ou mais (Losina *et al.*, 2013). Outros pontos a serem relatados referem-se à perda da massa muscular e ao ganho de massa gorda. Esses representam mudanças naturais com o processo de envelhecimento do organismo, e podem contribuir ainda mais para a progressão da osteoartrite, devido ao peso que é exercido sobre as articulações (Delmonico *et al.*, 2009; Messier *et al.*, 2011).

### 2.1.2.3 Efeito das citocinas na cartilagem articular

Quando o contínuo dano molecular é superior à atividade biossintética dos condrócitos articulares, o equilíbrio é quebrado. Esse desequilíbrio tem como consequência a manifestação dos efeitos das citocinas. Existem evidências de que citocinas inflamatórias, tais como a Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) provocam danos no DNA mitocondrial contribuindo para a morte celular. Lesões mecânicas na cartilagem resultam em um aumento da produção de radicais livres de oxigênio de origem mitocondrial, que por sua vez podem promover a morte dos condrócitos (Mueller e Tuan, 2011; Kim *et al.*, 2010; Goodwin *et al.*, 2010).

Apesar do efeito agressor implícito das citocinas, não deve ser desconsiderado o papel anti-inflamatório de algumas destas moléculas, que podem modular a resposta inflamatória, atuando de forma a proteger o tecido lesado. Assim, as citocinas podem ser divididas segundo a sua natureza inflamatória ou anti-



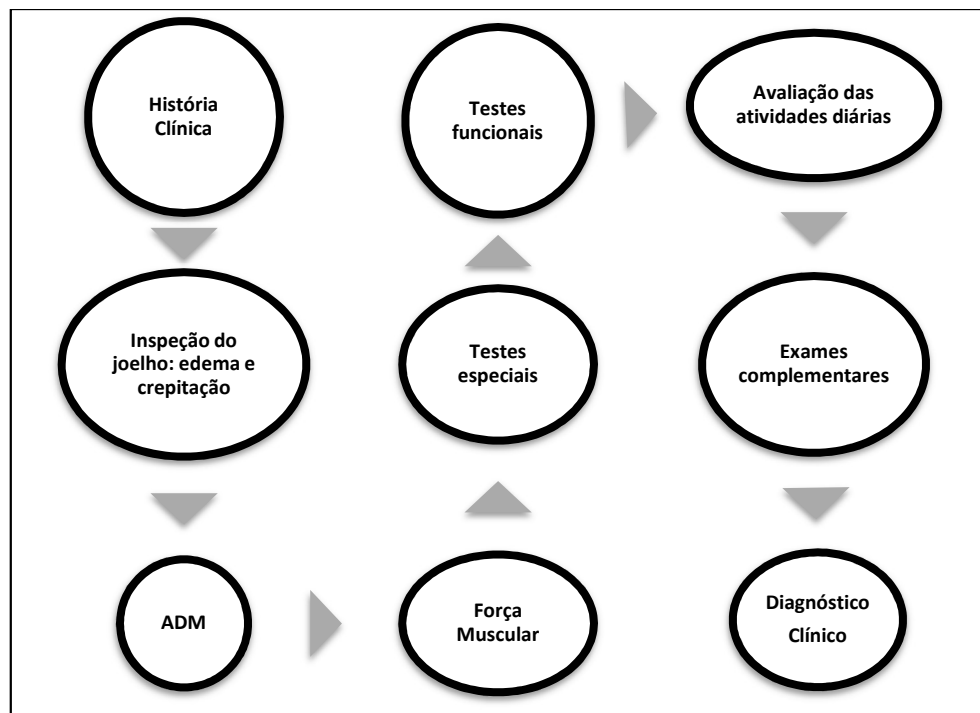
inflamatória e são descritas na Tabela 3 (Wojdasiewicz et al., 2014). As citocinas, juntas com as quimiocinas, são mediadores inflamatórios solúveis produzidos localmente pelas células das articulações e são encontrados em concentrações elevadas no líquido sinovial, originando as sinovites características nos estados mais avançados de osteoartrite (Loeser *et al.*, 2012).

**Tabela 3.** Citocinas mais representativas que agem na cartilagem articular.

Citocinas	Tipos mais representativos
Citocinas inflamatórias	IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-15, IL-17 e IL-18.
Citocinas anti-inflamatórias	IL-4, IL-10 e IL-13.

### 2.1.3 Diagnóstico clínico

A avaliação clínica associada aos exames complementares, frequentemente, definem a conduta a ser adotada. A história e um cuidadoso exame físico fornecem a maior parte das informações necessárias para diagnosticar lesões de joelho. Alguns testes provocativos podem ser feitos para o diagnóstico da lesão (Conrad e Stanitski, 2003). A Figura 3 cita as etapas para se chegar ao diagnóstico clínico.



**Figura 3.** Etapas do processo de avaliação do paciente com condropatias ou osteoartrite do joelho: da História Clínica até a obtenção do Diagnóstico Clínico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação por meio de testes funcionais (Tabela 4) é importante para complementar o diagnóstico e auxiliar nas tomadas de decisão em relação ao tratamento e no processo de reabilitação. Esses testes tentam se aproximar das atividades que normalmente são realizadas no dia a dia, como por exemplo subir e descer escadas, levantar e sentar da cadeira e caminhar e mudar de direção durante a caminhada (Dobson *et al.*, 2013).

**Tabela 4.** Testes de avaliação funcional.

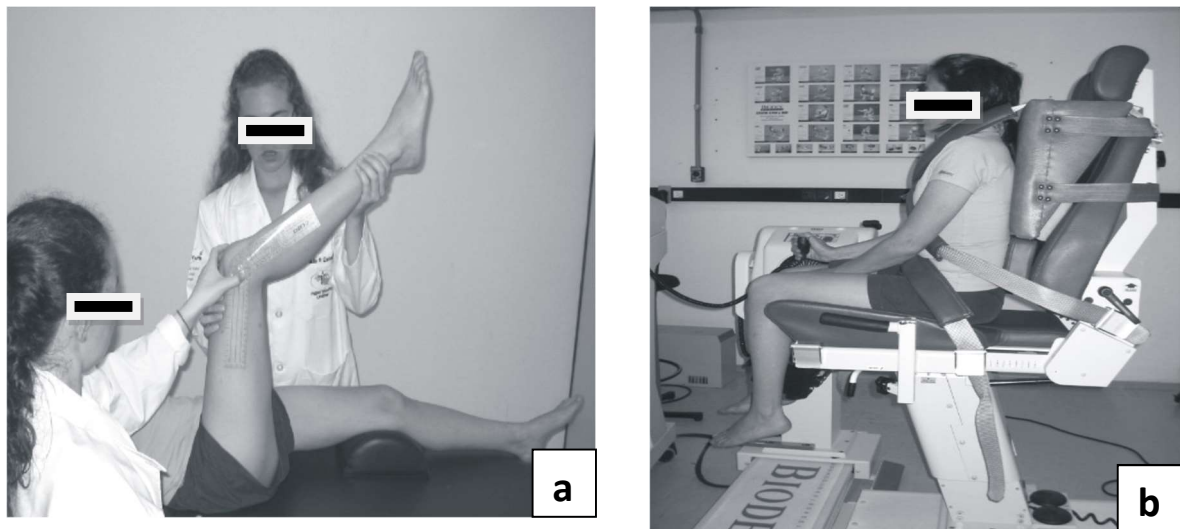
Teste de sentar e levantar da cadeira	Sentar e levantar da cadeira, em um período de 30 segundos. Realizar o maior número possível de repetições do movimento.
Teste de caminhada rápida de 40 metros	Caminhada rápida em uma distância curta, com mudança de direção durante a caminhada e ritmo acelerado. Em uma distância total de 40 metros.
Teste de subir e descer escada	Subir e descer uma escada no menor tempo possível. O indivíduo posicionado na frente da escada, e ao sinal deverá subir os degraus indicados, e descer, podendo utilizar o corrimão como instrumento de segurança.
<i>Time up and go test</i>	Levantar da cadeira, caminhar o mais rapidamente possível em volta do cone, retornar à cadeira e sentar. A cadeira é posicionada contra a parede e em frente será colocado um cone.
Teste de caminhada de 6 minutos	Caminhar, sem correr, e ao final de 6 minutos marcar a distância percorrida.

Fonte: Dobson *et al.*, 2013

A verificação da Amplitude de Movimento Articular identifica as limitações articulares, bem como permite aos profissionais acompanharem de modo quantitativo a eficácia das intervenções terapêuticas. O goniômetro universal é o instrumento mais utilizado para medir a amplitude do movimento. Há também outros instrumentos, como o dinamômetro isocinético. Batista *et al.* (2006) fizeram um estudo analisando a correlação entre as medidas de amplitude articular na articulação do joelho, realizadas com o goniômetro universal e com o dinamômetro isocinético, e concluíram que os dois recursos de avaliação da amplitude articular podem fornecer informações confiáveis. Os recursos de mensuração da amplitude articular podem ser visualizados nas Figuras 4a e 4b.

A avaliação da qualidade de vida também é uma das ferramentas utilizadas para acompanhar a eficácia dos tratamentos nos pacientes com lesões de joelho.

Para isso, geralmente são utilizados dois questionários, o *Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC)* e o *Medical Outcomes Study 36 Item Short-Form Health Survey (SF-36)*. São questionários já adaptados e validados no Brasil. O SF-36 contém 36 questões que são agrupadas em oito domínios, cujo escore varia de zero a 100, no qual zero corresponde ao pior estado geral de saúde e 100 ao melhor. O WOMAC é um questionário que avalia a percepção da dor, da rigidez articular e da funcionalidade, com base nas 48 horas que antecedem sua aplicação. Quanto mais elevado o escore, maior é o comprometimento articular (Gomes-Neto *et al.*, 2016).



**Figura 4a.** ADM sendo verificada com goniômetro universal. **Figura 4b.** ADM sendo verificada com dinamômetro isocinético. Fonte: Batista *et al.*, 2006.

O WOMAC é muito empregado nos Estados Unidos e Canadá, sendo amplamente recomendado pelo Colégio Americano de Reumatologia e pela Sociedade de Pesquisa em Osteoartrite. Outro instrumento também utilizado é o Índice Lequesne. Esse último foi desenvolvido na França nos anos 1970, e é recomendado internacionalmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Liga Europeia de Reumatologia para avaliação das articulações do quadril e do joelho (Santos *et al.*, 2015). Ressalte-se a Escala Visual Analógica de Dor (*Visual Analogue Scale - VAS*), outro método utilizado para quantificar o grau de dor do paciente. A VAS tem conceito de validade da mensuração de dor, sendo utilizada e aceita internacionalmente para avaliar resultados de um tratamento (Serban *et al.*, 2016; Raeissadat *et al.*, 2018).

### 2.1.4 Diagnóstico por imagens

O exame radiológico pode ser importante na exclusão de outras patologias e lesões associadas (presença de osteófitos, cistos, escleroses subcondrais e redução do espaço articular) e fraturas. O exame de Raios-x possibilita também a visualização de uma lesão condral completa, com um fragmento solto na cavidade articular, patologia conhecida como osteocondrite dissecante. A Figura 5 demonstra um caso de osteoartrite avançada diagnosticada pelo exame de Raios-x. A Tomografia e a Artrotomografia, basicamente têm as mesmas indicações de diagnóstico que a Radiografia, sendo que a injeção de contraste intra-articular (Artrotomografia) demonstra diretamente a presença de lesões condrais. A Artroscopia é um exame de escolha para avaliação das patologias intra-articulares do joelho. Ela possibilita classificar, localizar e palpar as lesões através da utilização de instrumental (Rand *et al.*, 2000; McCauley *et al.*, 2001; Cavalcanti *et al.*, 2012).

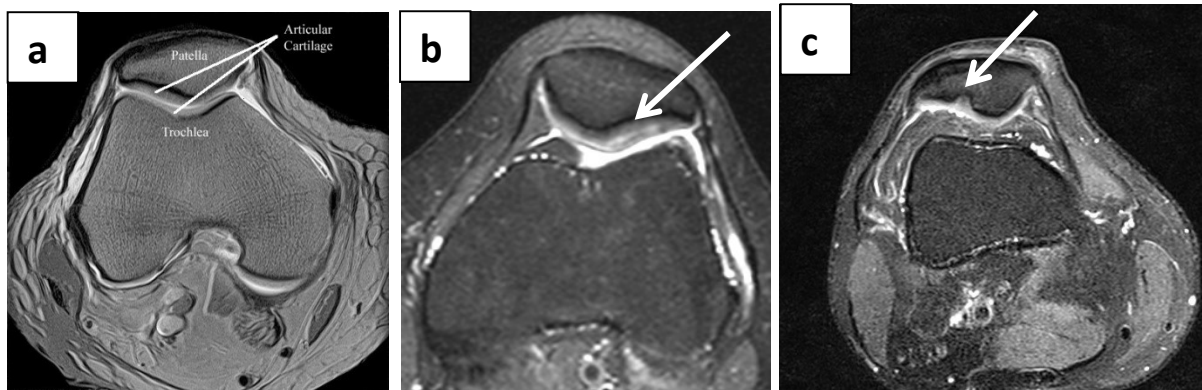


**Figura 5.** Radiografia de joelho direito AP e Perfil mostrando desgaste do Platô-tibial e estreitamento do espaço articular. Fonte: Garrido *et al.*, 2011.

A Ressonância Nuclear Magnética (RNM), com seu excelente contraste de partes moles, é a melhor técnica de imagem disponível para estudo das lesões de cartilagem. Permite uma avaliação morfológica da superfície, da espessura, do volume e do osso subcondral (Gold *et al.*, 2003). A alta especificidade e sensibilidade do método é fruto da obtenção de imagens de alta definição, em múltiplos planos de estudo, associada a uma grande capacidade de caracterização

tecidual. E ainda tem grande vantagem de não ser um método invasivo (Muglia *et al.*, 2001). As Figuras 6a, 6b e 6c demonstram a especificidade da RNM.

O estudo direto da cartilagem através da RNM é indicado, principalmente, nos casos precoces de condropatias, com pouca ou nenhuma alteração à radiografia simples. Entretanto, os achados de imagem devem ser valorizados apenas em conjunto com a sintomatologia do paciente, com intuito de se evitar tratamentos desnecessários. A RNM fornece informações sobre a espessura condral, alterações morfológicas da superfície condral, alterações de sinal intrassubstanciais da cartilagem e também avalia alterações do osso subcondral (Rodrigues e Camanho, 2010).



**Figura 6a.** Cartilagem íntegra (sinal e contornos normais). **Figura 6b.** Cartilagem com aumento do sinal (lesão grau II ou III). **Figura 6c.** Cartilagem com fissura ou erosão condral e óssea (grau IV). Fonte: <http://radsources.us/osteoarthritis-0a-of-the-knee>

### 2.1.5 Tratamento conservador

Diversas diretrizes nacionais e internacionais foram desenvolvidas para ajudar os profissionais da saúde e pacientes na escolha da terapêutica. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) formulou, em 2003, um consenso para o tratamento de vários graus de lesões condrais e osteocondrais. A *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI), em 2012, publicou seu guia de recomendações, com metodologia mais rígida. Em geral, as recomendações para o tratamento dessas lesões é iniciado de forma conservadora, ficando o tratamento cirúrgico reservado para pacientes com fragmentos condrais destacados, com bloqueio do arco de movimento, ou pacientes refratários ao tratamento conservador (Rezende e Gobbi, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2012).

O melhor tratamento requer uma combinação de medidas farmacológicas e não farmacológicas. Os pacientes devem ter acesso aos objetivos do tratamento e a importância de mudanças no estilo de vida, exercícios, adequação das atividades, redução de peso e outras medidas para diminuir o impacto sobre as articulações lesadas. Os procedimentos conservadores são geralmente a primeira abordagem para tratar os sintomas das lesões no joelho e estes incluem fisioterapia, perda de peso e medicações para o alívio da dor (Rezende e Gobbi, 2009; Rosneck *et al.*, 2007).

Pacientes podem se beneficiar do encaminhamento à fisioterapia para avaliação e instrução de exercícios apropriados para reduzir a dor e aumentar a capacidade funcional. A fisioterapia mantém a amplitude de movimento, favorecendo a nutrição da cartilagem e fortalecendo o membro afetado (Detterline *et al.*, 2005). A Figura 7 ilustra um fluxograma representativo das principais ações que fazem parte do tratamento conservador do joelho.



**Figura 7.** Fluxograma com as principais ações do tratamento conservador do joelho.

### 2.1.6 Tratamento Cirúrgico

A medicina conta com técnicas cirúrgicas não reparativas e não restaurativas que podem ser realizadas nos casos de defeitos condrais parciais, visando promover uma superfície mais regular. Estes procedimentos são feitos para minimizar a dor e melhorar a mobilidade, mas não restauram completamente a estrutura e as funções de cartilagem (Altman e Gray, 1983). Uma das técnicas é o desbridamento que envolve a remoção de fragmentos, excesso de sinóvia, meniscos degenerados e ligamentos rompidos. É realizado geralmente com o *shaver*, ou com o eletrocautério, laser e radiofrequência. A técnica destina-se a eliminar os sintomas, promovendo o alívio da dor e a melhora das funções. No entanto, o retorno dos sintomas é esperado (Caffey *et al*, 2005).

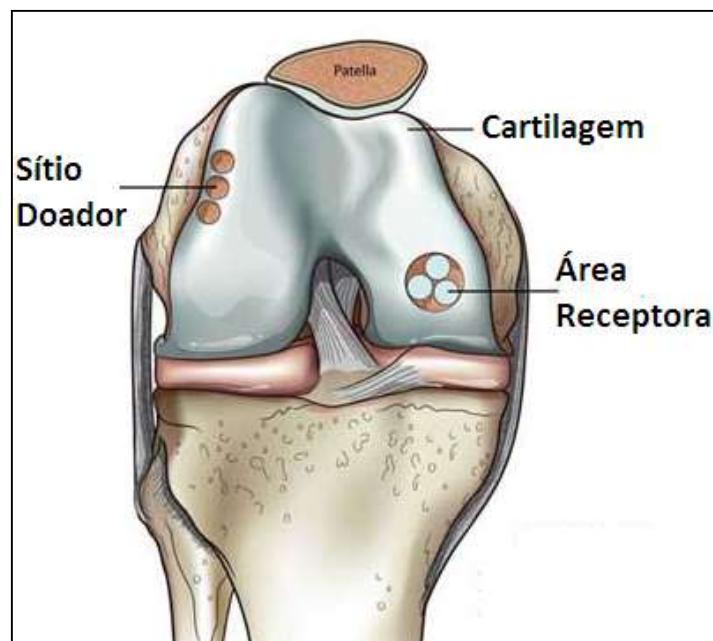
A radiofrequência é uma alternativa também utilizada para o tratamento das lesões condrais parciais. No entanto, a alta temperatura intra-articular associada a este método pode ter potencial de destruir parcialmente ou completamente a cartilagem articular. Temperaturas acima de 50°C foram definidas como um limiar crítico para a morte dos condrocitos. A ocorrência de necrose associada com o uso da radiofrequência depende da quantidade e do tempo da aplicação da energia. Nos últimos anos, radiofrequências com indicadores de temperaturas têm sido desenvolvidas, para que a temperatura possa ser monitorada durante a artroscopia (Caffey *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2002). Spahn *et al.* (2008) fizeram um estudo randomizado, controlado e prospectivo, comparando o uso de radiofrequência e o desbridamento mecânico nas lesões condrais do joelho, e concluíram que todos os pacientes foram beneficiados por ambos os tratamentos, embora os pacientes tratados com a radiofrequência tivessem resultados superiores aos pacientes tratados por desbridamento mecânico no primeiro ano de após a cirurgia.

Por outro lado, nos casos em que há lesões mais complexas da cartilagem, outras técnicas cirúrgicas são indicadas. Pesquisadores acreditam que a estimulação do osso subcondral, com pequenas perfurações, orifícios ou desbridamento, possa liberar células mesenquimais da medula óssea, promovendo a formação de um novo tecido. Nesse sentido, aplicam-se técnicas cirúrgicas conhecidas como a técnica de Abrasão, a técnica Drilling e a Microfratura. As perfurações penetram aproximadamente 3 mm com a intenção de promover a

formação de um coágulo de células mesenquimais provenientes da medula óssea. A melhor indicação é para defeitos menores que 2 cm<sup>2</sup>, porém, melhora da sintomatologia também pode ser alcançada em defeitos de até 4 cm<sup>2</sup>. Melhores prognósticos são encontrados em pacientes jovens com defeitos nos côndilos femorais (Nehrer e Minas, 2000; Kessler *et al.*, 2008; Mithoefer e Steadman, 2006).

As técnicas de transplantes também são muito estudadas por cirurgiões e pesquisadores. A técnica de cartilagem picada (*minced cartilage*) tem como princípio conseguir cartilagem do tipo hialina através da reparação das lesões condrais, com a utilização de “fragmentos picados” de cartilagem hialina de uma área não lesada e de não carga, muitas vezes autólogas. Uma pequena quantidade de cartilagem picada pode criar condrócitos suficientes para tratar defeitos relativamente grandes. Especificamente, esta técnica requer apenas um décimo da quantidade de cartilagem que originalmente preenchia o defeito (McCormick *et al.*, 2008; Gobbi *et al.*, 2010).

O transplante autólogo osteocondral, ou mosaicoloplastia, é um procedimento artroscópico, em que um ou múltiplos cilindros osteocondrais são retirados de uma área sem descarga de peso para a área do defeito osteocondral. Técnica ilustrada na Figura 8.



**Figura 8.** Ilustração de enxerto osteocondral autólogo/mosaicoplastia.  
Fonte: <http://arizekcer.com.br/2014/10/enxerto-ostecondral-autologo.jpg>



O melhor cenário é a possibilidade de usar apenas um cilindro que preencha totalmente o defeito osteocondral. A mosaicoplastia visa aproveitar a boa cicatrização osso-osso para facilitar a cicatrização da cartilagem. Tem indicação para defeitos osteocondrais de 1 a 4 cm<sup>2</sup>. A taxa de sucesso diminui significativamente em pacientes mais velhos. Pode ocorrer morbidade no sítio doador (Hangody e Kárpáti, 1994; Hangody e Füles, 2003; Marcacci *et al.*, 2007; Gudas *et al.*, 2006; Huntley *et al.*, 2005).

Pesquisadores realizaram um estudo prospectivo comparando a mosaicoplastia e a microfratura em 70 pacientes. Os pacientes foram avaliados artroscopicamente, histologicamente, com exames de imagem e com avaliação da função motora. Concluíram que houve melhora estatisticamente significativa nos pacientes submetidos a mosaicoplastia em relação ao grupo da microfratura, 12 meses após o procedimento cirúrgico (Gudas *et al.*, 2006). Os mesmos pesquisadores, após acompanhamento de 3 a 10 anos da evolução clínica dos pacientes, perceberam que a técnica de mosaicoplastia na população atlética permitiu uma maior taxa de retorno e manutenção de esportes no nível pré-ferimento em comparação com o grupo que recebeu microfratura (Gudas *et al.*, 2012).

Por outro lado, outros pesquisadores acompanharam por mais de 3 anos pacientes que se submeterem à técnica de mosaicoplastia ou microfratura e concluíram que, em longo prazo, não houve diferenças significativas entre os pacientes tratados com microfratura e os pacientes tratados com mosaicoplastia, nos resultados relatados pelos pacientes, na força muscular ou no resultado radiológico (Ulstein *et al.*, 2014; Knutsen *et al.*, 2007).

Uma segunda geração do transplante autólogo de condrócitos traz vantagens em relação à primeira, uma vez que não há a necessidade do uso do perióstio e utiliza-se de uma matriz na qual os condrócitos são cultivados, matriz essa que possui características semelhantes às da matriz extracelular da cartilagem (Cavalcanti *et al.*, 2012). Pesquisadores comparando transplantes autólogos de condrócito de segunda geração com microfratura, com *follow-up* de no mínimo 36 meses, concluíram que o tratamento das lesões condrais realizado por transplante autólogo de condrócitos obteve um resultado significativamente melhor (Basad *et al.*, 2010; Saris *et al.*, 2009).

O enxerto osteocondral alógeno de cadáveres também é uma opção de tratamento para os defeitos osteocondrais, sendo semelhante à técnica de mosaicoplastia, porém é utilizado em defeitos maiores, apresentando a vantagem que pode ser feito com apenas um único cilindro osteocondral. As desvantagens de um transplante alógeno incluem rejeição imunológica, falha da incorporação óssea e a não viabilidade dos condrócitos (Davidson *et al.*, 2010; LaPrade *et al.*, 2009; McCulloch *et al.*, 2007) Em lesões maiores que 4 cm<sup>2</sup>, o transplante alógeno osteocondral é uma boa opção. Pacientes ativos apresentam melhores resultados após transplante autólogo osteocondral quando comparado com a microfratura. Os pacientes mais jovens (< 30 anos de idade) parecem se beneficiar mais, independentemente da cirurgia de reparação da cartilagem, quando comparados com pacientes maiores de 30 anos de idade (Jones e Peterson, 2006; Bekkers *et al.*, 2009; Farr *et al.*, 2011).

Em resumo, são destacados os critérios para escolha da técnica cirúrgica. Em termos gerais recomendam que, para lesões entre 1 e 2,5 cm<sup>2</sup>, a microfratura é uma boa opção de tratamento, assim como a mosaicoplastia, desde que o enxerto fique paralelo à superfície articular. Acredita-se que a microfratura pode ser usada em pacientes menos ativos; já em casos de pacientes mais ativos, a mosaicoplastia pode oferecer um melhor reparo cartilaginoso. Já em lesões maiores que 2 cm<sup>2</sup>, o transplante autólogo de condrócitos é o procedimento mais indicado. A Tabela 5 mostra algumas estratégias na hora de escolher a técnica mais indicada, segundo pesquisadores (Farr *et al.*, 2011; Jones e Peterson, 2006).

## 2.2 GLUCOSAMINA E CONDROITINA

### 2.2.1 Características químicas e mecanismo de ação

Para compreender o mecanismo de ação dos fármacos em estudo, é preciso primeiramente discutir conceitos a respeito da cartilagem hialina. A cartilagem do tipo hialina apresenta moderada quantidade de fibras colágenas. É justamente essa quantidade de fibras colágenas que a diferencia da cartilagem do tipo fibrosa (elevada quantidade de fibras colágenas) e da cartilagem do tipo elástica (poucas fibras colágenas e grande quantidade de fibras elásticas). A cartilagem hialina é a mais comum estrutura cartilaginosa encontrada no corpo, ela reveste as grandes

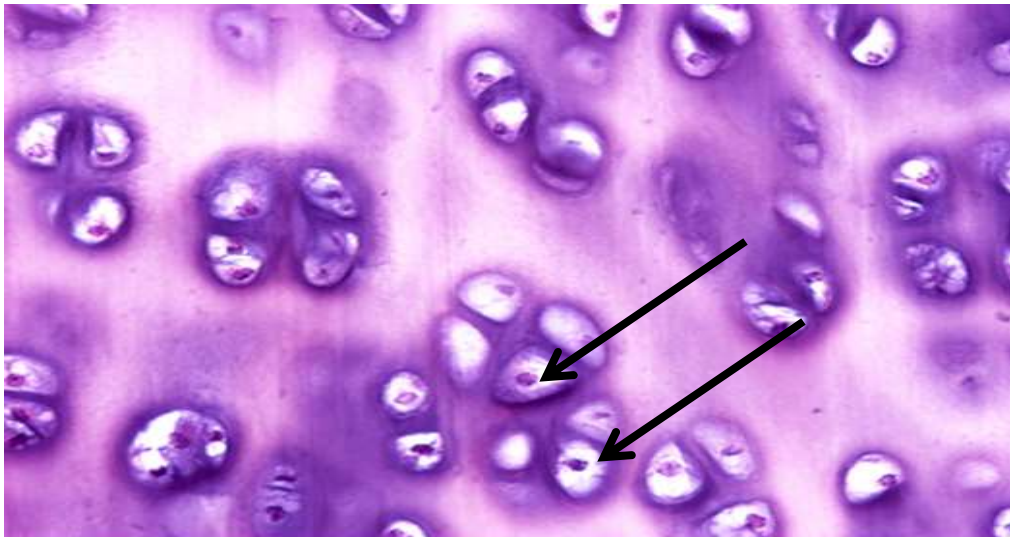
articulações, entre elas, a articulação do joelho (Gartner e Hiatt, 2008; Junqueira e Carneiro, 2008; Ross e Wojciech, 2008).

**Tabela 5.** Estratégias para um bom resultado cirúrgico nas lesões condrais.

Técnica	Resultados bons	Resultados ruins	Tamanho da lesão
	Farr <i>et al.</i> , 2011	Farr <i>et al.</i> , 2011	Jones e Peterson, 2006
Microfratura	Idade < 40 anos	Idade > 40 anos	1-2,5 cm <sup>2</sup>
	Lesão focal	Múltiplas Lesões	
	Côndilo femoral	Lesão patelar	
	Lesão < 4 cm <sup>2</sup>	Lesão > 4cm <sup>2</sup>	
Mosaicoplastia	Lesão Femoral	Lesão patelar,	1-2,5 cm <sup>2</sup>
	Lesão < 2,5 cm <sup>2</sup>	Lesão bipolar	
		Lesão com perda óssea	
Transplante osteocondral	Lesão com perda óssea e condral grandes	Lesão bipolar	> 4 cm <sup>2</sup>
	Lesões difusas	Osteoartrite difusa	
Cultura de condrócito	Lesão condral > 2 cm <sup>2</sup>	Lesão bipolar	> 2 cm <sup>2</sup>
		Lesões extensas	

Os condroblastos (do grego *chondros* = cartilagem e *blastos* = célula jovem), por serem células ainda jovens, apresentam elevada atividade de síntese com o retículo endoplasmático e o complexo de *Golgi*. Essas células sintetizam a maior parte dos componentes da matriz. Os condroblastos quando são aprisionados em lacunas amadurecem e se tornam os condrócitos, que são células menos ativas do ponto de vista metabólico. Os condrócitos vivem com menor suporte de oxigênio e os nutrientes chegam por difusão, caracterizando o baixo metabolismo. A palavra condrócito vem também do grego *chondros* = cartilagem e *kytos* = célula. Cada condrócito fica encerrado no interior de uma lacuna ligeiramente maior do que ele, pois na sua fase de condroblasto sofreu uma retração (Gartner e Hiatt, 2008; Junqueira e Carneiro, 2008; Ross e Wojciech, 2008).

Os condroblastos e os condróctios sintetizam a maior parte dos componentes da matriz. Esses componentes são, principalmente, a substância fundamental amorfa e as fibras. A substância fundamental amorfa é composta, principalmente, de Glicosaminoglicanas (GAGs). Um dos tipos de GAGs é justamente o Sulfato de Condroitina, como também, o Sulfato de Queratan. Esses componentes têm muita habilidade em reter água e quando se complexam com proteína transportadora (proteína core), formam um monômero proteoglicano (Toffoletto *et al.*, 2005). A ação em conjunto, desses constituintes, ajudam na formação do líquido sinovial e na manutenção de um grande espaço de hidratação na matriz extracelular (Toffoletto *et al.*, 2005). A Figura 9 mostra um corte histológico da cartilagem hialina. Na imagem é possível visualizar os condróctios envolvidos por grande matriz extracelular.



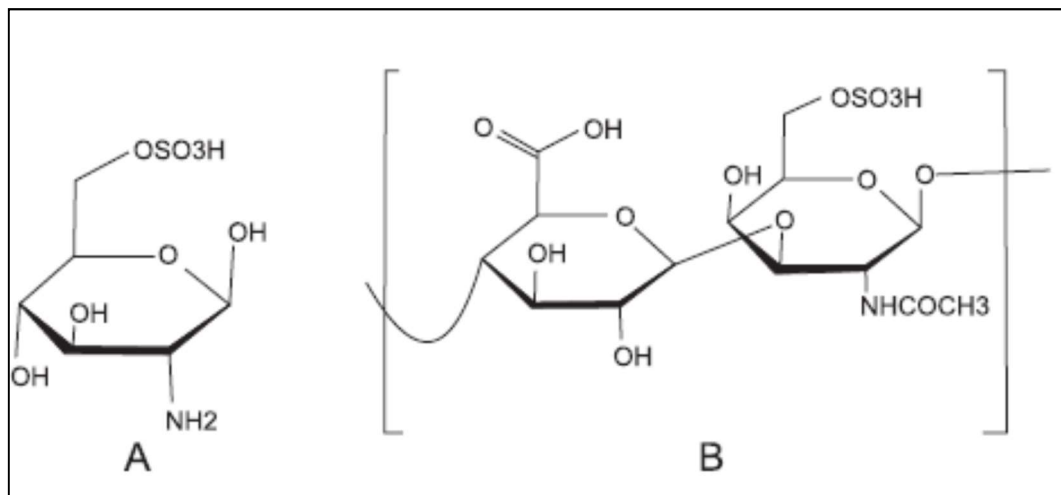
**Figura 9.** Corte histológico da cartilagem hialina. As setas indicam condróctios envolvidos por grande matriz extracelular. Fonte: [www.icb.usp.br/mol/6-6-matriz.html](http://www.icb.usp.br/mol/6-6-matriz.html)

A Glucosamina e a Condroitina são componentes essenciais ao metabolismo da cartilagem e estimulam importantes processos de regeneração. Eles defendem os condróctios contra apoptose, induzida pelo estresse oxidativo; reduzem a degeneração da cartilagem articular, induzida por mediador inflamatório; e reativam os processos anabólicos, reduzidos pela inflamação dos componentes da matriz extracelular. Esses processos tem relação com a inibição dos efeitos da IL-1 e TNF (Jerosch, 2011; Provenza *et al.*, 2015; Jimenez e Dodge, 1997).

A Glucosamina é um substrato utilizado na síntese das próprias GAGs e também dos proteoglicanos. Por isso, tanto a Glucosamina quanto a Condroitina

são compostos naturais conhecidos como condroprotetores. São justamente esses componentes e o resultado de suas reações que conferem ao tecido suas propriedades biomecânicas (Towheed *et al.*, 2005; Provenza *et al.*, 2015).

A Glucosamina-6-sulfato e a Condroitina-6-sulfato, com suas estruturas químicas ilustradas na Figura 10, são substâncias que vêm sendo utilizadas no tratamento das condropatias e a osteoartrite, com doses diárias recomendadas de 1.500 e 1.200 mg, respectivamente. Acredita-se que esses agentes se acumulam na cartilagem e no fluido sinovial, fornecendo os precursores necessários para manutenção e regeneração cartilaginosa (Velosa *et al.*, 2003; Pontarolo e Correr, 2008; Kahan *et al.*, 2009).



**Figura 10.** Estrutura química da Glucosamina-6-sulfato (A) e da Condroitina-6-sulfato (B).  
Fonte: Pontarolo e Correr, 2008.

### 2.2.2 Uso tópico *versus* uso oral no tratamento das lesões condrais e osteocondrais

O *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE), do Reino Unido, publicou em 2008, destacado documento com recomendações para o tratamento dessas lesões. Foram elas: i) caso o paracetamol ou um tipo de AINE (Anti-Inflamatório Não Esteroide), tópicos, sejam ineficazes no alívio da dor, deve-se considerar, em seguida, a substituição por inibidor tópico da COX-2 (Enzima Ciclo-Oxigenase); ii) quando a medicação tópica fornecer alívio de dor insuficiente, deve-se considerar a adição de um inibidor oral da COX-2; iii) os AINEs e os inibidores da COX-2 devem ser utilizados na menor dose eficaz e no menor tempo possível; e iv)

os profissionais de saúde devem levar em conta os fatores de risco de cada paciente, incluindo a idade. O uso tópico deve ser, sempre que possível, a primeira escolha.

A toxicidade dos AINEs orais é um problema sério, principalmente na população idosa. Com a descoberta da COX-2, enzima expressa predominantemente durante o processo inflamatório, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de drogas mais seletivas e com menores efeitos adversos. O conjunto desses agentes originou uma nova geração de anti-inflamatórios (inibidores seletivos da COX-2), denominados de Coxibes. Apesar do uso de inibidores seletivos da COX-2 reduzir o risco de efeitos adversos gastrointestinais, o perfil de segurança dessas drogas atualmente está sendo questionado devido a outros efeitos adversos graves, como o aumento da incidência de eventos cardiovasculares trombóticos (Carvalho *et al.*, 2004; Fitzgerald e Patrono, 2001; Kulkarni *et al.*, 2000).

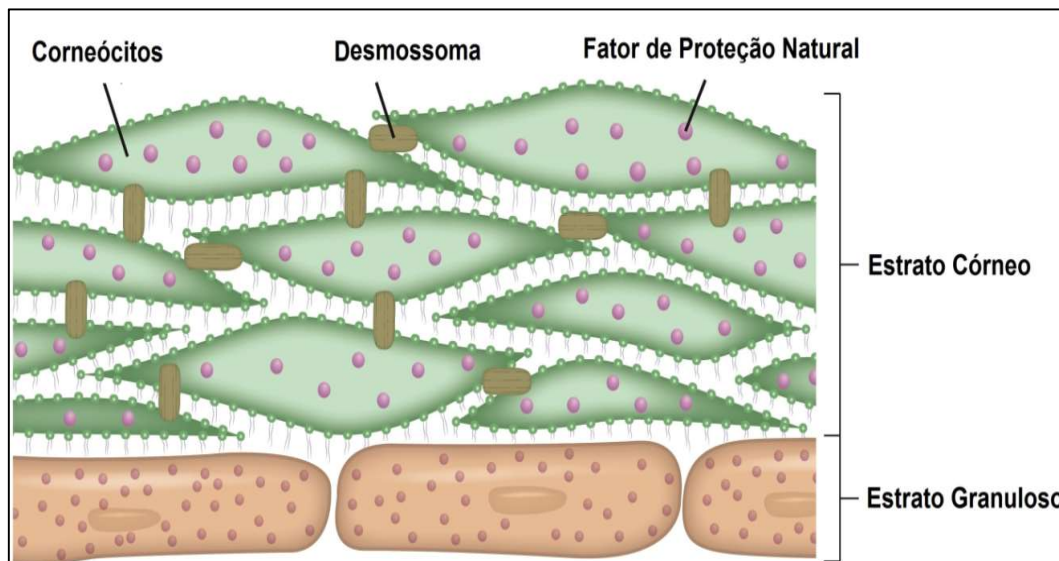
Os AINEs têm sido usados topicamente por décadas para aliviar a dor. Esta via de administração possivelmente reduz as reações adversas por maximizar o efeito local e minimizar a toxicidade sistêmica. Admitindo-se que a incapacidade funcional associada resulte parcialmente da restrição do movimento decorrente da sensação de dor, a analgesia proporcionada pelos AINEs tópicos poderá auxiliar esses doentes a manter a sua atividade diária e qualidade de vida.

Nesse sentido, Pereira *et al.* (2006) fizeram uma revisão sistemática e observaram que os ensaios clínicos randomizados controlados comparando AINEs tópicos com placebo, na sua maioria, demonstraram superioridade da droga. Porém, relataram que falhas metodológicas, como o número de pacientes, a duração dos ensaios e interesses financeiros podem ter comprometido os resultados finais. Concluíram, também, que a comparação entre os anti-inflamatórios tópicos e orais ainda é limitada pelo pequeno número de ensaios.

Outra revisão sistemática de Moreira *et al.* (2014) mostrou conclusões muito parecidas com a anterior. Observaram que o diclofenaco é o AINE tópico mais bem estudado e o que apresenta resultados mais consistentes. Verificaram que aplicação tópica combina uma exposição sistêmica baixa com uma analgesia eficaz. Afirmaram, também, que os fármacos carecem de maior estudo, sobretudo por

períodos mais longos de tempo. Concluíram que há necessidade de mais estudos, bem desenhados, para afirmar que os AINEs tópicos são superiores ao placebo e tão efetivos quanto os orais.

O tegumento representa o maior órgão do corpo humano, ele tem diversas funções e recobre toda a superfície corporal. É constituído pelas camadas epiderme e derme, recebe um terço da circulação sanguínea e apresenta uma espessura variável nas diferentes regiões do corpo (Bortolon *et al.*, 2008). A Figura 11 ilustra a epiderme, camada mais externa da pele, subdividida em várias outras camadas, sendo sua estrutura mais externa, o estrato córneo, que exerce a principal função do tegumento, que é a barreira protetora. O estrato córneo, com seus corneócitos e desmossomas, forma uma camada altamente organizada e resistente às agressões físicas e químicas (Kielhorn *et al.*, 2006).

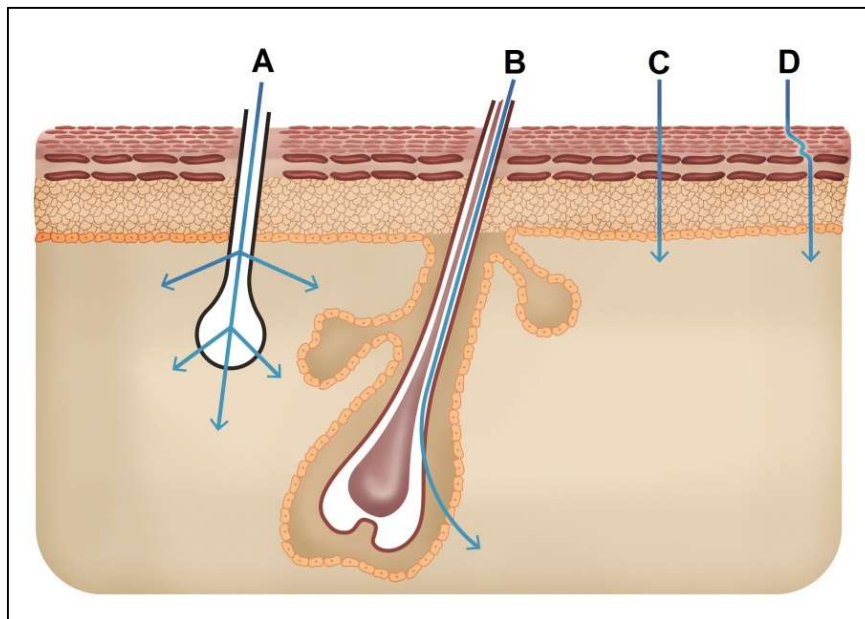


**Figura 11.** O estrato córneo com seus corneócitos e desmossomas altamente organizados e coesos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Há muita discussão a respeito das vantagens da terapêutica cutânea. Numa visão ampla, a vantagem reside no fato de estar indicada para situações localizadas, permitindo maior concentração local e menores efeitos sistêmicos. A utilização da via tópica para administração de drogas oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração. O metabolismo de primeira passagem hepática, comum para fármacos administrados pela via oral, é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. A via

tópica impede que esse efeito de primeira passagem ocorra. Além disso, alguns efeitos indesejáveis no estômago, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa, podem estar presentes na administração de medicamentos pela via oral. O que não ocorre pela via tópica (Silva *et al.*, 2010).

Ressalta-se que a absorção cutânea diminui significativamente quando o peso molecular da substância é superior a 500 Da e é favorecida quando o peso molecular é menor do que 100 Da (Kielhorn *et al.*, 2006; Pellanda, 2006). A absorção percutânea ocorre em 3 etapas distintas: a penetração, a permeação e a absorção, correspondendo essa última à entrada de uma substância na circulação sanguínea. Todo esse mecanismo pode ocorrer por 4 vias possíveis (Figura 12): i) a via transcelular (através das células do estrato córneo); ii) a via intercelular (entre as células do estrato córneo); iii) a via transfolicular (através dos folículos pilosos); e iv) a via transglandular (através das glândulas sudoríparas e sebáceas) (Kielhorn *et al.*, 2006; Pellanda, 2006).



**Figura 12.** Vias de absorção cutânea. A: Transglandular; B: Transfolicular; C: Transcelular; D: Intercelular. Fonte: Elaborado pelo autor.

Acrescente-se que a via tópica oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (Badran *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2009; Chorilli *et al.*, 2007). Em comparação com a administração oral, a aplicação tópica vem mostrando alta concentração do fármaco na derme. Concentrações alcançadas no músculo e no tecido abaixo do



local de aplicação são variáveis, mas são pelo menos equivalentes às obtidas com a administração oral. As aplicações tópicas têm um perfil de segurança superior às formulações orais (Heyneman *et al.*, 2000).

Num estudo de Dominkus *et al.* (1996), comparando administração tópica e oral de ibuprofeno, notou-se que as concentrações foram semelhantes em ambos os grupos no líquido sinovial, na fáscia e no músculo. O tecido subcutâneo foi o único tecido em que a concentração da substância, derivada da aplicação tópica, excedeu aquela obtida após administração por via oral. Em outra investigação, Rolf *et al.* (1999) avaliaram concentrações de cetoprofeno no plasma, líquido sinovial e tecidos intra-articulares, em 100 pacientes submetidos à artroscopia do joelho. 40 pacientes receberam gesso tópico contendo 30 mg cetoprofeno, 30 pacientes receberam múltiplas aplicações de 30 mg de gesso ao longo de 5 dias e outros 30 pacientes receberam cetoprofeno de 50 mg, por via oral. As concentrações do fármaco no menisco e na cartilagem foram elevadas de 20 a 30 vezes em relação às do plasma, após a administração tópica.

A biodisponibilidade é outro ponto muito discutido ao se comparar efeitos entre diferentes vias de administração de fármacos. Nesse sentido, relata-se o estudo de Lee *et al.* (2005), que desenvolveram um sistema tópico permitindo encapsular moléculas de GS, em uma concentração de 10%. Os perfis farmacocinéticos de dosagem oral e tópica de GS foram comparados em camundongos. A pesquisa em humanos contou com 15 voluntários saudáveis que receberam uma única dose de 10 g de creme, equivalente a 1.000 mg de GS em ambos os joelhos. As concentrações foram medidas por meio de análises do plasma sanguíneo. Os autores sugeriram fortemente que o nível elevado e duradouro de GS no sangue, conseguido através da aplicação tópica, é capaz de proporcionar processos de regeneração de cartilagem. Esse estudo demonstrou a superioridade da aplicação tópica na entrega de dosagem clínica de GS através da pele.

Ainda nesse contexto, importante ressaltar que as lesões condrais e osteocondrais são muito comuns em pacientes acima de 65 anos de idade. Medicamentos orais são frequentemente prescritos para esses indivíduos, representando risco cardiovascular, renal e gastrointestinal. Pacientes mais idosos geralmente utilizam outros medicamentos via oral e podem apresentar incapacidade

de ingestão. Nesses casos, a aplicação tópica oferece melhores condições de segurança e tolerabilidade (Argoff e Gloth, 2011).

### **2.2.3 Uso tópico da Glucosamina e Condroitina**

Em 2012, o *American College of Rheumatology (ACR)* atualizou suas orientações sobre as terapias com drogas e sem drogas para a osteoartrite do quadril, do joelho e da mão. As novas diretrizes do ACR foram desenvolvidas utilizando o sistema *GRADE - Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation*, um processo formal para desenvolver recomendações baseadas em evidências. Foi um trabalho de especialistas de todos os Estados Unidos e Canadá. A pesquisa bibliográfica teve como objetivo identificar revisões sistemáticas e meta-análises que forneceriam estimativas confiáveis dos benefícios das intervenções. Destaca-se que entre as várias orientações da ACR houve recomendações desfavoráveis à utilização da GS e da CS para pacientes com lesões condrais e osteocondrais. Essa recomendação foi baseada na ausência de evidências de alta qualidade ou de pequena diferença entre os efeitos desejáveis e indesejáveis no tratamento (Hochberg, 2012). No mesmo sentido, as recomendações da *American Academy of Orthopedic Surgeons (AAOS)*, publicadas em 2013, também trouxeram uma forte recomendação ao não uso da GS e da CS pelos mesmos motivos da ACR (Jevsevar, 2013).

Em 2014, a OARSI reuniu 13 profissionais de especialidades médicas relevantes (Atenção Básica, Reumatologia, Ortopedia, Fisioterapia, Medicina Física e Reabilitação e Medicina Baseada em Evidências), de 3 continentes e 10 países (EUA, Canadá, Reino Unido, França, Holanda, Bélgica, Suécia, Dinamarca, Austrália e Japão) e um representante de pacientes. Essa reunião teve como objetivo fornecer orientações para a gestão não cirúrgica de osteoartrite do joelho. Com base nas orientações anteriores da própria OARSI e de revisão sistemática da literatura, 29 modalidades foram recomendadas para o tratamento. Ressalta-se que nessas recomendações da OARSI tanto a GS como a CS foram consideradas inapropriadas como modificadoras da doença e receberam recomendações incertas para alívio dos sintomas (McAlindon e Underwood, 2014).

Ao fazer uma análise das pesquisas que nortearam essas orientações, foi possível observar que quando se tratava do uso da GS e da CS, referia-se ao uso oral das mesmas. É possível explicar esse fato, por existir poucas pesquisas direcionadas para outras vias de administração da GS e da CS. Vê-se também, que o uso tópico dessas substâncias, por exemplo, não foi mencionado em nenhuma das orientações terapêuticas.

Nesse contexto, relata-se que a *European League Against Rheumatism (EULAR)*, o *National Institute for Clinical Excellence (NICE)* e a *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)* recomendaram para o tratamento das lesões condrais e osteocondrais que medicamentos tópicos sejam utilizados em conjunto ou como alternativa aos medicamentos orais. E ainda sugeriram que a administração tópica seja considerada terapia de primeira linha em todos os pacientes (Bruyère, 2014).

A maioria das pesquisas realizadas com esses fármacos está voltada para o uso oral dessas substâncias. Elas são frequentemente utilizadas com o objetivo de tratar a dor. Wilson *et al.* (2015) fizeram um estudo de prevalência do uso e combinações de diferentes medicamentos para osteoartrite em 238.536 participantes na Catalunha (Espanha). O esquema mais comum de tratamento consistiu em pelo menos 3 drogas. Os medicamentos mais frequentemente utilizados foram Condroitina (21,2%), Glucosamina (15,8%) e os AINEs (14,4%). Ensaio clínico com o uso tópico dessas drogas são muito poucos discutidos na literatura.

Relata-se uma revisão de Leite *et al.* (2017) i) com o uso dos bancos de dados Medline, Pubmed, Cochrane, Web Of Science e Scopus Elsevier; ii) utilizando como palavras chaves: *glucosamine, chondroitin, osteoarthritis e topical*; iii) tendo como critérios de inclusão os ensaios clínicos randomizados que comparavam o uso da Glucosamina e Condroitina com placebo ou outro medicamento ou outra via de administração; iv) incluindo revisões sistemáticas ou meta-análises que abordavam a utilização tópica dessas substâncias, em humanos, com OA no joelho e v) tendo como critérios de exclusão os estudos em animais, estudos in-vitro e ex-vivo e estudos que avaliavam outras regiões do corpo. Essa revisão apresentou como resultados finais 5 ensaios clínicos randomizados. Comentários dos ensaios estão inseridos na Tabela 6 (resumo do artigo - Anexo I).

**Tabela 6.** Resumo dos principais estudos a respeito de uso tópico de Glucosamina e Condroitina. Publicados entre 2003 e 2015.

<b>Tipo de estudo</b>	<b>Métodos de avaliação</b>	<b>Resultados e comentários</b>	<b>Ref.</b>
Randomizado Placebo	*VAS e **WOMAC	VAS melhor no grupo tratado. Não houve diferença WOMAC.	Cohen <i>et al.</i> , 2003
Randomizado Placebo, Duplo cego	VAS e WOMAC Radiografia	Não houve diferença significativa entre os grupos.	Erhan <i>et al.</i> , 2012
Randomizado Via oral versus via tópica	VAS e WOMAC Radiografia	Aplicação tópica foi superior em melhorar a rigidez articular. Não houve diferença significativa nos demais aspectos.	Hammad <i>et al.</i> , 2015
Randomizado 3 grupos: GS e exercício	VAS	Não houve diferença significativa entre os grupos.	Onigbinde <i>et al.</i> , 2011
Randomizado GS versus AINEs (tópicos)	VAS	Não houve diferença significativa entre os grupos.	Onigbinde <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Leite *et al.*, 2017.

No estudo de Cohen *et al.* (2003), 63 pacientes com osteoartrite nos joelhos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos. O primeiro grupo recebeu aplicação tópica de GS e CS e o segundo foi placebo. A dor foi avaliada com VAS e a função motora foi avaliada com WOMAC. Os resultados foram significativos para redução de dor no grupo tratado. Por outro lado, não houve diferença significativa no teste WOMAC entre os dois grupos. Em outro estudo, Erhan *et al.* (2012) utilizaram GS e CS tópicas associadas com exercícios de força muscular. 49 pacientes com osteoartrite do joelho foram randomizados em 2 grupos. Foi um estudo duplo cego. O primeiro grupo, com 27 pacientes, recebeu a terapia física e tópica. O segundo grupo, formado por 22 pacientes, recebeu terapia física e placebo. Os resultados foram analisados por VAS, WOMAC e achados radiológicos. Como resultado final não houve diferença significativa entre os 2 grupos.

Hammad *et al.* (2015), com 180 pacientes com osteoartrite nos joelhos, divididos aleatoriamente em 2 grupos, aplicaram GS e CS via oral no primeiro grupo e via tópica no segundo grupo. Os resultados foram analisados por meio de radiografias, VAS e WOMAC. Não foi encontrada diferença significativa entre os 2

grupos em relação ao alívio da dor e a melhora da função motora. O resultado da aplicação tópica foi superior em melhorar a rigidez articular.

Onigbinde *et al.* (2011) compararam a eficácia da terapia de exercícios e iontoforese com GS. Foram 52 indivíduos com osteoartrite de joelho, agrupados aleatoriamente em 3 grupos. O Grupo 1 recebeu terapia de exercícios e iontoforese com GS. O Grupo 2 recebeu somente iontoforese com GS. O grupo 3 recebeu somente terapia de exercícios (bicicleta ergométrica). O resultado da análise de variância mostrou que não houve diferença significativa na dor entre os 3 grupos. Todas as 3 técnicas foram eficazes na diminuição da dor.

Onigbinde *et al.* (2014) analisaram os efeitos imediatos sobre a dor e a flexibilidade do joelho entre 2 grupos de pacientes com osteoartrite de joelho. O primeiro recebeu aplicação tópica de GS e o segundo recebeu aplicação tópica de metilsalicilato. Foram recrutados ao todo 41 indivíduos com grau II de OA no joelho. Foi aplicado 1 grama de cada formulação tópica por meio de massagem profunda. Houve uma redução significativa na intensidade da dor e na melhora da flexibilidade dos 2 grupos, porém, não houve diferença significativa entre eles. Os 2 grupos além de receberem a aplicação tópica da GS, fizeram sessões de bicicleta ergométrica.

Analisando os 5 ensaios clínicos da Tabela 6, observou-se que diferentes parâmetros foram utilizados na formulação, na concentração, na dosagem e na técnica de aplicação. Em relação ao veículo, pesquisas variaram entre base aquosa e base creme. Não houve padrão também nas técnicas de aplicação, variou-se entre associação de exercícios, iontoforese e infravermelho, junto com a aplicação tópica das substâncias. Não foi relatado nas pesquisas a respeito da preparação prévia da pele para receber a técnica. Houve poucas informações de como o produto foi aplicado na pele.

Ressalta-se que o tipo de veículo pode interferir não só sobre as taxas de absorção, mas também sobre a profundidade de penetração. Estudos mostram diferentes resultados quando se fala em relação à profundidade de penetração dos fármacos administrados topicamente. Foi possível verificar nas pesquisas que diferentes veículos foram utilizados, como solução aquosa, gel e creme (Singh e Roberts, 1994; McNeill *et al.*, 1992; Mikulak *et al.*, 1998). O estudo de Singh e Roberts (1994) mostrou resultados bem superiores aos demais estudos em relação

à profundidade de permeação. Esses pesquisadores utilizaram um veículo aquoso. O estudo realizado por Seth (1993), comparando doses equivalentes de ibuprofeno, aplicado em áreas da superfície da pele, demonstrou um aumento de 5 vezes da concentração no soro, alterando a formulação do fármaco a partir de uma base de pomada para uma base de gel.

Importante relatar que existe uma variabilidade de absorção e permeação atribuída às diferenças individuais na pele entre os participantes do estudo, incluindo o estado de hidratação (Sioufi *et al.*, 1994). A hidratação da pele constitui um dos fatores que afeta a velocidade e o grau de absorção cutânea. Quanto maior a hidratação, melhor será a permeação do fármaco na pele (Thomas e Finnin, 2004). O índice de permeabilidade e a absorção podem estar modificados, quando qualquer fenômeno físico, químico ou biológico altere as características da pele (Kaestli *et al.*, 2008).

Outro ponto a relatar é que embora a maioria das pesquisas tratem dos efeitos da GS e CS de forma combinada, há, entretanto, carência de estudos comparativos entre a utilização combinada e utilização individual dessas substâncias (Irsay *et al.*, 2010). Num estudo de Clegg *et al.* (2006), quando administrado isoladamente, via oral, nem GS e nem CS teve qualquer efeito clínico durante o estudo da marcha. No entanto, a combinação das 2 trouxe alívio da dor e melhora da função para pacientes com osteoartrite com dor moderada a severa do joelho. Dessa forma as pesquisas ainda não provam, mas sugerem que a utilização combinada de GS e CS podem obter melhores resultados na osteoartrite de joelho (Henrotin e Lambert, 2013).

## 2.3 NANOBIOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DAS LESÕES CONDRAIS E OSTEOCONDRAIS

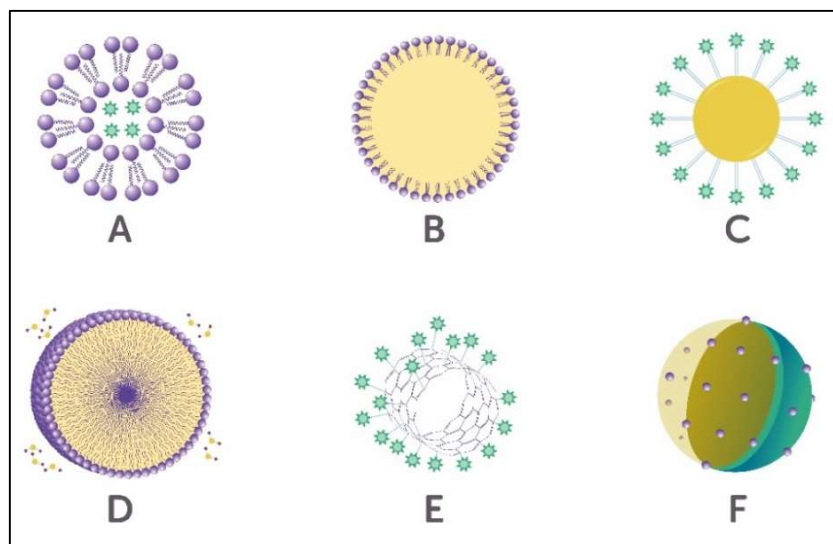
### 2.3.1 Nanomateriais na entrega de fármacos

As observações clínicas e os dados de pesquisa ajudam a compreender alguns dos processos envolvidos na etiologia, desenvolvimento e progressão da doença. Alterações fisiológicas anormais são observadas na cartilagem, no osso subcondral, na membrana sinovial e no tecido conjuntivo. A percepção de que a

osteoartrite é um distúrbio específico da cartilagem está mudando lentamente em direção à visão de que é uma desordem de todo o conjunto (Attur *et al.*, 2010; Lories e Luyten, 2011; Periyasamy *et al.*, 2012).

A prática clínica é baseada no tratamento sintomático que visa alívio da dor até a substituição cirúrgica das articulações com osteoartrite em fase terminal. Os fármacos que têm como alvo elementos específicos de progressão da doença têm sido desenvolvidos, mas estão associados com efeitos secundários graves, impedindo-o de uso clínico de rotina. Formas de regenerar a cartilagem estão a ser extensivamente estudados, mas em grande parte permanecem numa fase pré-clínica. Muitos fármacos já foram estudados na tentativa de proteger a cartilagem dos efeitos catabólicos (Kock *et al.*, 2012; Periyasamy *et al.*, 2012; O'Neill, 2006).

No entanto, grande parte desses medicamentos está associada aos efeitos secundários sistêmicos adversos. A entrega tópica dessas drogas utilizando veículos em nanoescala pode ser importante para contornar os efeitos colaterais sistêmicos. Os nanomateriais são usados no campo da medicina em diferentes configurações para uma variedade de aplicações, incluindo a entrega de drogas para diferentes patologias e diagnóstico (Talekar *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2012). A Figura 13 ilustra diferentes nanomateriais para entrega de fármacos.



**Figura 13.** Nanomateriais para entrega de fármacos. A: Lipossoma; B: Nanopartícula lipídica sólida; C: Nanopartícula de ouro funcionalizada; D: Nanoemulsão; E: Nanotubo de carbono funcionalizado; F: Nanopartícula polimérica. Fonte: Elaborado pelo autor.

A entrega intra-articular de nanomateriais pode ser uma excelente estratégia de reparação de cartilagem articular, devido aos efeitos diferenciais, como por

exemplo: i) melhoria no tempo de retenção da droga; ii) biodisponibilidade melhorada da droga; iii) eficiência elevada em baixas concentrações; e iv) efeitos secundários reduzidos, devido à contenção de drogas no espaço articular (Talekar *et al.*, 2011; Periyasamy *et al.*, 2012). Nesse sentido, foram desenvolvidos nanomateriais para entrega dos fármacos de ação rápida, tanto pela via oral e injetada, quanto pela via tópica (Tabela 7). Os fármacos conhecidos como modificadores da doença, e de ação prolongada, tais como sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina e a diacereína, foram menos pesquisados em relação aos AINEs. Existem pesquisas também que avaliaram sistemas de entrega de proteínas, condrocitos e colágeno.

### **2.3.2 Nanoemulsões tópicas**

Nos últimos anos, o potencial de utilização da pele como uma via alternativa para a administração de fármacos tem recebido um interesse considerável. A administração tópica de fármacos na forma de soluções, suspensões, géis e pomadas é um método comum de tratamento de doenças. A entrega transdérmica do fármaco oferece muitas vantagens sobre outras vias de administração, sendo algumas delas, a facilidade de administração, o controle sobre a taxa de entrega e a possibilidade de remoção imediata do tratamento (Ngo e Maibach, 2009; Kalaitzaki *et al.*, 2014).

Dessa forma, a concepção e desenvolvimento de novos sistemas de distribuição de fármacos, com a intenção de melhorar a eficácia dos medicamentos existentes sem irritar ou sensibilizar a pele, é um processo em curso na pesquisa farmacêutica. Em particular, está sendo investigado o potencial da utilização de dispersões líquidas estáveis nanométricas como transportadoras eficazes de moléculas bioativas (Kalaitzaki *et al.*, 2014). O estrato córneo é a principal barreira para penetração de formulações tópicas, porém, nanomaterias podem aumentar o poder de captação da pele, induzindo alterações significativas nessa barreira. Esse sistema de entrega de drogas torna-se cada vez mais popular (Mads, 2002).

As nanoemulsões tópicas permitem penetração rápida de moléculas ativas, devido à grande área de superfície da fase interna e de seus componentes reduzirem a propriedade de barreira do estrato córneo. Sistemas assim aumentam a absorção dérmica em comparação com formulações convencionais e são, portanto,



um veículo promissor devido ao seu potencial de administração transdérmica de fármacos (Abd *et al.*, 2016; Figen *et al.*, 2012).

**Tabela 7.** Nanomateriais desenvolvidos para tratamento das lesões condrais e osteocondrais.

Fármaco/proteína	Sistema	Via de administração	nm	Ref.
Condroitina	Nanopartícula polimérica	Intra-articular (injetada)	700nm	Laroui <i>et al.</i> , 2007
IL-1Ra*	Nanopartícula polimérica	Intra-articular (injetada)	270nm	Whitmire <i>et al.</i> , 2012
Condrócitos	Nanotubo de Carbono	Intra-articular (injetada)	10nm	Sacchetti <i>et al.</i> , 2014
Kartogenina	Nanopartícula polimérica	Intra-articular (injetada)	150 nm	Kang <i>et al.</i> , 2014
Diacereína	Nanopartícula lipídica sólida	Intra-articular (injetada)	396 nm	Jain <i>et al.</i> , 2014
Colágeno tipo II	Lipossomas <i>Theranostic</i> **	Intra-articular (injetada)	200nm	Cho <i>et al.</i> , 2014
Condroitina	Nanopartícula metálica	Intra-articular (injetada)	13 nm	Dwivedi <i>et al.</i> , 2015
Celecoxibe	Microemulsão	Oral	17nm	Garti <i>et al.</i> , 2006
Celecoxibe	Microemulsão	Oral	17nm	Goshen <i>et al.</i> , 2010
Lactoferrina	Nanopartícula polimérica	Oral	200nm	Samarasingh e <i>et al.</i> , 2014
Diacereína	Microemulsão	Oral	53nm	Rehman <i>et al.</i> , 2015
Ibuprofeno	Microemulsão	Tópica	17nm	Chen <i>et al.</i> , 2006
Ibuprofeno	Microemulsão	Tópica	43nm	Hu <i>et al.</i> , 2014.
Naproxeno	Nanoemulsão	Tópica	>100nm	Abd <i>et al.</i> , 2016
Ibuprofeno	Nanopartícula lipídica	Tópica	106nm	Sütő <i>et al.</i> , 2016

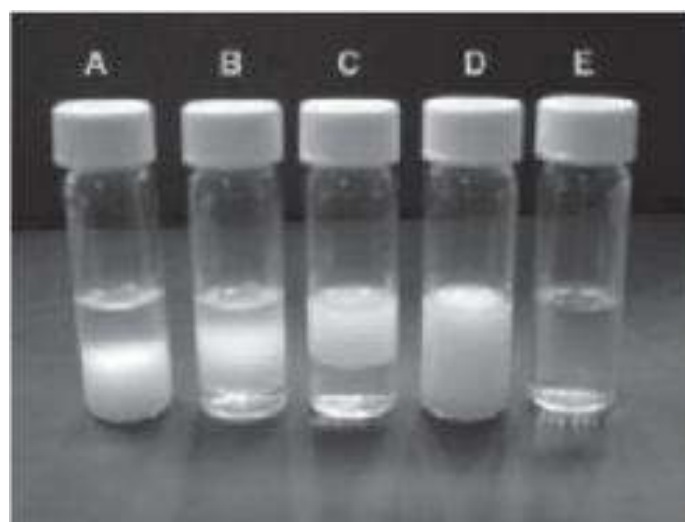
\* Bloqueio da IL-1 (interleucina 1) \*\* Sistemas que combinam diagnóstico com tratamento.

Ressalte-se que apenas uma fração de um fármaco dissolvido num veículo pode entrar na pele, tornando as propriedades de solubilidade um dos objetivos iniciais para uma adequada formulação farmacêutica. O potencial de solubilidade

das nanoemulsões pode ser um importante fator no aumento da absorção da pele de fármacos. Além disso, investigações indicaram que a organização estrutural das fases pode contribuir para aumentar a solubilidade, aumentando também a capacidade de carga em comparação com emulsões convencionais (Mads, 2002).

Esses sistemas diferem das emulsões simples por apresentarem tensão interfacial bem menor. Essa baixa tensão interfacial promove a formação espontânea desses sistemas monofásicos, não havendo necessidade de imposição de uma força externa, além da formação de gotículas de tamanho reduzido. Já as emulsões simples são dispersões grosseiras bifásicas, turvas ou leitosas, instáveis e requerem energia externa para sua formação (Wu *et al.*, 2001; Tenjarla, 1999).

Em contraste com as emulsões normais, o preparo das nanoemulsões não exige grandes controles da intensidade e duração da agitação, da temperatura, do tempo de emulsificação, entre outros, possibilitando também, a esterilização por filtração devido à baixa viscosidade por elas apresentada. Ainda podem ter sua consistência modificada pela escolha adequada de certos polímeros, ou de formação de gel de surfactante (Wu *et al.*, 2001; Tenjarla, 1999). Os frascos da Figura 14 mostram de A até C a separação de fases. A formulação da letra D mostra a imagem opaca de uma emulsão comum. A formulação da letra E mostra a transparência esperada de uma nanoemulsão.

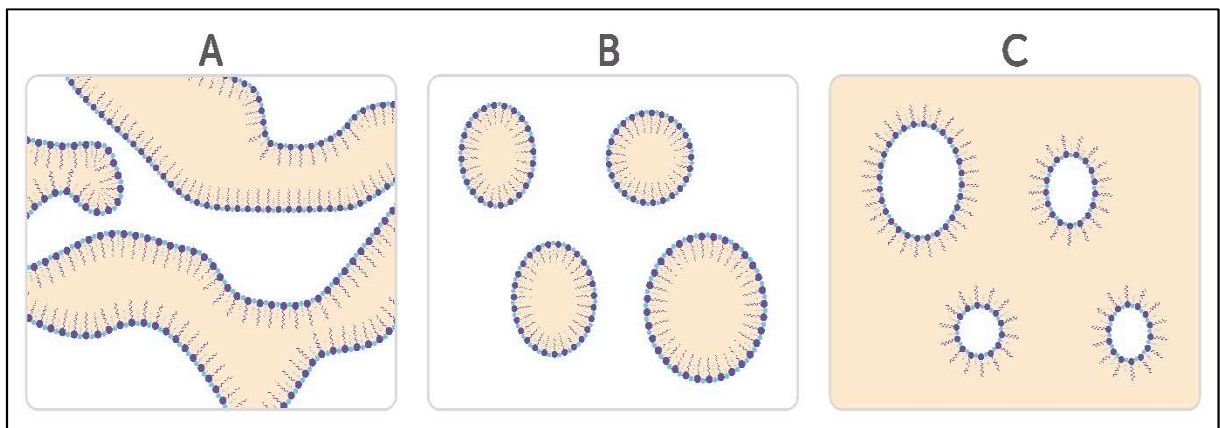


**Figura 14.** Ilustração representativa da transparência esperada de uma nanoemulsão. Letra A até D = Sistemas Macrométricos. Letra E = Nanoemulsão. Fonte: Oliveira *et al.*, 2004.

Esses fatores tornam as nanoemulsões bastante atrativas do ponto de vista da produção farmacêutica (Mads, 2002; Gasco, 1997; Tenjarla, 1999; Anton e Vandamme, 2011). Além disso, as nanoemulsões podem ser fabricadas por um método de emulsificação espontânea que proporciona um procedimento de preparação de baixo custo, elevada carga de fármaco hidrofílico e lipofílico e longa vida útil para agentes terapêuticos (Azeem *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2014).

### 2.3.2.1 Reagentes químicos no desenvolvimento das nanoemulsões

A escolha de componentes para nanoemulsões envolve frequentemente um equilíbrio entre compostos que são capazes de formar sistemas não tóxicos e são capazes de cumprir os requisitos de um bom veículo para a absorção dérmica. À medida que o nível de surfactantes e da fase de óleo é elevado, é importante considerar a indução de irritação destes compostos. Dependendo da proporção dos componentes o sistema pode variar de micelas O/A (óleo em água), A/O (água em óleo) ou estruturas bicontínuas (Mads, 2002). A Figura 15 mostra esses diferentes sistemas de nanoemulsões.



**Figura 15.** Diferentes sistemas de nanoemulsões. A: Bicontínua; B: Óleo-em-água; C: Água-em-óleo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Um fármaco lipofílico tem mais afinidade com a estrutura da pele, podendo permear na epiderme com mais facilidade em comparação ao fármaco hidrofílico (Silva *et al.*, 2012), como o caso dos fármacos em estudo. As estratégias para melhorar a permeação dos fármacos hidrofílicos incluem formulação avançada e o uso de técnicas físicas. Fármacos hidrofílicos, de baixa massa molecular, podem ser quimicamente modificados aumentando a lipofilicidade dos mesmos. Como também, é possível aumentar a força motriz, intensificando o coeficiente de partição, ou

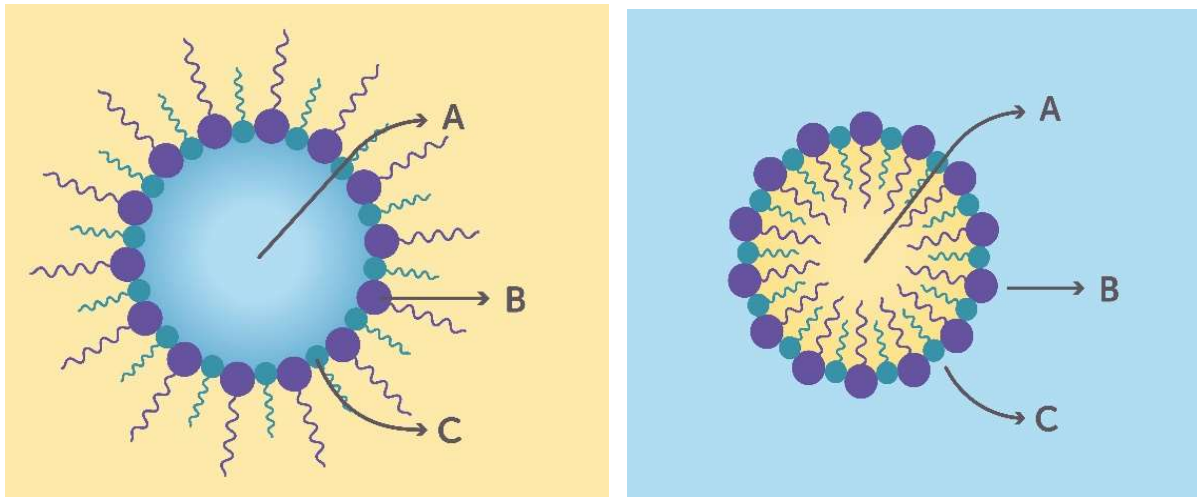
causando um fluxo elétrico induzido por iontoforese ou fonoforese (Guy *et al.*, 2000; Baskurt *et al.*, 2003; Kalia *et al.*, 2004; Onigbinde *et al.*, 2011). Para fármacos hidrofílicos de alta massa molecular, pode-se utilizar um potenciador químico para diminuir as propriedades de barreira da pele, sem modificar o próprio fármaco (Polat *et al.*, 2010).

A preferência de surfactantes não iônicos, observada na maioria das pesquisas, explica-se pelo fato de que os surfactantes iônicos são geralmente tóxicos para determinadas aplicações médicas, principalmente considerando a elevada concentração necessária dessas substâncias para a estabilização da grande área de interface formada entre as fases oleosa e aquosa (Tenjarla, 1999). Os surfactantes são substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares. O tamanho da cadeia polar do surfactante é o que define numericamente o *Hydrophilic-Lipophilic Balance* (HLB), com valores que vão de zero a 20 (Vandamme, 2002). Quanto mais alto o HLB mais hidrofílico é o surfactante. Surfactantes com baixo HLB indicam predominância da parte apolar, sendo mais indicado para o preparo de sistemas A/O. Ao contrário, HLB maiores apontam a prevalência da região polar e o emprego dessas substâncias é indicado principalmente na obtenção de sistemas O/A (Lawrence e Rees, 2000; Kahlweit *et al.*, 1987; Anton e Vandamme, 2011; Matsaridou *et al.*, 2012).

Em muitos casos é necessário, para produzir sistemas estáveis, a adição de um co-surfactante. Eles são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade dos sistemas, além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo surfactante, o que impede a elevação significativa da viscosidade do sistema obtido (El Maghraby, 2008; Bagwe *et al.*, 2001). Vem sendo descrito na literatura, que os principais co-surfactantes utilizados são álcoois e glicóis de baixa massa molecular e que apresentam uma cadeia carbônica entre 2 e 10 carbonos como o etanol, glicerol, propileno glicol, butanol, pentanol, hexanol ou transcutool® (Vandamme, 2002; Bagwe *et al.*, 2001; Hathou e Woodman, 2012).

A concentração da fase aquosa também tem relação direta com a intenção de se formar um sistema A/O ou O/A. A literatura tem bem definido que a adição de água para os sistemas A/O interrompe a sua organização. A adição de água para as

os sistemas O/A, melhora a sua organização. O ponto de transição entre A/O para O/A geralmente ocorre numa concentração de 30% a 35% de água, mesmo não alterando a concentração de surfactantes (Monzer, 2011; Boonme *et al.*, 2006). A Figura 16 ilustra nanoemulsões O/A e A/O com a presença do surfactante e do co-surfactante.



**Figura 16.** Diferentes nanoemulsões com seus surfactantes e co-surfactantes. Imagem à esquerda: nanoemulsão A/O. Imagem à direita: nanoemulsão O/A. A: Água (esquerda) e óleo (direita); B: Surfactante; C: Co-surfactante. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à escolha da fase oleosa, a literatura diz que óleos de elevada massa molecular podem não permitir a obtenção dos sistemas. É importante que a fase oleosa tenha um menor número de moléculas, melhorando a penetração e permitindo a associação do óleo com o filme interfacial de surfactante. Os principais parâmetros na escolha da fase oleosa estão relacionados à possibilidade de formação do sistema e às características de solubilidade do fármaco a ser veiculada (Kreilgaard, 2002; Osborne *et al.*, 1991).

A adição do fármaco na nanoemulsão pode afetar o sistema. Inclusive, pode aumentar o diâmetro das gotículas e aumentar o índice de polidispersão (Kreilgaard, 2002; Sintov *et al.*, 2004). Os efeitos no fluxo e na permeação também podem sofrer variações de acordo com a concentração do fármaco. Esse aumento na concentração do fármaco deve ser perto do limite de saturação. Concentrações muito altas também podem não formar o sistema (Kreilgaard, 2002; Barry, 2001; Kalaitzaki *et al.*, 2014).

Tem sido sugerido que em condições ocluídas, o estrato córneo se torne mais hidrofílico e, portanto, mais semelhante à epiderme viável. Isso poderia aumentar a força motriz do estrato córneo em camadas mais profundas da pele (Ferderber *et al.*, 2009). Por outro lado, a hidratação dos lipídeos intercelulares pode levar à incorporação de água na região do grupo de cabeça polar dos lipídeos do estrato córneo. Como consequência, tem sido proposto que o afrouxamento da estrutura ocorrerá e assim a permeabilidade do soluto aumentará (Williams e Barry, 2004; Zhai e Maibach, 2001).

O processo de liberação dos fármacos das nanoemulsões é orientado pela transferência do fármaco da fase dispersa para a fase contínua e pela difusão do fármaco da fase contínua para o meio. O mecanismo de liberação dos fármacos pode ser atribuído à partição do fármaco entre as gotículas dispersas e a fase contínua. Nesse contexto, devido às dificuldades na permeação de fármacos hidrofílicos e pesquisas apontando para os melhores efeitos dos sistemas O/A, tornou-se uma opção de alguns pesquisadores a utilização de sistemas O/A, com os fármacos hidrofílicos sendo entregues na fase contínua (Schmidts *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014).

Na nanoemulsão em estudo, buscou-se um equilíbrio entre compostos capazes de formar um sistema estável, não tóxico e capaz de cumprir os requisitos de um bom veículo para a absorção dérmica. O Cremophor ELP é um surfactante não iônico, composto de óleo de castor polietoxilado e tem sido utilizado comercialmente para preparo de emulsões estáveis, O/A. Foi desenvolvido para uso como solubilizante e emulsificante para preparações orais, tópicas e parenterais (Trommer e Neubert, 2006; Matsaridou *et al.*, 2012; Pedersen *et al.*, 2014; Muehlmann *et al.*, 2015).

O Cremophor ELP apresenta-se como um produto de grau purificado de Cremophor EL. O ELP foi especialmente desenvolvido para ingredientes ativos sensíveis, pois a maior pureza foi encontrada para melhorar sua estabilidade. Cremophor ELP é uma pasta branca/amarelada ou um líquido turvo. Cumpre requisitos mais exigentes em relação ao teor de água, potássio e ácidos gordurosos livres. Ao aquecer, a 26 °C, produz um líquido oleoso claro com um odor fraco e característico. O valor HLB situa-se entre 12 e 14 (Matsaridou *et al.*, 2012; Pedersen *et al.*, 2014).

O Óleo de Rícino, HLB 13, é um óleo altamente viscoso, de cor amarelo claro, não volátil, não comestível, formado principalmente de ácido ricinoléico (mais de 90%) e pequenas quantidades de outros ácidos, como: oléico, linoléico, esteárico e dihidroxiesteárico. Esse óleo vem sendo utilizado em diversas aplicações, como na fabricação de detergentes, cosméticos, produtos farmacêuticos, compostos antifúngicos, lubrificantes espermicidas, pomadas e até mesmo produção de biodiesel (Friedman *et al.*, 2010; Muehlmann *et al.*, 2015).

O ácido ricinoléico é um ácido graxo ômega 9 presente naturalmente no óleo da mamona. Quimicamente, ele difere do ácido oléico por ter uma hidroxila no 12º carbono. Sua massa molar é 298.461 g/mol. Sua fórmula química é  $C_{18}H_{34}O_3$ . O ácido ricinoléico é fabricado industrialmente por saponificação ou destilação fracionada de óleo de mamona hidrolisado (Friedman *et al.*, 2010). A mamona passa por vários processos de desintoxicação antes de ser comercializada. Estudos atuais demonstram que o silenciamento de genes de ricina, em sementes de mamona, é efetivo e gera um genótipo bio-desintoxicado. Esta biotecnologia exercerá ainda um grande impacto no cultivo de mamona (Sousa *et al.*, 2017).

### 2.3.2.2 Caracterização e testes *in vitro* das nanoemulsões

As nanoemulsões normalmente não apresentam grande tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas nanométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das nanoemulsões, como por exemplo a adsorção de moléculas ativas à superfície das gotículas e a presença de surfactantes adsorvidos (Schmidts *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014; Ferderber *et al.*, 2009).

O espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS) é aplicado na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. Técnica bem estabelecida para medição do tamanho, de distribuição do tamanho e de potencial zeta. Essa técnica baseia-se na medição do movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão. O movimento browniano faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento

browniano e, assim, detecta o tamanho de partícula (Crane *et al.*, 2008; Aboofazelli *et al.*, 2000).

É importante ter em conta que a medida adquirida não corresponde às partículas em si, nem mesmo aos agregados, correspondendo sim ao Diâmetro Hidrodinâmico (DH) por elas formado. Dessa forma, esse método não mede diretamente o tamanho da partícula, mas mede o diâmetro esférico equivalente à dupla camada elétrica que a rodeia. No caso das partículas estarem aglomeradas, a relação medida é a camada elétrica dupla do aglomerado. Se a amostra for composta por partículas de 3 e de 30nm, a luz difratada da segunda vai ser muitas vezes superior à da primeira. Essa relação é medida como índice de polidispersão (*Polydispersity Index* - PDI). Um PDI estreito é a condição necessária para que a nanoemulsão apresente alta estabilidade (Roland *et al.*, 2003; Jaiswal *et al.*, 2015).

Ao aplicar um campo elétrico, as nanopartículas e a camada elétrica interna vão mover-se em uníssono, causando um arrasto da camada externa. A interface entre a camada interna e externa vai sofrer forças contrárias levando ao rompimento das ligações. À região em que este fenômeno ocorre dá-se o nome de plano de quebra. O potencial zeta (*Zeta potential* -  $Z_p$ ) pode ser definido como a diferença entre o potencial elétrico do plano de quebra e um ponto no fluido da suspensão longe da partícula. Ao aplicar um campo elétrico, as partículas vão migrar em direção ao eletrodo contrário à sua carga. A sua velocidade é proporcional à magnitude do seu  $Z_p$ . Potenciais zeta negativos aumentam a probabilidade de que a suspensão seja estável. As partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação (Schaffazick e Guterres, 2003; Roland *et al.*, 2003; Benita e Levy, 1993).

É possível observar a medida do tamanho real da nanopartícula, como também, o formato da mesma, por meio de análises morfológicas utilizando a microscopia eletrônica. O microscópio eletrônico pode ser de transmissão ou de varredura, a diferença entre os dois é que o de transmissão serve para estudar as estruturas cortadas em fatias muito finas, e os microscópios de varredura são utilizados para analisar a superfície do material em estudo. Nos últimos anos, a Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (Cryo-TEM) tem fornecido imagens de alta resolução de fluidos complexos em um estado quase *in situ*. Amostras embutidas em uma fina camada de solvente vitrificado não exibem



artefatos que podem ocorrer com mais facilidade nas outras técnicas microscópicas que envolvem fixação química, coloração e secagem. A Cryo-TEM tem sido útil na imagem de moléculas biológicas em soluções aquosas. A Cryo-TEM tornou-se uma ferramenta poderosa no estudo de nanoemulsões (Cui *et al.*, 2007; Laan e Denkova, 2017).

O valor do potencial hidrogeniônico (pH) é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade das nanoemulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. Uma diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos que geram ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres reduzem o valor do pH das formulações, indicando alteração na estabilidade do sistema. Esse decréscimo no pH sugere a degradação dos componentes da fase oleosa (Martini, 2005; Masmoudi *et al.*, 2005; Rosani, 2011; Bernardi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2016).

Os órgãos governamentais de regulamentação e controle de qualidade, como também diversos setores da indústria, estão sob crescente pressão para substituir ensaios *in vivo* por métodos alternativos que não utilizem animais. Diante desse cenário, os ensaios de citotoxicidade têm sido os métodos *in vitro* mais estudados como possíveis alternativas aos testes com animais. Citotoxicidade significa causar efeito tóxico ao nível celular. Entre os efeitos tóxicos, pode ser citada a morte celular, alterações na permeabilidade da membrana ou a inibição enzimática (Eun e Suh, 2000).

Tem sido usada uma ampla bateria de testes *in vitro* para o auxílio da pesquisa de biocompatibilidade, seguindo as normas da ISO 10993. Esses testes não determinam, isoladamente, a biocompatibilidade de um material; entretanto, constitui importante etapa no seguimento para testes no uso clínico (Willians, 2008). De acordo com o *International Standard Organization*, o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. O ensaio de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) é um teste laboratorial e um ensaio colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular e a citotoxicidade de um agente medicamentoso ou de outros materiais tóxicos (Tang *et al.*, 2007).

O potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é avaliado desde a década de 1940 por meio de experimentos com animais de laboratório. Alguns dos ensaios adotados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, chamados de testes de irritação ocular ou cutânea, foram descritos inicialmente por John H. Draize e ainda hoje são adotados mundialmente por órgãos oficiais. Nesse sentido, o teste utilizando membrana corioalantóide de ovos de galinha tem sido estudado como metodologia alternativa à substituição do teste de irritação ocular de Draize (Eun e Suh, 2000; Oliveira *et al.*, 2012).

A membrana corioalantóide (*Chorion Allantonic Membrane* - CAM) é utilizada pelo embrião do frango para as trocas gasosas através da casca de ovo. É uma estrutura altamente vascularizada. As características estruturais da CAM são similares aos tecidos vascularizados como a conjuntiva, sendo capaz de responder em relação à produtos irritantes. O ensaio conhecido como HET-CAM (*Hens Egg Test-Chorion Allantonic Membrane*) é indicado pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e representa uma modificação do método descrito por Luepke em 1985 (Vinardell e Mitjans, 2006).

Estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea, são extremamente importantes na otimização das técnicas de elaboração e da escolha adequada dos componentes das formas farmacêuticas tópicas. Nos métodos *in vitro* podem ser controladas as condições de estudo, não havendo os interferentes biológicos; além de não serem dispendiosos (Andega *et al.*, 2001; Ceschel *et al.*, 2000). A literatura descreve diferentes métodos *in vitro* para liberação e permeação transdérmica. Esses métodos apresentam diferentes tipos de células de difusão, com e sem membranas (artificiais ou biológicas), das quais a *Vertical Diffusion Cell* de Franz, em sistema estático e fluxo contínuo, foi uma das mais empregadas no desenvolvimento farmacotécnico (Shah *et al.*, 1999).

A maioria das pesquisas com células de difusão está baseada nas publicações de Thomas J. Franz em meados de 1970. A célula original foi modificada pelo próprio Franz em 1975. A Célula de Franz Modificada é caracterizada por ser uma célula de difusão estática, de fluxo contínuo, onde a derme fica em contato com a solução receptora (Bronaugh e Stewart, 1984). Desde então várias células foram desenvolvidas, sempre baseadas nos estudos de Franz,

sendo muitas vezes citadas na literatura como células do tipo Franz ou baseada no modelo de Franz (Sato *et al.*, 2007). Nos estudos pode-se usar tanto peles humanas como as de espécies animais, sendo a pele de orelha de porco muito utilizada, por possuir características semelhantes às da pele humana (Andega *et al.*, 2001; Ceschel *et al.*, 2000).

## 2.4 FONOFORESE E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NANOMATERIAIS

A fonoforese, conhecida também como sonoforese, é frequentemente aplicada como recurso terapêutico na prática clínica. Essa técnica utiliza o ultrassom para administrar drogas através da pele. A fonoforese pode ser considerada como uma técnica que associa os efeitos físicos do ultrassom aos efeitos químicos das drogas para atingir o efeito terapêutico. Embora ainda muito discutido, o efeito sinérgico tende a aumentar a permeabilidade do estrato córneo, potencializando o efeito da droga pela sua maior profundidade de penetração (Rodriguez-Devora *et al.*, 2012; Meshali *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2012).

A pesquisa sobre fonoforese está em andamento desde 1950. Os primeiros resultados mostraram que quando uma injeção de hidrocortisona foi seguida por tratamento com ultrassom, os efeitos do tratamento combinado foram superiores ao da injeção isoladamente (Skauen e Zentner, 1984). Estudos de permeação *in vitro* com ibuprofeno tiveram melhores resultados quando combinado com ultrassom (Brucks *et al.*, 1989). Na década de 90 foram realizados os primeiros estudos sobre o sinergismo entre intensificadores químicos e o ultrassom. Combinações de diferentes intensificadores químicos provocaram um aumento na permeabilidade e no fluxo transdérmico, na presença do ultrassom (Simonin, 1995; Johnson *et al.*, 1996; Meidan *et al.*, 1998).

### 2.4.1 Efeitos físicos do ultrassom e suas implicações na entrega transdérmica

#### 2.4.1.1 Frequência de onda

O ultrassom emite uma onda de compressão longitudinal com frequência acima da faixa audível ao ouvido humano, ou seja, acima de 20 Kiloherztz (KHz) , ou 20.000 Hertz (Hz), o mesmo que 20.000 ciclos por segundo. Essas ondas são criadas primeiramente pela geração de um sinal elétrico amplificado, o qual, ao

chegar ao transdutor do ultrassom, é convertido em ondas mecânicas. No transdutor há uma cerâmica ou cristal que muda suas dimensões em resposta ao campo elétrico, gerando a onda mecânica que é transmitida para o meio desejado. Essa mudança nas dimensões é conhecida como efeito piezoelétrico (Pitt *et al.*, 2004; Alkilani *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Ao contrário das ondas de luz, as ondas ultrassônicas são de natureza física; elas causam movimento real de moléculas à medida que o meio é comprimido e expandido. Portanto, o ultrassom pode atuar fisicamente em biomoléculas e células (Pitt *et al.*, 2004).

Um transdutor ultrassônico é um tipo de dispositivo que transforma um sinal elétrico em ondas acústicas. Esses transdutores podem ser do tipo magnético, eletrostáticos e piezoelétricos, dentre os quais os transdutores piezoelétricos são os mais comumente utilizados em diversas aplicações (Zhang *et al.*, 2015). Os transdutores de diagnóstico geralmente operam na faixa de frequência de 2 a 18 Megahertz (MHz). Frequências de 50-100 MHz estão sendo usadas para imagens intravasculares, oftálmicas, da pele e de animais pequenos (Saliba *et al.*, 2007; Gurney *et al.*, 2011).

Dispositivos de 1 e 3 MHz são os mais utilizados em clínicas de reabilitação (Schroeder *et al.*, 2009). A frequência da onda ultrassônica pode ser classificada como de baixa frequência, na faixa de 20 a 100 KHz, e alta frequência, de 0,7 a 16 MHz. O intervalo de entre 100 KHz e 700 KHz não é investigado com frequência no contexto da administração transdérmica (Pong *et al.*, 2006).

Estudos na década de 90 mostraram que o ultrassom de 0,75 MHz foi mais eficaz do que o ultrassom de 3 MHz. Resultados já sugeriram que a exposição ao ultrassom de frequência mais baixa poderia ser mais eficaz do que a realizada na faixa de MHz (Young e Dyson, 1990). No estudo de Cohen-Levi (2000), os níveis de liberação mais baixos foram encontrados usando ultrassom de 3 MHz, quando comparado ao ultrassom nas frequências de 20 KHz e 1 MHz. Comparando resultados entre ultrassom de diferentes frequências, na entrega de micelas poliméricas carregadas de doxirrubicina, foi verificado que o início da liberação da droga com o ultrassom de 1 MHz foi observado em densidades de potência muito maiores, 7,2 watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ), do que numa faixa de frequência de 20-100 KHz e intensidade de 0,058  $W/cm^2$  (Marin *et al.*, 2002).

Atualmente, pesquisas apontam que dispositivos de ultrassom de baixa frequência são mais eficazes no aumento da permeabilidade da pele, levando em consideração que os efeitos de cavitação exibem uma relação inversa com a frequência de ultrassom (Richardson *et al.*, 2007; Kushner *et al.*, 2008; Hussein e Pitt, 2008; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Cevc e Vierl, 2010; Polat *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2011; Afadzi *et al.*, 2012; Rodriguez-Devora *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Rangsimawong *et al.*, 2015).

Entretanto, o uso clínico dos dispositivos de ultrassom de baixa frequência está muito recente e carente de informações, principalmente em relação à sua segurança (Rao e Nanda, 2009; Nelson *et al.*, 2002). Em 2004, pesquisadores apresentaram resultados sugestivos de que o ultrassom de 35,1 KHz poderia ser eficaz na administração de genes e ao mesmo tempo manter uma viabilidade celular de 90% (Wei *et al.*, 2004). Mesmo assim, é preciso mais estudos e investigações no que se refere à segurança dos dispositivos de ultrassom de baixa frequência em uso clínico.

Por outro lado, os dispositivos de ultrassom de alta frequência têm um longo histórico de segurança e uso na fisioterapia, e têm a vantagem de ser mais prontamente utilizáveis em experimentos com seres humanos (Schroeder *et al.*, 2009; Rodriguez-Devora *et al.*, 2012; Victor *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Zortéa *et al.*, 2015; Prato *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2016). Pesquisas mostraram que o ultrassom de 1 MHz pode ser utilizado para descarregar o conteúdo líquido de lipossomas, sem destruir a membrana do próprio lipossoma, e pode revelar-se um candidato atraente para a administração de fármacos quando a lise celular é indesejável (Pong *et al.*, 2006).

O ultrassom de alta frequência focalizado é uma tecnologia ultrassônica com ondas de alta intensidade, focalizadas, que tem sido utilizada para degradar tecidos tumorais, ao mesmo tempo que melhora a entrega de nanomateriais. As vantagens importantes dessa categoria são sua capacidade de maior penetração e sua capacidade de ser focada e controlada, evitando o tecido saudável.

O ultrassom de 1 MHz, focado, foi associado à nanopartículas de ouro, no tratamento de lesão muscular induzida em ratos (Victor *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2016) e num modelo experimental de uso excessivo (Zortéa *et al.*, 2015), resultando em efeitos antioxidantes e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Por

outro lado, pesquisadores mostraram que o transdutor de 1 MHz, não focado, foi capaz de induzir melhor libertação de lipossomas quando comparado ao ultrassom focado de 1.6 MHz (Pong *et al.*, 2006).

Em outro estudo, nenhum benefício terapêutico foi observado quando aplicado ultrassom de 1 MHz, focalizado, associado à doxorrubicina lipossomal em ratos com carcinoma prostático (Lafon *et al.*, 2012). Assim, a focagem ainda precisa de resultados adicionais para comprovar seus reais efeitos no que se refere à melhora na entrega de drogas. Importante ressaltar que poucos estudos avaliam a segurança da tecnologia focalizada para utilização em humanos.

Estudos conduzidos com ultrassom de baixa frequência têm demonstrado mais atenção ao controle e minimização de efeitos térmicos, prevenindo efeitos colaterais prejudiciais, como desprendimento epidérmico, queimaduras e necrose da epiderme ou dos tecidos subjacentes (Polat *et al.*, 2011; Afadzi *et al.*, 2012; Myhr e Moan, 2006). Utilizando-se ultrassom de baixa frequência em ambiente clínico, indica-se monitoramento contínuo da pele com medição quantitativa da temperatura durante o tratamento (Ogura *et al.*, 2008).

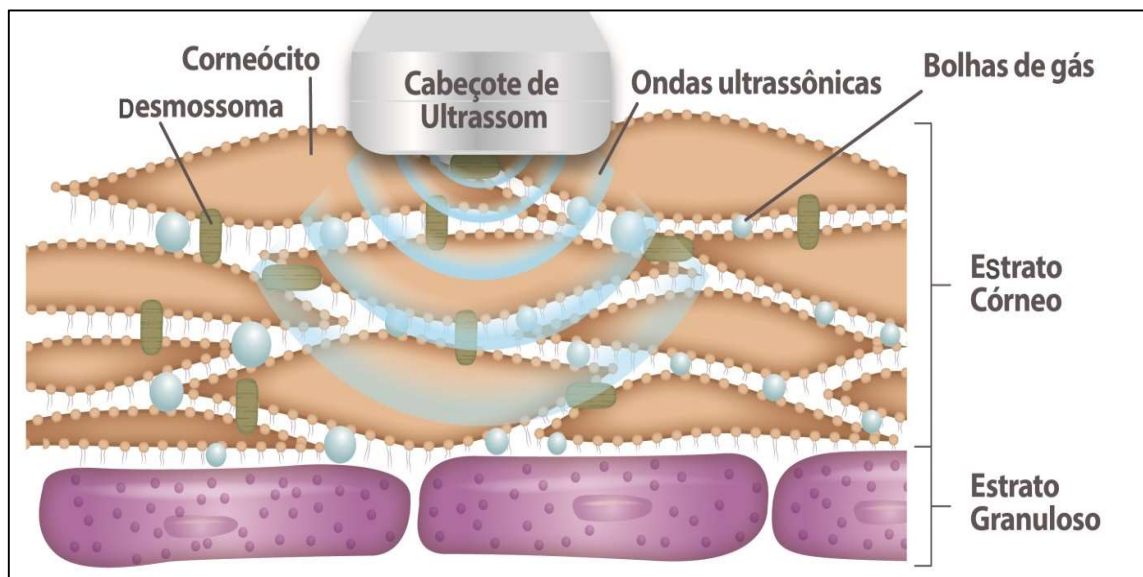
#### 2.4.1.2 Efeito de cavitação

O efeito de cavitação do ultrassom tem sido considerado como o principal mecanismo responsável pelo aumento da permeabilidade da pele e, conseqüentemente, o maior contribuinte da fonoforese. As oscilações das pressões acústicas no tecido, normalmente provocadas pelas ondas ultrassônicas, podem formar bolhas de gás nos líquidos circulantes, como também, provocar o aumento do diâmetro das bolhas de gás já presentes nesses líquidos. Esse aumento do diâmetro pode levar ao colapso das bolhas e é justamente todo esse processo de formação, aumento e colapso das bolhas de gás, que podem causar desarranjo do estrato córneo, aumentando a sua permeabilidade (Rapoport *et al.*, 2010; Hussein *et al.*, 2007).

O mecanismo de cavitação estável ocorre quando as bolhas de gás crescem e pulsam, mas não há colapso delas. Já na cavitação instável, devido elevado Mechanical Index (MI), as bolhas de gás são levadas ao colapso em bolhas menores do que no seu estado anterior. Isso ocorre porque as ondas acústicas provocam pressões negativas nos tecidos e nos líquidos circundantes. Durante a ação das

ondas acústicas, parte do líquido que envolve a bolha de gás irá difundir-se para dentro da bolha e vaporizar, causando expansão do gás. A pressão negativa crescerá devido ao aumento de gás dentro da bolha, causando o colapso (Husseini *et al.*, 2007; Rapoport *et al.*, 2007).

O MI representa a relação entre a pressão negativa e a frequência. O MI é um indicador da probabilidade de cavitação em meios expostos ao ultrassom. Um MI abaixo de 0,7, teoricamente, significa nenhuma ou pouca ocorrência de cavitação (Afadzi *et al.*, 2012; Schroeder *et al.*, 2009; Rapoport *et al.*, 2010). Aumentar a pressão negativa e diminuir a frequência aumenta o MI e, portanto, a probabilidade de cavitação (Pong *et al.*, 2006). A Figura 17 ilustra as ondas ultrassônicas no estrato córneo e a formação das bolhas de gás.

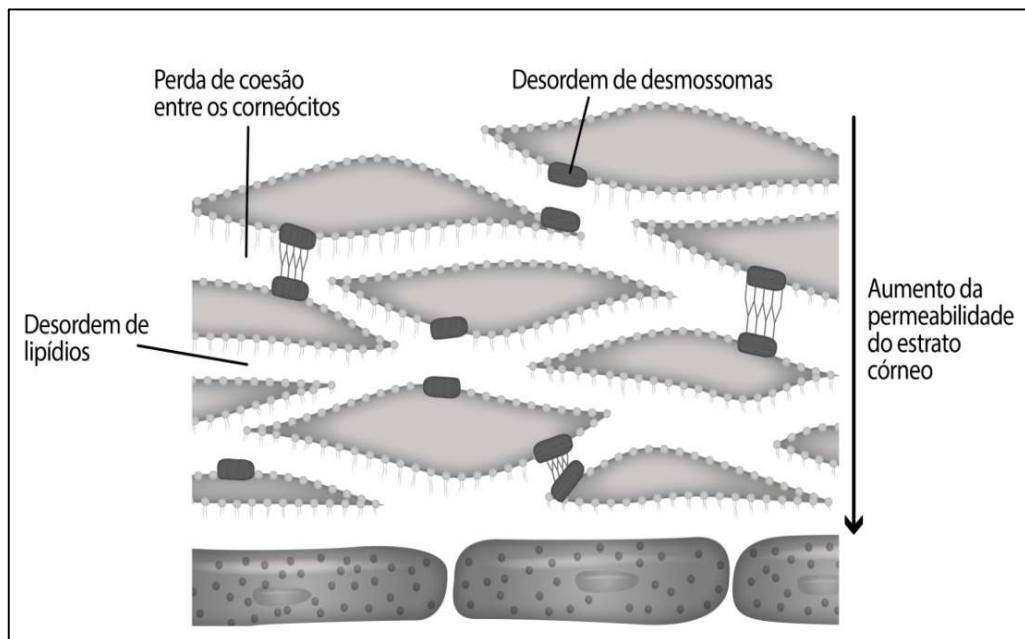


**Figura 17.** Ondas ultrassônicas e efeito de cavitação estável ou instável no Estrato Córneo. Fonte: Elaborado pelo autor.

A cavitação acústica é a expansão e contração de bolhas de gás em um líquido exposto a ondas de pressão acústica. A cavitação dentro da pele é acreditada como sendo o principal mecanismo de aumento da permeabilidade. A cavitação pode ocorrer em cavidades próximas aos corneócitos do estrato córneo, induzindo a desordem da bicamada lipídica ou também dentro dos apêndices da pele - folículos pilosos e glândulas (Richardson *et al.*, 2007). A cavitação é considerada o principal fator na criação de caminhos aquosos através do estrato córneo, distorcendo a bicamada lipídica, o que pode levar ao aumento do transporte

de fármacos hidrofílicos através da pele (Rangsimawong *et al.*, 2015; Rao e Nanda, 2009).

A grande maioria dos pesquisadores considera que o aumento da permeabilidade da membrana é atribuído à cavitação instável, tendo outros resultados demonstrados que a cavitação estável também pode causar desordem do estrato córneo. Pesquisadores investigaram o papel da cavitação na permeação cutânea da calceína, através da pele de rato excisada. Diferentes frequências e várias intensidades de ultrassom foram aplicadas. A permeabilidade à calceína correlacionou-se bem com a geração de cavitação instável no meio. Os resultados sugeriram que a cavitação instável na proximidade da superfície da pele é importante para a penetração de soluto (Ueda *et al.*, 2009). A Figura 18 mostra a consequente desordem da bicamada provocada pela aplicação das ondas ultrassônicas.



**Figura 18.** Desordem do estrato córneo: aumento da permeabilidade após ondas ultrassônicas. Fonte: Leite *et al.*, 2018

A cavitação instável causa uma liberação de fármaco encapsulado e perturba as membranas celulares (Rapoport *et al.*, 2007). Pesquisas analisando a liberação de drogas de micelas poliméricas por ultrassom mostraram que a cavitação estável pode induzir a liberação de fármacos, no entanto, a cavitação instável aumenta a liberação de fármaco de maneira significativamente mais substancial (Schroeder *et al.*, 2009).



#### 2.4.1.3 Intensidade de onda e efeito térmico

A intensidade (também denominada densidade de potência) de um feixe ultrassônico é medida em termos de potência transportada por área de seção do feixe, tipicamente com unidades de  $W/cm^2$ . É importante considerar que, embora a liberação máxima da droga encapsulada seja observada com o maior poder de densidade do ultrassom, o uso clínico pode ser limitado pelo dano tecidual causado em altas intensidades ultrassônicas. Tratando-se da intensidade do ultrassom pode-se dizer que as aplicações de baixa intensidade conduzem efeitos biológicos mínimos e nenhum dano tecidual. À medida que há o aumento da intensidade acústica, outros efeitos também podem ocorrer, especificamente aquecimento e grande cavitação (Pitt *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2011, Rao e Nanda, 2009; Hussein, 2007).

No estudo de Richardson *et al.* (2007), foi correlacionado a presença e o tipo de cavitação ultrassônica com uma diminuição no tamanho do lipossoma. A cavitação instável, no entanto, não se correlacionou com a diminuição do tamanho do lipossoma, uma vez que as mudanças no tamanho ainda ocorreram na cavitação estável. No entanto, foi o aumento da intensidade do ultrassom que diminuiu o diâmetro médio do lipossoma e não necessariamente o colapso das bolhas. Husseini e Pitt (2008) demonstraram que a quantidade de liberação de fármaco aumenta à medida que também aumenta a intensidade do ultrassom.

Nos estudos de Lin e Thomas (2003), lipossomas não mostraram capacidade de resposta aos níveis muito baixos de intensidade de ultrassom de baixa frequência. No entanto, acima de uma intensidade limiar de cerca de  $2 W/cm^2$ , os lipossomas mostraram um aumento de 10 vezes na permeabilização, medida pela liberação de um corante fluorescente. Os pesquisadores consideraram que este limiar de intensidade provavelmente representa o início da cavitação ultrassônica. Resultados aproximados em 2001 demonstraram que o ultrassom de baixa frequência, com intensidades entre  $0,2$  e  $2,7 W/cm^2$ , é indicado para aumentar a permeabilidade da pele (Tezel *et al.*, 2001).

No que se refere ao efeito térmico do ultrassom foi acreditado que o aquecimento era o principal mecanismo de ação para aumento da permeação (Brucks *et al.*, 1989; Meidan *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1995). Segundo Simonin (1995), o aquecimento pode aumentar a permeabilidade da pele: i) aumentando a

energia cinética e a difusão dos compostos de drogas; ii) dilatando pontos de entrada da pele (folículos capilares e glândulas sudoríparas); iii) facilitando a absorção de fármaco; e iv) aumentando a circulação de sangue na área tratada.

Segundo Merino *et al.* (2003), os efeitos térmicos podem explicar até 25% da permeação do fármaco e que o aumento restante ocorre devido à cavitação. Na última década, estudos têm mostrado que efeitos térmicos não desempenham um papel significativo, ou que o aumento de temperatura por si só não pode explicar o resultado terapêutico, como, também, se o aumento da temperatura for mantido por um período prolongado, os efeitos térmicos podem contribuir com o efeito terapêutico (Polat *et al.*, 2011; Lafon *et al.*, 2012).

Por outro lado, pesquisadores têm utilizado o efeito térmico do ultrassom no tratamento de tumores. Nesse caso, o objetivo é provocar grande aquecimento para liberação de drogas em lipossomas sensíveis ao calor ou até mesmo provocar ablação do tumor (Gourevich *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2002). O mecanismo de liberação parece ser independente da natureza do transportador de fármaco e da temperatura. No entanto, a quantidade de liberação da droga ocorre em função da temperatura e da química do veículo micelar (Husseini *et al.*, 2007).

Os sistemas de administração de drogas podem ser projetados para responder tanto à elevação da temperatura, como para os efeitos mecânicos das ondas ultrassônicas, ou para ambos os eventos. Relata-se que microbolhas, lipossomas e ultrassom focalizado, combinados, estão se tornando popular no diagnóstico e também na entrega de drogas (Chappell *et al.*, 2008; Yudina *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011; Hernot e Klibanov, 2008; Ibsen *et al.*, 2011; Rapoport *et al.*, 2011; Rapoport *et al.*, 2007; Rapoport *et al.*, 2010).

#### *2.4.1.4 Ciclo de trabalho, tempo e técnica de aplicação*

O ciclo de trabalho (*duty cycle*) do ultrassom representa a relação entre o tempo que as ondas ultrassônicas são emitidas e o tempo em que não há emissão de ondas. Os ciclos de trabalho variam de 0,5 a 100%. O ciclo de trabalho pode ser usado para controlar a quantidade de energia depositada e o calor gerado no tecido. 100% *duty cycle* terá maior efeito mecânico, principalmente o efeito de cavitação, e

em consequência maior será a desorganização da barreira cutânea (Polat *et al.*, 2011; Rangsimawong *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2013).

No estudo de Afadzi *et al.* (2012) a liberação do fármaco encapsulado em lipossomas aumentou linearmente com o tempo de exposição e com o ciclo de trabalho. Resultado similar ocorreu no estudo de Marin *et al.* (2001), quando a absorção de micelas de Pluronic melhorou com o aumento na duração do pulso, sendo o tempo de sonicação global o mesmo. Entretanto, não houve efeito significativo entre diferentes tempos de duração do intervalo entre os pulsos.

Ao escolher o ciclo de trabalho, devem ser consideradas as características da lesão que está sendo tratada. Os ciclos de 10 e 50%, conhecidos como ciclos pulsados, são necessários quando não se deseja provocar aquecimento no local a ser tratado. Os ciclos pulsados diminuem os efeitos térmicos, permitindo que o tempo sem emissão de onda dissipe o calor (Polat *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zortéa *et al.*, 2015; Victor *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2016). Estudo de Rapoport *et al.* (2011) mostrou que a formação de bolhas ocorre não apenas sob ultrassom de onda contínua, mas também sob ultrassom pulsado. Isso sugere que a cavitação tem um mecanismo atérmico.

Ebrahimi *et al.* (2012) compararam as ondas contínuas e pulsadas investigando o efeito da fonoforese de lidocaína no bloqueio sensorial em 93 voluntários saudáveis. Concluíram que o ultrassom pulsado com gel de lidocaína tópico induziu maior efeito anestésico em comparação com ultrassom contínuo. Schroeder *et al.* (2007) descobriram que lipossomas liberaram a mesma quantidade de fármaco quando expostos a ultrassom contínuo ou pulsado, tendo-se adotado o mesmo tempo de exposição total nos dois modos. Concluíram que os 2 modos de ondas podem atingir os objetivos terapêuticos, dependentemente dos outros parâmetros físicos do ultrassom, como intensidade, frequência e tempo de aplicação.

Outra variação na literatura diz respeito ao tempo de aplicação da técnica. Os tempos de tratamento variam de alguns segundos para alguns minutos por aplicação (Zhao *et al.*, 2013). Ao calcular o tempo pode-se medir a área a ser tratada e dividir o valor dessa medida pelo tamanho da área efetiva de radiação (*Effective Radiating Area - ERA*). Em grandes áreas, que exija um tempo maior de aplicação, sugere-se

dividir a área em quadrantes e realizar mais de uma aplicação (Spierings *et al.*, 2008; Seto *et al.*, 2010).

Outra forma de calcular o tempo é a emissão de 2 minutos por ERA, quando é realizada a medição da área com o próprio cabeçote. Nesse sentido, se a área a ser tratada corresponde ao tamanho de 4 ERAs, o tempo de tratamento será de 8 minutos (Levine *et al.*, 2001). Pesquisadores verificaram que tempos longos e intervalos curtos são capazes de provocar maior cavitação e melhor libertação do fármaco (Pong *et al.*, 2006).

Durante todo o tempo de aplicação do ultrassom de alta frequência, sugere-se que os deslocamentos do transdutor sejam de baixíssima velocidade, percorram pequenas distâncias e mantenham o contato com a pele, com auxílio do meio de acoplamento. O não controle dessas variáveis pode aumentar o efeito de reflexão das ondas e prejudicar o aumento da permeabilidade da pele. Nos aparelhos de baixa frequência, para maior segurança, indica-se que a distância entre superfície da pele e o transdutor (*horn-to-skin*) mantenha-se entre 0,3 cm e 4,0 cm (Polat *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013). Pesquisadores indicam movimentos circulares durante aplicação de ultrassom de alta frequência (Victor *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2016; Zortéa *et al.*, 2015).

A técnica de aplicação da fonoforese pode ser executada de 3 maneiras: i) aplica-se o ultrassom com gel acoplante e, imediatamente após, faz-se a aplicação tópica do fármaco; ii) aplica-se topicamente o fármaco e, imediatamente após, faz-se a aplicação do ultrassom com gel acoplante; ou iii) faz-se aplicação simultânea do ultrassom e do fármaco. Nesse último, o fármaco também servirá como agente acoplante. O protocolo simultâneo é o mais comumente utilizado nas clínicas de fisioterapia com o ultrassom de alta frequência. Entretanto, quando há riscos de degradação do princípio ativo do fármaco, o que pode acontecer, principalmente, com o ultrassom de baixa frequência, sugere-se a utilização da primeira opção. Acredita-se que o efeito sinérgico seja o mesmo, independentemente da técnica de aplicação utilizada (Barja *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2010; Polat *et al.*, 2011).

Foi demonstrada, num estudo em ratos, a aplicação prévia do ultrassom de baixa frequência e posterior aplicação de nanogel à base de nanopartículas poliméricas carregadas de lidocaína. Os resultados indicaram que o início da anestesia transdérmica, induzida pelo efeito sinérgico, foi mais rápido em

comparação aos controles. Dessa forma, os pesquisadores concluíram que a pele exposta ao ultrassom permaneceu em um estado de alta permeabilidade por várias horas. Assim, as drogas podem ser aplicadas através da pele após aplicação prévia do ultrassom (Gou *et al.*, 2009).

## **2.4.2 O efeito sinérgico do ultrassom com os nanomateriais**

### *2.4.2.1 Vias de penetração dos nanomateriais*

Existem controversas em relação à capacidade das nanopartículas para penetrar na derme. Pesquisas sugerem que a penetração de nanopartículas pode ocorrer em quantidades muito pequenas (Zhang *et al.*, 2008; Ryman-Rasmussen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Baroli, 2010). Considera-se que a extensão da penetração, bem como, a via de entrada, dependem fortemente de todas as interações que podem ocorrer entre os nanomateriais e as estruturas da pele. As dimensões das nanopartículas, o gradiente lipofílico-hidrofílico e o gradiente de pH devem ser considerados como parâmetros que vão influenciar a penetração dos nanomateriais (Baroli *et al.*, 2007).

Pesquisadores consideram que a presença do fármaco ocorre apenas em aberturas foliculares, com propensão a se acumular menos, com o aumento do tamanho das nanopartículas (Zhang *et al.*, 2008; Cevc e Vierl, 2010; Watkinson *et al.*, 2013). Segundo Polat, Seto *et al.* (2011), nanopartículas muito maiores do que o diâmetro de poro aquoso (pele de porco em torno de 3,3 nm) não ultrapassam essa via sem algum tipo de facilitação.

Para Paliwal *et al.* (2006), o caminho mais provável de penetração dessas nanopartículas é através de regiões lacunares presentes nas bicamadas lipídicas (comprimento:  $183,9 \pm 95,03$  nm; largura:  $48,1 \pm 12,09$  nm). Portanto, segundo os autores, a área ocupada por essas imperfeições é pequena, levando à penetração de uma quantidade muito pequena de nanopartículas na derme.

Entretanto, a formação de poros temporários na membrana celular, conseguida através da aplicação de várias energias físicas, é o fenômeno que vem mostrando melhora no transporte transdérmico de nanomateriais. Uma vez formados os poros, os nanomateriais portadores de fármacos, podem penetrar e entrar nas

células porque algumas das restrições da barreira cutânea podem ser superadas pela utilização de energias físicas (Schroeder, Honen *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2011; Polat *et al.*, 2011; Victor *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2016).

#### 2.4.2.2 Energia física do ultrassom diminuindo barreiras aos nanomateriais

Quando a cavitação ocorre em soluções aquosas enriquecidas com moléculas tensoativas, como nas nanoemulsões, microemulsões e lipossomas, os tensoativos se acumulam na interface gás/líquido da bolha cavitadora, reduzindo assim a tensão superficial da bolha. Essas bolhas são menos estáveis e colapsam em tamanhos relativamente menores do que as bolhas em soluções aquosas sem surfactantes (Schroeder *et al.*, 2009). Estudos com diferentes surfactantes (Triton X-100, Triton X-405, Tween 20 e Tween 80) mostraram que eles podem aumentar drasticamente a suscetibilidade à onda ultrassônica (Lin e Thomas, 2003).

Outro fenômeno relacionado às bolhas oscilantes é chamado de pressão acústica. É uma força que atua sobre outros corpos suspensos na proximidade de uma bolha oscilante. Se o corpo é mais denso do que o líquido circulante, o corpo é empurrado para a bolha. Se é menos denso, o corpo é repelido da bolha. A maioria dos nanomateriais são mais densos e, portanto, serão atraídos em direção à bolha, aumentando, assim, o transporte dispersivo do transportador de fármacos. Se o nanomaterial for empurrado em direção ao campo do jato sônico de fluído produzido pela cavitação instável, a alta taxa de cisalhamento irá romper a membrana do nanomaterial, liberando a droga (Pitt *et al.*, 2004). Pesquisadores também compararam diferentes tamanhos de lipossomas e a relação com a força de cisalhamento. Verificaram que nanomaterias na faixa de 900nm provocaram maior força de cisalhamento em relação aos nanomaterias de 100nm (Pong *et al.*, 2006).

Lipossomas ou micelas poliméricas podem se transformar em um tamanho menor do que antes do encontro com o campo de cisalhamento. O caso de um redimensionamento de lipossomas em uma série de vesículas menores, com a mesma quantidade de área de superfície, apresenta um método interessante de liberação de fármaco. O líquido interior do lipossoma será liberado durante o evento de fratura (Pitt *et al.*, 2004). A redução no tamanho dos lipossomas após a aplicação de ultrassom é relatada em outros estudos (Schroeder *et al.*, 2009).

Rangsimawong *et al.* (2015) investigaram em pele de porco, por meio de microscopia eletrônica de varredura, o efeito do ultrassom de baixa frequência no transporte de lipossomas carregados com fluoresceína de sódio. Curiosamente, foi revelado que o ultrassom pode deslocar parcialmente os corneócitos, cobrindo os orifícios do folículo piloso, reduzindo a absorção percutânea. Em folículos pilosos seletivamente bloqueados, a penetração na pele diminuiu com e sem ultrassom, indicando que a via transfolicular é a via de penetração principal.

No estudo de Lademann *et al.* (2007), nanopartículas foram armazenadas nos folículos pilosos até 10 dias, enquanto a forma não-partícula só pode ser detectada até 4 dias. Levando em consideração a estrutura superficial dos folículos pilosos, os autores consideraram que o movimento dos pêlos pode atuar como um mecanismo de bombeamento, empurrando as nanopartículas para dentro dos folículos pilosos.

No estudo de Paliwal *et al.* (2006), *quantum dots* (QDs) foram observados tanto nos folículos pilosos, quanto em regiões fora dos folículos. Esse estudo revelou que o ultrassom aumentou significativamente a frequência de ocorrência dos espaços lacunares (via intercelular) e possivelmente levou à formação de uma rede porosa tridimensional, que foi capaz de transportar QDs. Lee *et al.* (2010) desenvolveram nanopartículas de óxido de ferro, carregadas de nitrato de lantânio, e examinaram a via de penetração após o tratamento combinado com ultrassom de 25 Khz. A análise quantitativa revelou que o tratamento combinado aumenta significativamente a penetração do nitrato de lantânio através da via transcelular. Usando Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão, observaram-se poros de 1 a 2  $\mu\text{m}$  na superfície dos corneócitos, após aplicação combinada. O estudo mostrou que, na ausência de ultrassom, o nitrato de lantânio foi restrito às camadas superiores do estrato córneo.

Outras investigações evidenciaram a permeação de nanopartículas através de poros aquosos (via transcelular) localizados nas regiões da matriz lipídica do estrato córneo (Baroli, 2010; Ryman-Rasmussen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). O ultrassom aprimora a penetração das nanopartículas, tanto aumentando a densidade da área, o comprimento e a conectividade das regiões lacunares do estrato córneo, como aumentando o diâmetro dos poros aquosos (Seto *et al.*, 2010; Polat, Seto *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2011). Estudos apoiam que o ultrassom cria porosidades ou

interrupções transitórias na membrana celular, facilitando a passagem das nanopartículas (Schlicher *et al.*, 2006; Hussein e Pitt, 2008; Prato *et al.*, 2015).

A entrada de drogas nas células em condições normais parece envolver a endocitose e o transporte através da membrana celular para o citoplasma. Nesse sentido, a aplicação do ultrassom aumenta a taxa de absorção por esta última rota, mas não parece aumentar a absorção de drogas devido a endocitose. Embora o ultrassom libere o fármaco dos nanomateriais, a absorção aumentada parece ser devido ao aumento da difusão passiva, devido ao aumento da concentração externa de drogas livres e devido à perturbação da membrana celular. Os tecidos controles que não estavam expostos ao ultrassom continham apenas vestígios de nanopartículas (Hussein *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que a administração de micelas poliméricas com ultrassom de alta frequência, não focado, aumentou a taxa de endocitose em células de carcinoma de ovário (Gao *et al.*, 2004). Dessa forma, a ocorrência ou não de endocitose precisa ser melhor elucidada em futuras pesquisas.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da Nanoemulsão à base de Glucosamina e Condroitina, associada à fonoforese e a cinesioterapia, no tratamento das condropatias em joelhos de humanos.

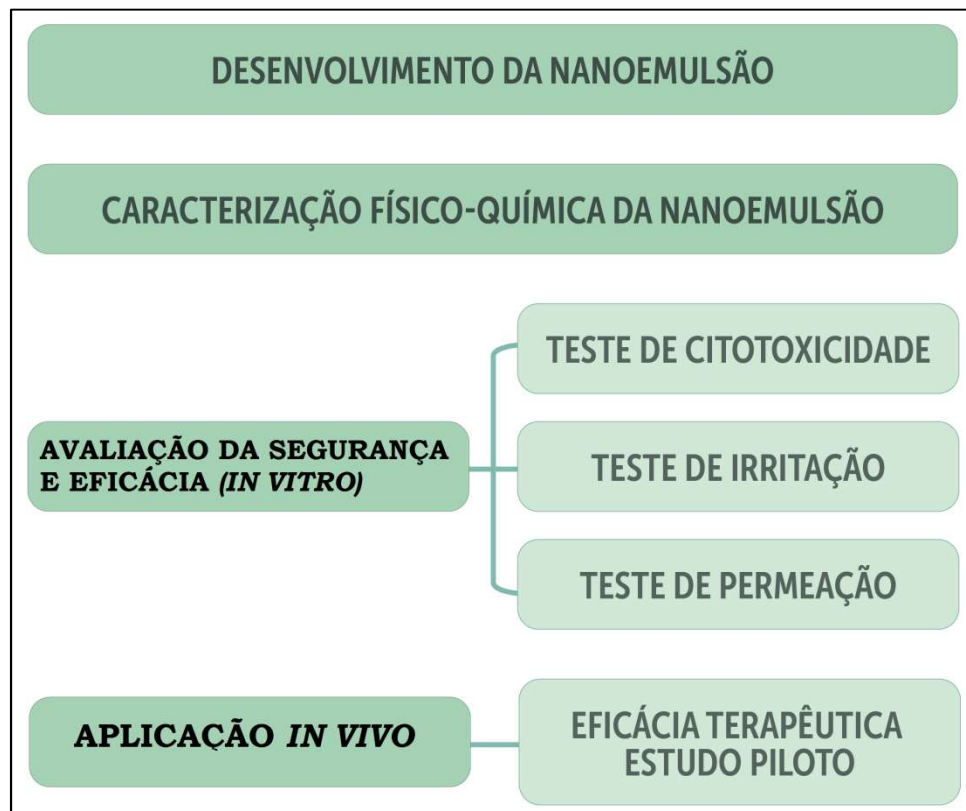
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Desenvolver uma nanoemulsão a base de glucosamina e condroitina e avaliar suas características físico-químicas e sua estabilidade;
- 2) Avaliar a segurança da nanoemulsão utilizando a metodologia *in vitro* brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT);
- 3) Avaliar o potencial de irritação da nanoemulsão, utilizando a metodologia *Hens Egg Test-Chorion Allantonic Membrane* (HET-CAM);
- 4) Avaliar o potencial de permeação cutânea *in vitro* usando uma célula de difusão como metodologia;
- 5) Realizar um estudo clínico piloto para testar, avaliar, revisar e aprimorar os instrumentos e procedimentos de pesquisa; e
- 6) Estabelecer a segurança da formulação, no que diz respeito às reações tóxicas, em curto e médio prazo.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 ETAPAS METODOLÓGICAS

A presente pesquisa teve como proposta atingir seus objetivos com 4 etapas metodológicas. A Figura 19 ilustra o delineamento experimental.



**Figura 19.** Fluxograma ilustrando as 4 fases metodológicas da pesquisa: Desenvolvimento da nanoemulsão, Caracterização físico-química, Avaliação da segurança e eficácia *in vitro* e Aplicação *in vivo*.

### 4.2 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

A nanoemulsão foi desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB. Durante os primeiros testes em bancada foram utilizados diferentes componentes em diferentes proporções. Com base em revisão de literatura (Leite *et al.*, 2018), foram selecionados diferentes surfactantes e diferentes componentes para compor as fases oleosas e aquosas. Foram pesquisadas as bases de dados Medline, Pubmed, Scopus e Web of Science, utilizando combinações das palavras-chaves: *microemulsions*, *nanoemulsions*, *hydrophilic*, *drugs*, *skin*, *topical and transdermal*. Foram identificados 111 artigos potencialmente relevantes com a combinação das palavras-chaves e a delimitação da data. Na primeira fase da

análise foram excluídos 7 artigos duplicados, 3 artigos na língua chinesa e 18 artigos de revisão. Foi realizada a leitura dos resumos de 83 artigos. Após leitura dos resumos foram removidos 73 artigos que não cumpriram os critérios de inclusão. O motivo de remoção mais expressivo foi representado pelos estudos com fármacos lipofílicos, sendo 45,20 % das exclusões (resumo do artigo - Anexo II). A Tabela 8 cita todos os componentes e equipamentos utilizados durante os testes.

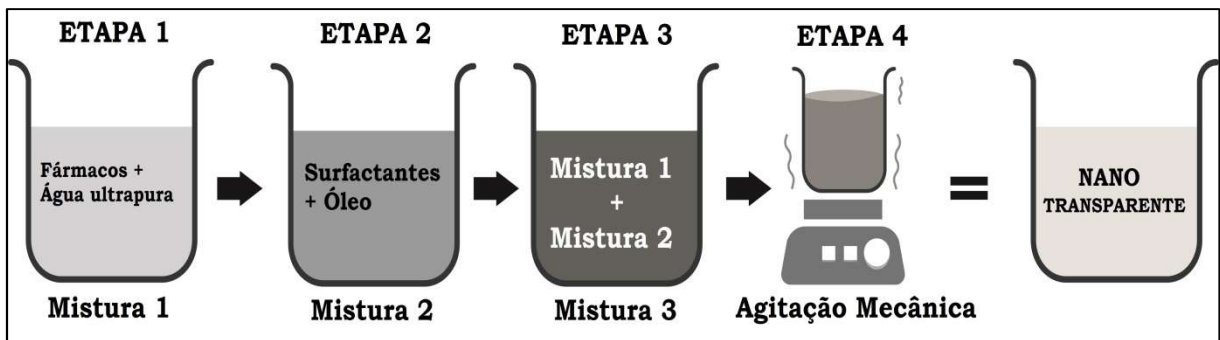
**Tabela 8.** Reagentes e equipamentos utilizados no desenvolvimento da nanoemulsão, até a formação de um sistema estável e transparente.

Reagentes/equipamentos	Fornecedores
Tween 80 <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Span 80 <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Span 20 <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Álcool Butílico	Vetec Química (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
Miristato de Isopropila	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Glucosamina 6-sulfato	Summit Nutritional Internacional (Branchburg, EUA)
Condroitina 6-sulfato	Summit Nutritional Internacional (Branchburg, EUA)
Butanol	Acros Organics (Geel, Bélgica)
TCC*	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Octildodecanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Transcutol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Cremophor ELP	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Óleo de Rícino	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Agitador Magnético	Químis
Daigger Vortex	Genie-2
Condutímetro	Químis
Balança Analítica	Denver Instrument Company

\*Triacilglicerol cáprico/caprílico

A nanoemulsão contendo GS e CS foi preparada por meio de um método de nanoemulsificação espontânea (Figura 20), com ambos os fármacos dissolvidos na fase aquosa. Ressalta-se que a reprodutibilidade no preparo da nanoemulsão foi testada em diversas ocasiões, mostrando características físico-químicas semelhantes. Primeiramente, todos os componentes foram pesados em balança analítica. Em seguida, os fármacos (5 gramas de cada) foram dissolvidos em 80 mL

de água ultrapura. Em outro frasco, 9 gramas de surfactante e 3 gramas de óleo foram misturados durante 15 minutos, com agitação mecânica a 40 graus centígrados. Por fim, a fase aquosa, contendo os fármacos, foi vertida sobre a mistura de surfactante e óleo. Essa última mistura foi mantida com agitação mecânica branda, por 2 horas, até a formação de uma nanoemulsão transparente.



**Figura 20.** Ilustração da nanoemulsificação espontânea. Etapa 1: mistura dos fármacos em água ultrapura; Etapa 2: mistura do surfactante com o óleo; Etapa 3: Mistura 1 vertida sobre Mistura 2; Etapa 4: agitação mecânica branda até transparência. Fonte: Leite *et al.*, 2018.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOEMULSÃO

#### 4.3.1 Análise das propriedades coloidais

A aplicabilidade industrial das nanoemulsões pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. O diâmetro hidrodinâmico (DH), o potencial zeta (Zp), o índice de polidispersão (PDI) e a determinação do pH são geralmente os parâmetros físico-químicos utilizados para monitorar a estabilidade da maioria dos nanomateriais, inclusive das nanoemulsões.

O DH, o Zp e o PDI da nanoemulsão foram medidos em aparelho de DLS (Zetasizer ZS90, Malvern®). Para cada leitura, a formulação foi previamente diluída em água ultrapura na concentração de 5% (v:v). A temperatura para análise foi mantida em 25 °C e o ângulo de leitura em 90°. O laser usado emitia luz em  $\lambda$  633 nm. Os resultados foram apresentados como a média das triplicatas, sendo cada replicata composta por 10 medições.

### **4.3.2 Avaliação da estabilidade da formulação**

A estabilidade da formulação dispersa em água foi avaliada em diferentes condições. Para isso, alíquotas contendo a formulação foram submetidas em estufa a diferentes temperaturas de armazenamento: temperatura ambiente (26 °C), 4 °C e 37 °C. As características coloidais (DH, Zp e PDI) foram então avaliadas a cada 15 dias durante 5 meses. As dispersões da formulação também foram avaliadas quanto ao pH (pHmetro digital, marca Digimed, modelo DM-22) e foram centrifugadas (Centrífuga Hettich, Mikro 220R, Alemanha) a 31.514 × g, por 30 minutos, em microtubos, sob temperatura de 4 °C, para a investigação de separação de fases.

### **4.3.3 Análise morfológica por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (Cryo-Tem)**

A obtenção das imagens por Cryo-TEM foi realizada na CIC biomaGUNE, Espanha, utilizando o Microscópio de Transmissão JEOL JEM-1400PLUS (40kV - 120kV), equipado com i) câmera GATAN US1000 CCD (2k x 2k), ii) sistema de placa de imagem DITABIS (6k x 5k), e iii) suporte de amostras Criogênico D626 (Gatan Inc., Pleasanton, EUA). 5 µL de amostra da Nanoemulsão de GS e CS foram colocadas na grade, em seguida a amostra foi rapidamente congelada (por meio de um congelador de mergulho automático). A amostra foi vitrificada instantaneamente, prejudicando qualquer alteração da morfologia das partículas. Depois disso, a grade foi transferida para o suporte da amostra e inserida no microscópio.

## **4.4. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO***

### **4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro***

#### **4.4.1.1 Cultivo celular**

O teste foi realizado Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB). Foram seguidas as normas da ISO 10993-5-1999. Os resultados também foram classificados seguindo as mesmas normas (Tabela 9), que diferencia, percentualmente, a viabilidade celular em diferentes níveis. A escolha de fibroblastos da linhagem NIH- 3T3 foi justificada

pela formação de denso tecido conectivo, e por representarem um tipo celular pré-estabelecido no estudo da citotoxicidade dos materiais (Bhatia e Yetter, 2008).

Essas células, do tipo não-tumorais e murinas, foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. Elas foram cultivadas com o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) em pH 7,4, suplementadas com 10% (v:v) de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% (v:v) da solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco, USA)). A linhagem celular foi mantida em incubadora úmida a 37°C, 80% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 9.** Classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem, segundo categorias de toxicidade dos materiais – documento ISO 10993-5:1999.

Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)*
	Faixa
não-citotóxico	> 90
levemente citotóxico	80 a 89
moderadamente citotóxico	50 a 79
severamente citotóxico	< 50

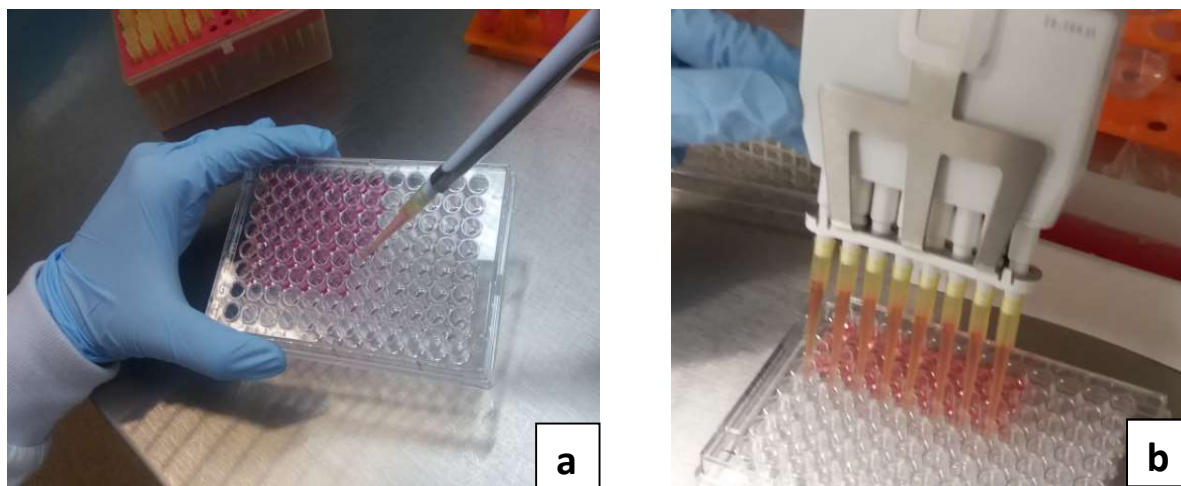
\*porcentagem em relação ao controle negativo de toxicidade

#### 4.4.1.2. Análise de viabilidade celular pelo método MTT

O teste de citotoxicidade utilizado foi o Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Tetrazolio (MTT). O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda., Brasil) previamente esterilizada com luz ultravioleta por 20 minutos e utilizando materiais esterilizados. O número de células para o experimento foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e exclusão por azul de tripan. As células foram semeadas em microplacas de cultivo de poliestireno contendo 96 poços. O plaqueamento foi feito 24 horas antes do tratamento para adesão das células ( $1 \times 10^4$  células/poço). Inicialmente foi feita a diluição de uma solução estoque (Nanoemulsão de GS e CS) em meio de cultivo (1:10 ml).

As células foram tratadas (Figura 21a) com a Nanoemulsão de GS e CS e com meio de cultivo (controle). O tratamento foi realizado em sextuplicata e em 12 concentrações diferentes (1660; 550; 180; 60; 20; 6; 2; 0,7; 0,2; 0,08; 0,028 e 0,009 µg de GS e CS/ml). Depois de 24 horas, as amostras (nanoemulsão e meio de

cultivo) foram removidas e as células foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT (Figura 21b) em meio de cultivo por 2 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e o formazan foi disperso com 200 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. As placas foram analisadas em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm.



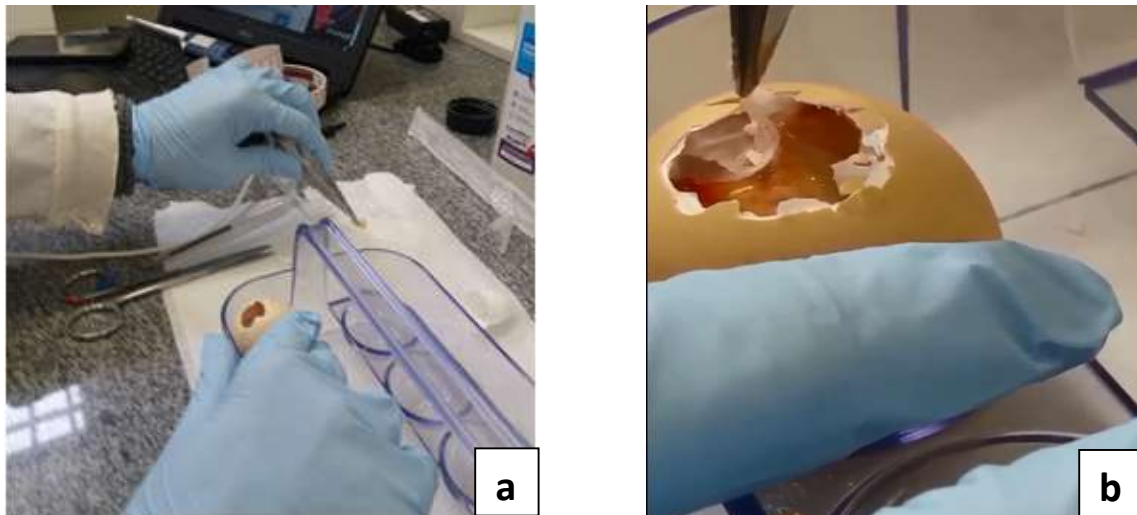
**Figura 21a.** Tratamento das células NIH-3T3 com Glucosaminae de Gs e CS. **Figura 21b.** Preparação das células com MTT para posterior incubação. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular. A análise de regressão foi realizada nos resultados de viabilidade, resultando em uma equação usada para calcular a concentração de substância necessária para produzir 50 % de redução de viabilidade celular (IC<sub>50</sub>). Os resultados foram analisados no software GraphPad Prisma® 6.0 e foram submetidos a testes estatísticos específicos, com confiança estatística de 95% (p<0,05). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes Anova Sidak's. Os resultados quantitativos foram descritos como média ± desvio padrão.

#### 4.4.2. Avaliação do potencial irritativo pelo método HET\_CAM

O *Hens Egg Test-Chorion Allantonic Membrane* (HET-CAM) foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde - UnB. Foram utilizados ovos de galinha no 9º dia de incubação. Os ovos foram colocados em uma posição com o lado equatorial para cima (Figura 22a) e uma janela de 2 x 2 cm foi aberta para expor a CAM (Figura 22b), onde foram colocadas 300µL das amostras.

Após 20 segundos, as amostras foram removidas e a CAM foi cuidadosamente lavada com soro fisiológico a 0,9%, a 37 °C, para assegurar a remoção total da substância testada. Foram utilizados 3 ovos para cada amostra. A CAM foi observada visualmente durante 5 minutos (nos tempos 0,5, 2 e 5 min) em relação ao aparecimento de qualquer dos seguintes fenômenos: hiperemia, hemorragia e coagulação, para os quais foram atribuídos uma pontuação.



**Figura 22a.** Posicionamento do ovo para o teste. **Figura 22b.** Abertura para exposição da CAM. Fonte: Elaborada pelo autor.

O tempo necessário (em segundos) para provocar qualquer um desses eventos foi anotado e o cálculo do índice de irritabilidade foi realizado conforme a equação abaixo, onde II (Índice de Irritabilidade); HE (Tempo Hemorragia); HP (Tempo Hiperemia); C (Tempo Coagulação) (Oliveira *et al.*, 2012).

$$II = \frac{(301 - HE) \times 5}{300} + \frac{(301 - HP) \times 7}{300} + \frac{(301 - CO) \times 9}{300}$$

Para detecção da Hiperemia, observa-se o aparecimento de capilares que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis são visualizados com intensificação da cor. Para detecção da Hemorragia, observa-se um espalhamento de sangue sobre a CAM. A Coagulação é detectada pela agregação de plaquetas que forma uma espécie de mancha rosada ou pela coagulação de proteínas



formando grumos esbranquiçados. Nessa última reação, é possível também observar um fenômeno de opacidade da CAM (Vinardell e Mitjans, 2006).

Como controle negativo, foi aplicado 300 µL de soro fisiológico a 0,9%. Como controle positivo, que possui alto potencial de irritabilidade, foi aplicado 300 µL de uma solução de NaOH a 0,1 molar. Os controles foram comparados com a Nanoemulsão com fármacos e Nanoemulsão sem fármacos. Esse ensaio foi adaptado conforme a metodologia descrita no *Journal Officiel de la République Française* (Vinardell e Mitjans, 2006). A classificação final das formulações, de acordo com seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM, está descrita na Tabela 10.

**Tabela 10.** Classificação quanto ao potencial de irritabilidade utilizando a metodologia HET-CAM.

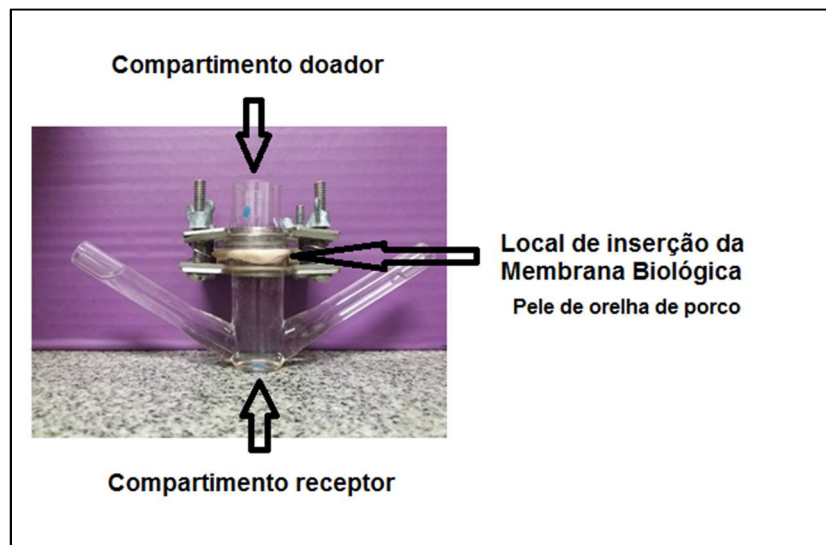
Faixa (gradação das lesões)	Classificação
0,0 – 0,9	Não irritante (NI)
1,0 – 4,9	Irritante leve (IL)
5,0 – 8,9	Irritante moderado (IM)
9,0 – 21,0	Irritante severo (IS)

Fonte: (Vinardell e Mitjans, 2006).

#### 4.4.3 Avaliação da permeação cutânea *in vitro*

A avaliação da permeação cutânea foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Faculdade de Ciências da Saúde - UnB. Foram utilizadas orelhas de porco doadas pela empresa Bonasa Alimentos S/A. As orelhas de porco foram armazenadas em congelamento a  $-4^{\circ}$  e descongeladas para o ensaio de permeação. A célula de difusão foi montada com a pele da orelha de porco, separando o compartimento doador do compartimento receptor. No compartimento doador foram adicionados 1 mL da formulação ou do seu respectivo controle (Nanoemulsão de GS e CS e Solução de GS e CS com as mesmas concentrações dos fármacos). O compartimento receptor foi preenchido com a solução de tampão fosfato pH 7,4. A Figura 23 mostra a célula de difusão montada.

A célula foi mantida à temperatura ambiente e agitada a 400 rpm por 12 horas. Ao final dos experimentos de permeação cutânea, o líquido receptor foi coletado e filtrado e membrana hidrofílica com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . A quantidade de elementos que permaneceram retidas no estrato córneo foi separada daquela retida na pele. Utilizou-se para tal a técnica denominada *tape stripping* diferencial. No *tape stripping* diferencial a pele de porco após ser retirada da célula de difusão, é esticada e presa sobre um suporte de isopor.

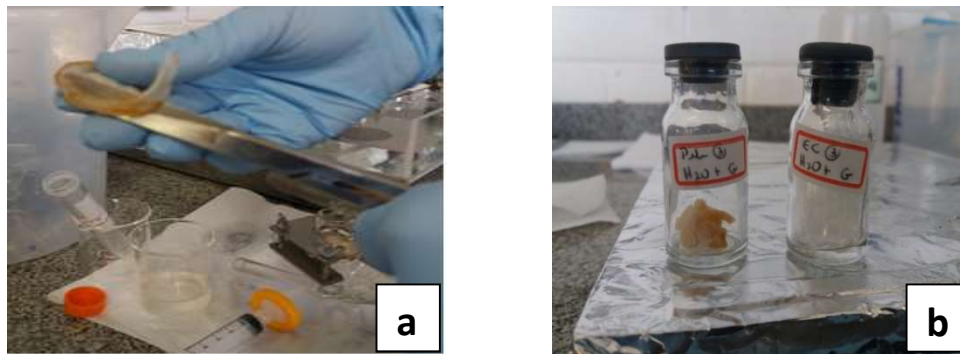


**Figura 23.** Célula de difusão montada para teste de permeação. Compartimento Doador; Compartimento Receptor; Local de Inserção da Membrana Biológica (pele de orelha de porco). Fonte: Elaborado pelo autor.

Um *template* de plástico com área de 1,0  $\text{cm}^2$  foi colocado sobre a pele de modo a deixar exposto somente a área de transporte do fármaco. O estrato córneo desta região foi totalmente removido com o auxílio de 10 fitas adesivas. As fitas adesivas e a pele foram picotadas e transferidas para um frasco vidro âmbar, de onde se extraiu os fármacos pela adição de 5 mL de água ultrapura em cada frasco (Figuras 24a e 24b). Os frascos foram deixados em agitação, tampados por 12 horas, e seu conteúdo foi filtrado em filtros com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . Todo o experimento foi realizado em triplicata.

A base dos experimentos *in vitro* de permeação cutânea é determinar as quantidades de fármaco que atravessam as camadas da pele (ou que ficam retidas nas mesmas), ou que chegam até o compartimento receptor. A utilização de um método analítico sensível é de extrema importância. As características hidrofílicas dos fármacos em estudo dificultaram a quantificação dos mesmos pelo método de

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Foram reproduzidos ensaios de HPLC já validados na literatura (Koshiishi *et al.*, 1999; Habashi *et al.*, 2002; Pengfei, 2009; Ghada *et al.*, 2012; Jahangir *et al.*, 2015) com diferentes equipamentos, diferentes detectores e diferentes colunas, mesmo assim, não houve êxito na quantificação dos fármacos com esse método.



**Figura 24a.** A pele sendo picotada após agitação da célula por 12 horas. **Figura 24b.** Pele e fita (com estrato córneo) transferidas para frasco.

Os ensaios para determinação da dosagem de glucosamina e condroitina primeiramente foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da UnB. O cromatógrafo utilizado foi o Shimadzu Prominence (modelo DGU-20A5) constituído por desgaseificador em linha, por módulo de distribuição de solvente (modelo LC-20AT), injetor automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (modelo CTO-20A), detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) e controlador do sistema CBM-20A. Foi utilizada a coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (25 x 0,4 cm, com 5 µm de tamanho de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland), com pré-coluna (1 x 0,4 cm, 5 µm de tamanho de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland). O comprimento de onda do detector foi definido como 254 nm, temperatura da coluna de 30°C e 100% fase móvel. A fase móvel foi formada por água e acetonitrila. Outra tentativa de quantificação dos fármacos foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da UnB. Foi utilizado o cromatógrafo da marca Perkin Elmer, modelo Flexar. O sistema foi equipado com detector de Índice de Refração. A coluna utilizada foi C<sub>18</sub> (4,6 × 250 mm, 5 µm) Perkin Elmer. A fase móvel foi de tampão fosfato e acetonitrilo (99,5:0,5). A taxa de fluxo foi definida em 1 ml / min. A temperatura da coluna foi mantida a 28 ° C.

Dessa forma, como não houve êxito na quantificação dos fármacos utilizando o HPLC, foi decidido utilizar o método de Análise Elementar CHN (Carbono,

Hidrogênio e Nitrogênio). Os principais elementos de uma substância orgânica são comumente determinados usando o CHN. Nos analisadores de CHN, a substância orgânica sofre decomposição oxidativa e os produtos finais: dióxido de carbono, água e nitrogênio são quantificados (Fadeeva *et al.*, 2008).

A Análise Elementar foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da UnB. Todas as análises CHN foram realizadas utilizando um analisador CHN Perkin Elmer 2400 Series II. O sistema conta com um forno de alta temperatura para completa combustão das amostras, retenção seletiva dos gases (separação por cromatografia frontal) e detecção dos gases por Detector de Condutividade Térmica. Os gases foram reduzidos e capturados em uma câmara de mistura e homogeneizados antes de serem separados usando cromatografia em fase gasosa com detecção de condutividade térmica. Os resultados foram relatados como porcentagem em peso de cada elemento, com uma precisão de  $\pm 0,30\%$  e um limite de detecção de  $<0,10\%$ .

Após os ensaios *in vitro* de permeação cutânea, foram analisados os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio utilizando a Análise Elementar CHN, proposta como metodologia analítica para quantificação da GS e CS. Inicialmente foram analisadas em CHN algumas amostras (Tabela 11) antes de serem submetidas à célula de difusão. O objetivo foi identificar as diferenças das concentrações de carbono, hidrogênio e nitrogênio entre as amostras avaliadas, como também, identificar o quanto o estrato córneo e a pele tinham interferentes que iriam influenciar nessas concentrações. Em seguida foram definidas as amostras, que após serem submetidas ao teste de permeação, iriam ser analisadas em CHN (Tabela 12).

## 4.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO*

### 4.5.1. Metodologia do Estudo Piloto

Os métodos escolhidos para o ensaio clínico foram baseados em revisão bibliográfica que analisou pesquisas experimentais com uso tópico de GS e Condroitina (Leite *et al.*, 2017). Os principais artigos estão resumidos na Tabela 6. Foram utilizados também outros estudos a respeito da fonoforese citados no decorrer da descrição da metodologia. Destaca-se que a lista de recomendações

CONSORT (Padrões Consolidados para Relatar Ensaio), diretriz formada por um *checklist* de 25 itens para assegurar a qualidade dos relatos de estudos clínicos, também foi consultada para organização da metodologia desse ensaio.

**Tabela 11.** Amostras avaliadas no CHN antes de serem submetidas à célula de difusão.

ES_BR:	Estrato Córneo Branco (estrato córneo, sem nenhum tipo de formulação, foi picotado, deixado num frasco com 5 mL de água ultrapura, agitado por 12 horas e filtrado com membrana hidrofílica com porosidade de 0,22 µm).
PELE_BR	Pele Branco (pele viável, sem nenhum tipo de formulação, foi picotado, deixado num frasco com 5 mL de água ultrapura, agitado por 12 horas e filtrado com membrana hidrofílica com porosidade de 0,22 µm).
SOLUÇÃO CG	Condroitina e Glucosamina diluída em água
NANO_BR	Nanoemulsão Branco (Cremophor ELP, Óleo de Rícino e Água Ultrapura).
NANO.CG	Nanoemulsão com fármacos (Cremophor ELP, Óleo de Rícino, Água Ultrapura, Condroitina e Glucosamina).

**Tabela 12.** Amostras avaliadas no CHN após serem submetidas à célula de difusão.

SOLUÇÃO CG	Retida no Estrato Córneo
SOLUÇÃO CG	Retida na Pele Viável
SOLUÇÃO CG	Quantificada no Líquido Receptor
NANO.CG	Retida no Estrato Vórneo
NANO.CG	Retida na Pele Viável
NANO.CG	Quantificada no Líquido Receptor

#### 4.5.1.1 Local, tipo de estudo e população

O ensaio clínico, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília - UnB (Anexo III), foi realizado no Hospital das Forças Armadas (HFA), Brasília - DF. Trata-se de um estudo clínico, experimental, controlado e randomizado. A população do estudo foi formada por pacientes admitidos no Ambulatório de Ortopedia e Fisioterapia do HFA.

Considerando o número de pacientes, por mês, que são atendidos no local da pesquisa e o percentual dos casos de condropatias, foi possível chegar numa população estimada de pacientes, em um período de 11 meses, que é o tempo previsto para triagem dos participantes. Foi decidido pela realização de um estudo piloto prévio. O estudo piloto é um teste, em pequena escala, dos procedimentos, materiais e métodos propostos para determinada pesquisa. A importância de conduzir um estudo piloto está na possibilidade de testar, avaliar, revisar e aprimorar os instrumentos e procedimentos de pesquisa. Administra-se um estudo piloto com o objetivo de descobrir pontos fracos e problemas em potencial, para que os mesmos sejam resolvidos antes da implementação da pesquisa propriamente dita (Canhota, 2008; Mackey e Gass, 2005).

#### 4.5.1.2 Amostra de participantes

Conhecendo o quantitativo da população do estudo piloto, foi calculada a amostra, chegando-se ao número de 161 pacientes (fórmula demonstrada abaixo). No estudo piloto a quantidade de participantes não precisa ser superior a 10% da amostra almejada (Canhota, 2008; Mackey e Gass, 2005). O estudo piloto foi realizado com pacientes triados entre 15 de setembro de 2017 e 15 de janeiro de 2018. O estudo piloto foi constituído por voluntários de ambos os sexos, adultos, até 55 anos de idade, diagnosticados clinicamente e por meio de exame de imagem (Raios-x e RNM), com lesão condral ou osteocondral, graus I, II ou III, conforme classificação da ICRS (Brittberg *et al.*, 2014).

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

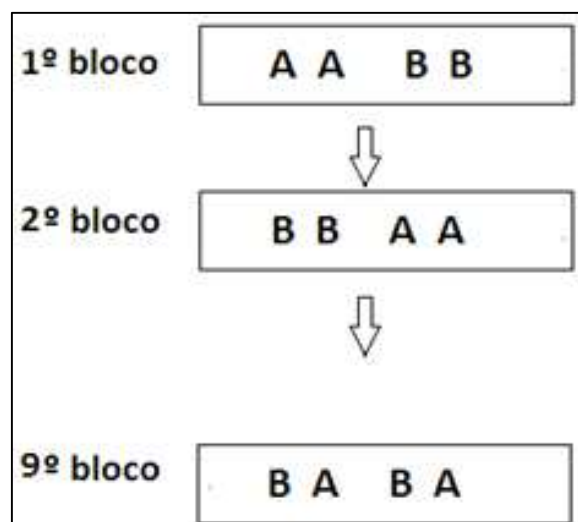
Onde n=amostra calculada, N=população, Z=nível de confiança, p=verdadeira probabilidade do evento e e=erro amostral (Santos, 2018).

#### 4.5.1.3 Formação dos grupos

O Termo de Compromisso Livre e Esclarecido – TCLE foi apresentado aos pacientes pela pesquisadora principal. Os pacientes que não concordaram em participar da pesquisa foram atendidos seguindo o protocolo padrão do local do

estudo. Um avaliador cegado, quanto aos tratamentos realizados, fez a randomização dos pacientes e aplicou os questionários de avaliação. Ressalta-se que o avaliador não teve acesso aos protocolos de tratamento e não teve acesso aos atendimentos dos pacientes, assim como a pesquisadora principal, que aplicou os protocolos de tratamento, não fez nenhuma interferência na randomização dos pacientes e na aplicação dos questionários de avaliação. Os pacientes não sabiam em qual dos grupos de tratamento foi alocado. Os frascos com as formulações eram identificados com números e a pesquisadora que aplicava os protocolos não foi cegada em relação aos tipos de formulações que estavam sendo aplicadas.

Os pacientes foram randomizados em blocos (*block randomization*). Foram formados blocos de 4 pacientes, dentro dos quais foram distribuídos os tratamentos em questão, bloco por bloco, até o final do processo de alocação dos primeiros participantes da pesquisa. A Figura 25 ilustra essa randomização. Depois da alocação em bloco (em média com 36% da amostra), as características dos grupos poderão ser analisadas e à medida que novos participantes sejam recrutados, eles poderão ser randomizados por minimização, ou seja, colocados em um dos grupos de modo a diminuir as diferenças porventura detectadas (sexo, idade ou grau de lesão) ou para manter o equilíbrio já alcançado.



**Figura 25.** Diagrama ilustrando o primeiro processo de randomização dos participantes. A = Controle e B = Tratamento com Nanoemulsão.

A randomização em bloco tem a vantagem de conferir um número igual de participantes nos grupos de estudo e controle, mesmo que o ensaio seja interrompido antes do final previsto. É útil também em estudos com número reduzido

de pacientes, pois a randomização simples feita a partir de uma tabela de números aleatórios só garante a homogeneidade entre os grupos quando há um grande número de participantes a serem randomizados.

O Grupo-Controle (A) foi tratado com i) exercícios terapêuticos para ganho e/ou manutenção da força e amplitude articular e ii) fonoforese: ultrassom com Nanoemulsão Branco. O Grupo-Nano (B) recebeu i) o mesmo protocolo de exercícios terapêuticos do Grupo-Controle e ii) fonoforese: ultrassom (com os mesmos parâmetros físicos do Grupo Controle) com Nanoemulsão de GS e CS. A análise foi realizada segundo a intenção de tratar (*intention-to-treat*), na qual foram incluídos todos os que foram aleatorizados para formar os grupos, independentemente de terem ou não completado o tratamento. Esta forma garante a manutenção dos grupos aleatórios e avalia o tratamento no mundo real, com suas imperfeições (Escosteguy, 1999). Dessa forma, também foi monitorado o que ocorreu com os que não completaram o tratamento, produzindo informações para aprimorar a continuidade da pesquisa.

#### 4.5.1.4 Métodos e materiais de aplicação da fonoforese

O aparelho de marca HTM, modelo Sonic Compact, de 1 MHz, com área efetiva de radiação (*Effective Radiation Area – ERA*) de 3.0 cm<sup>2</sup>, calibrado pelo próprio fabricante (Balança de Radiação), foi utilizado para aplicação da fonoforese. Os dispositivos de alta frequência têm um longo histórico de segurança e uso na fisioterapia, e têm a vantagem de ser mais prontamente utilizáveis em experimentos com seres humanos (Victor *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Zortéa *et al.*, 2015; Prato *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2016). Dessa forma, foi selecionado o ultrassom de alta frequência (1 MHz) para ser utilizado na pesquisa.

Em relação à intensidade, não há unanimidade na literatura, o que dificultou a sua escolha. As intensidades citadas nas pesquisas variam entre 0,5 e 3.0 W/cm<sup>2</sup> (Pong *et al.*, 2006; Prato *et al.*, 2015;). Inicialmente, foi escolhida a intensidade de 1.5 W/cm<sup>2</sup> (média entre as pesquisas) para uma técnica semi-estacionária, com movimentos circulares. Porém, dentre os primeiros 8 participantes, nas duas primeiras semanas de tratamento, 3 deles queixaram-se de dores durante a aplicação do ultrassom. Foi sendo feito ajustes na intensidade até a seleção final de



um valor que não gerasse desconforto em nenhum dos participantes. A intensidade final selecionada foi de 1.2 W/cm<sup>2</sup>.

O ciclo de trabalho do ultrassom representa a relação entre o tempo que as ondas ultrassônicas são emitidas e o tempo em que não há emissão de ondas. O modo contínuo do ultrassom terá maior efeito mecânico, principalmente o efeito de cavitação, e, em consequência, maior será a desorganização da barreira cutânea (Polat *et al.*, 2011; Rangsimawong *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2013). Sendo assim, foi escolhido o modo contínuo para a realização desse experimento.

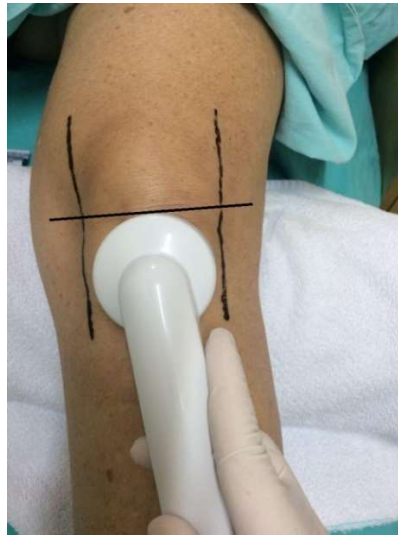
Devido às formulações apresentarem-se como veículos aquosos e também, com a intenção de evitar degradação dos fármacos. A técnica de aplicação da fonoforese foi executada aplicando-se primeiramente o ultrassom com gel acoplante e, imediatamente após, aplicou-se as formulações. Acredita-se que o efeito sinérgico seja o mesmo, independentemente da técnica de aplicação utilizada (Barja *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2010; Polat *et al.*, 2011).

O tipo de veículo pode interferir não só sobre as taxas de absorção, mas também sobre a profundidade de penetração. Nessa pesquisa, foi decidido pela utilização de um veículo aquoso, pelas próprias características hidrofílicas dos fármacos, como, também, pela sugestão na literatura de que pode ser um tipo de veículo que permita maior penetração (Singh e Roberts, 1994; McNeill *et al.*, 1992; Mikulak *et al.*, 1998). Devido a escolha pelo veículo aquoso e também pela sugestão na literatura optou-se pela oclusão do local, após aplicação das formulações. A oclusão foi realizada com plástico *insulfilm* por 1 hora.

Para calcular o tempo de aplicação do ultrassom numa área tão irregular, o joelho a ser tratado foi dividido em quadrantes. O tamanho de cada quadrante foi calculado e dividido pela ERA, para chegar ao tempo de aplicação de cada quadrante (Spierings *et al.*, 2008; Seto *et al.*, 2010). O tempo total variou entre 8 e 10 minutos. A Figura 26 ilustra o preparo da área para cálculo do tempo de aplicação. Durante a aplicação do ultrassom o participante permaneceu em decúbito dorsal, com joelho em semiflexão.

A mesma dose das formulações foi aplicada por sessão. Nos 2 grupos foram aplicados 20 ml em cada sessão. Na literatura consultada a respeito de uso tópico de GS e CS (Tabela 7) não foi encontrada unanimidade e clareza em relação à

quantidade a ser utilizada por aplicação. Dessa forma, foi utilizado como padrão os produtos comerciais de formulação convencional, a base de GS e CS. Esses produtos apresentam, em média, 115 a 120 ml como dose total e são indicados para 10 aplicações. As formulações foram aplicadas gradativamente, com borrifador e com massagem manual simultânea, até aparente absorção. Em seguida era realizada a oclusão. A Figura 27 mostra o joelho ocluído após fonoforese.



**Figura 26.** Divisão em quadrantes da área a ser tratada para cálculo do tempo de aplicação do ultrassom. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figura 27.** Joelho ocluído com plástico *insufilm* após fonoforese. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dois grupos foram submetidos ao tratamento 3 vezes por semana, durante três meses, representando 14 semanas de tratamento ou 30 sessões. Receberam protocolos idênticos de exercícios terapêuticos baseados em literatura (Duarte *et al.*, 2013; Bennell *et al.*, 2012). O treino em bicicleta ergométrica iniciou-se na 15ª sessão, com aumento gradativo do tempo, mantendo a carga leve. O treino em

*Transport* iniciou-se na 21ª sessão, também com aumento gradativo do tempo, sem carga e velocidade leve.

Em cada sessão de tratamento, os exercícios de alongamento foram repetidos por 2 vezes e mantidos por 20 segundos. Os exercícios isométricos foram repetidos de 5 a 10 vezes (gradativamente) e mantidos por 5 segundos. Os exercícios isotônicos foram repetidos de 2 a 3 vezes, cada série com 10 repetições. A carga inicial foi de 50% da carga máxima (Meereis *et al.*, 2013; Julio *et al.*, 2011). O peso ficou localizado no tornozelo. Exercícios estão descritos na Tabela 13.

**Tabela 13.** Protocolo de exercícios terapêuticos aplicados aos voluntários submetidos ao estudo de eficácia da Nanoemulsão de GS e CS

---

### **Atividades**

---

Treino em Bicicleta Ergométrica (marca Embreex, modelo 367). Aumento gradativo do tempo. Entre 5 a 15 minutos.

Treino em Transport (marca Embreex, modelo 212). Aumento gradativo do tempo. Entre 5 a 15 minutos.

Alongamento dos músculos: isquiotibiais, quadríceps, adutores, tríceps sural, piriforme e tensor da fáscia lata.

Fortalecimento isométrico dos músculos: quadríceps, coxa posterior, panturrilha, glúteos, abdutores e adutores de quadril. Aumento gradativo da carga e repetições.

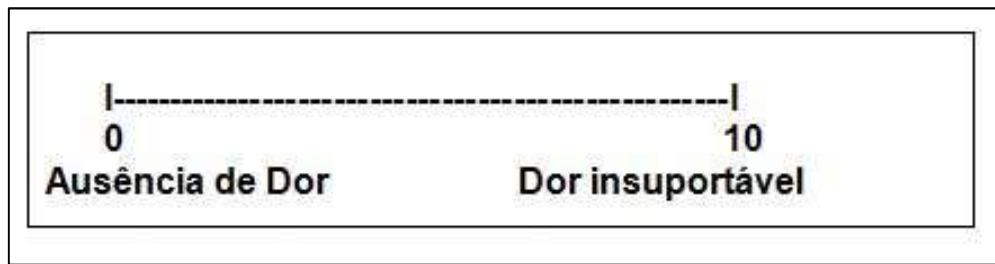
Fortalecimento isotônico dos músculos: quadríceps, coxa posterior, panturrilha, glúteos, abdutores e adutores de quadril. Aumento gradativo da carga e repetições.

---

Para calcular a carga máxima foi realizado o Teste de Uma Repetição Máxima (1 RM). Nesse teste, o indivíduo realizou duas repetições de extensão do joelho (postura sentada). Após realizá-lo livremente foi concedido um intervalo de 5 minutos para a recuperação e, então, uma nova tentativa com uma carga maior. Os movimentos, com aumento da carga, foram repetidos até o momento em que o indivíduo realiza-se apenas uma repetição, obtendo-se, então, a carga máxima do exercício. A carga foi aumentada gradativamente em ½ quilogramas (Meereis *et al.*, 2013; Julio *et al.*, 2011).

#### 4.5.1.5 Avaliação dos pacientes

Um avaliador cegado quanto aos tratamentos realizados utilizou instrumentos de avaliação, como: i) WOMAC (Anexo IV), um questionário que avalia dor, rigidez articular e funcionalidade auto-relatados; e ii) VAS de 10 cm (Figura 28). Os pacientes foram avaliados na admissão, na 10<sup>a</sup>, na 20<sup>a</sup> e na 30<sup>a</sup> sessões de tratamento.



**Figura 28.** Escala Visual Analógica de Dor de 10 cm.

O índice WOMAC é utilizado constantemente em estudos que avaliam efeitos de tratamentos para articulação do joelho (Mcalindon *et al.*, 2000; McConnell *et al.*, 2001; Serban *et al.*, 2016). O grau de dor, utilizando VAS, foi mensurado de acordo com os relatos dos pacientes quando informavam o momento ou movimento de maior dor no joelho. Foram comparados os exames de imagem pré e pós-intervenção daqueles pacientes que completaram o protocolo de tratamento com 30 sessões.

#### 4.5.1.6 Critérios de inclusão e exclusão

Cumpriram os critérios de inclusão as pessoas com condropatias graus I, II e III (diagnóstico clínico e diagnóstico por imagem - Raios-x e/ou RNM); adultos de 22 até 55 anos; participantes de ambos os sexos; participantes que assinaram o TCLE; e que podiam comparecer ao ambulatório de fisioterapia 3 vezes, durante a semana, por aproximadamente 3 meses.

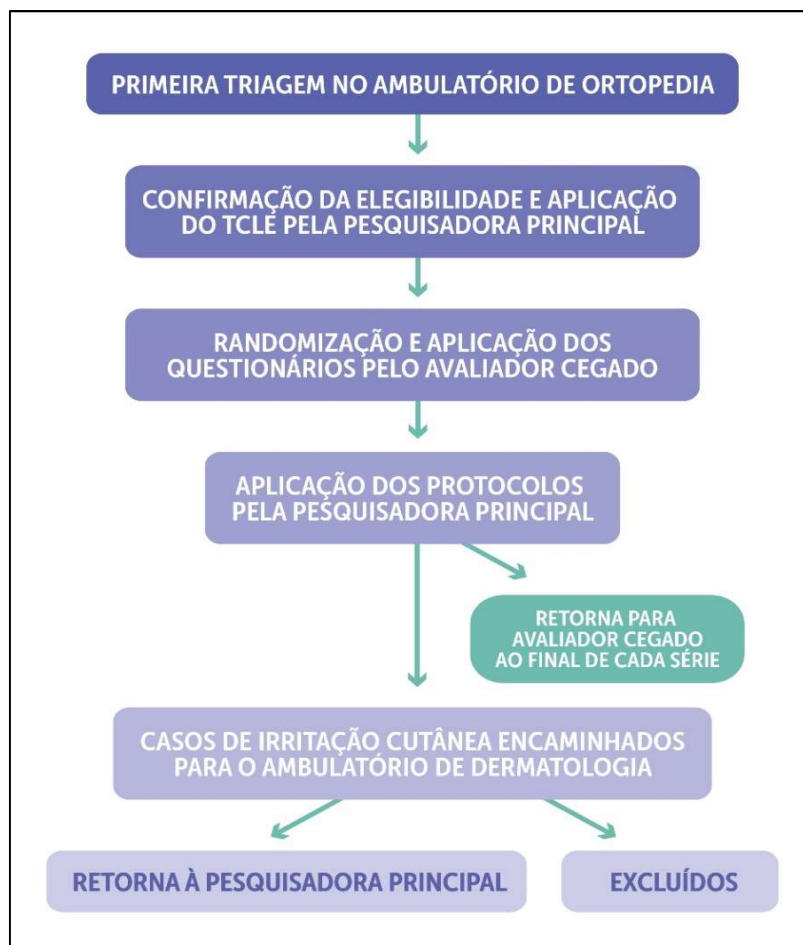
Pacientes que faziam uso oral da GS e CS foram excluídos da pesquisa, assim como aqueles pacientes que faziam tratamento com corticosteróides orais ou injetados. Após 3 meses sem uso desses fármacos, os indivíduos poderiam participar da pesquisa. Importante destacar que as contraindicações ou precauções gerais ao tratamento fisioterapêutico também foram observadas, como: presença de

marca-passo, gestação e cardiopatias. Pacientes com lesões meniscais e ligamentares também foram excluídos da pesquisa.

Comumente, na fisioterapia, aqueles pacientes que, na avaliação inicial, apresentam ou queixam-se de algum tipo de lesão/irritação tópica ou dermatites de contatos, não recebem indicação de nenhum dos recursos transdérmicos utilizados na fisioterapia. Aqueles pacientes com história de hipersensibilidade cutânea também recebem restrição desses recursos. Dessa forma, os participantes enquadrados nessas situações também foram excluídos da pesquisa.

#### 4.5.1.7 Controle dos riscos

Considerando a variabilidade da pele humana, e a possibilidade da ocorrência de casos de irritação cutânea, o Ambulatório de Dermatologia do HFA foi envolvido no estudo para receber os participantes que apresentassem queixas e sinais de irritações cutâneas. Quando necessário, o participante seria desligado da pesquisa. A Figura 29 ilustra o fluxograma do estudo piloto.



**Figura 29.** Fluxograma do estudo piloto.

#### *4.5.1.8 Análise estatística*

Com o objetivo de verificar a semelhança entre os grupos foi utilizado um teste não paramétrico chamado Teste Chi-Quadrado para cada uma das três variáveis (gênero, grau de condropatia e tipo de condropatia). Tal teste foi aplicado pelo fato de estar comparando dois grupos independentes dispostos em uma tabela de contingência. A análise utilizada para avaliar a idade dos pacientes foi outro teste não paramétrico chamado Mann-Whitney, uma vez que, não foi necessário inserir as informações na tabela de contingência, devido à variação nos valores dos dois grupos independentes. A análise dos valores da 1ª a 10ª sessão foi feita por um teste não paramétrico chamado Wilcoxon, uma vez que o objetivo era verificar se houve diferença significativa da 1ª para a 10ª sessão, portanto cada indivíduo é o seu próprio controle. Para análise dos valores da 1ª a 20ª sessão foi utilizado outro teste chamado de Friedman, uma vez que foram comparadas 3 sessões.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

Os primeiros experimentos foram realizados com os surfactantes Span 80 e butanol, com óleo de rícino e água destilada. Depois de preparadas 15 misturas, com diferentes composições (Tabela 14), elas foram agitadas em vórtex por 30 segundos e reservadas por 24 horas.

**Tabela 14.** Produção do sistema com 15 diferentes composições, utilizando Span 80 e butanol (surfactantes), óleo de rícino e água Destilada.

Teste	Span 80 e Butanol 2/1 (m/m)	Óleo de Rícino	Água destilada
1 <sup>a</sup>	1,75 g	0,25 g	0,25 g
1b	1,75 g	0,25 g	0,50 g
1c	1,75 g	0,25 g	1,0 g
2 <sup>a</sup>	1,50 g	0,50 g	0,25 g
2b	1,50 g	0,50 g	0,50 g
2c	1,50 g	0,50 g	1,0 g
3 <sup>a</sup>	1,0 g	1,0 g	0,25 g
3b	1,0 g	1,0 g	0,50 g
3c	1,0 g	1,0 g	1,0 g
4 <sup>a</sup>	0,50 g	1,50 g	0,25 g
4b	0,50 g	1,50 g	0,50 g
4c	0,50 g	1,50 g	1,0 g
5 <sup>a</sup>	0,25 g	1,75 g	0,25 g
5b	0,25 g	1,75 g	0,50 g
5c	0,25 g	1,75 g	1,0 g

Após avaliar os resultados dos primeiros experimentos foi concluído que nenhuma das misturas formou um sistema transparente. Em seguida, foi iniciado novo experimento, com 10 diferentes misturas, mantendo as fases oleosa e aquosa (óleo de rícino e água destilada) e alterando os surfactantes (Tabelas 15 e 16). As 10 misturas também foram agitadas em vórtex por 30 segundos e reservadas por 24 horas. Após analisá-las foi possível concluir que mesmo ainda não ter sido formado um sistema transparente, a combinação de Tween 80 e Transcutol<sup>®</sup> oferecia melhores resultados. Dessa forma foi decidido manter essa combinação de

surfactantes e alterar a fase oleosa nos próximos experimentos. O Octildodecanol foi o óleo escolhido para os próximos testes com 5 diferentes concentrações (Tabela 17).

**Tabela 15.** Produção do sistema com 5 diferentes composições, utilizando Tween 80 e butanol (surfactantes), óleo de rícino e água destilada.

Teste	Tween 80 e Butanol 2/1 (m/m)	Óleo de Rícino	Água destilada
1	1,75 g	0,25 g	0,50 g
2	1,50 g	0,50 g	0,50 g
3	1,0 g	1,0 g	0,50 g
4	0,50 g	1,50 g	0,50 g
5	0,25 g	1,75 g	0,50 g

**Tabela 16.** Produção do sistema com 5 diferentes composições, utilizando Tween 80 e Transcutol® (surfactantes), óleo de rícino e água destilada.

Teste	Tween 80 e Transcutol® 2/1 (m/m)	Óleo de Rícino	Água destilada
1	1,75 g	0,25 g	0,50 g
2	1,50 g	0,50 g	0,50 g
3	1,0 g	1,0 g	0,50 g
4	0,50 g	1,50 g	0,50 g
5	0,25 g	1,75 g	0,50 g

**Tabela 17.** Produção do sistema com 5 diferentes composições, utilizando Tween 80 e Transcutol® (surfactantes), octildodecanol e água destilada.

Teste	Tween 80 e Transcutol® 2/1 (m/m)	Octildodecanol	Água destilada
1	1,75 g	0,25 g	0,50 g
2	1,50 g	0,50 g	0,50 g
3	1,0 g	1,0 g	0,50 g
4	0,50 g	1,50 g	0,50 g
5	0,25 g	1,75 g	0,50 g

Comparando as misturas, foi possível concluir a possibilidade de obter melhores resultados com a substituição do óleo de rícino pelo octildodecanol. Foi decidido fazer novas três misturas com as seguintes características: a) a mistura



surfactante e co-surfactante na proporção de 3/1 (e não 2/1 como usado anteriormente). O Span 80 foi utilizado em maior concentração devido à sua menor afinidade com a água, em relação ao Tween 80; b) a fase aquosa seria uma mistura de água destilada e Transcutol® na proporção de 1/3 (m/m) e não somente água destilada como usado nos testes anteriores; c) também foi testado o triacilglicerol cáprico/caprílico (TCC) como componente da fase oleosa (Tabela 18).

**Tabela 18.** Produção do sistema com 3 diferentes fases oleosas. A: octildodecanol; B: TCC; e C: óleo de rícino.

Mistura A	Mistura B	Mistura C
Octildodecanol 38%	TCC 38%	Óleo de Rícino 38%
Água + Transcutol® (1/3) 15%	Água + Transcutol® (1/3) 15%	Água + Transcutol® (1/3) 15%
SPan 80 + Tween 80 (3/1) 47%	SPan 80 + Tween 80 (3/1) 47%	SPan 80 + Tween 80 (3/1) 47%

No preparo da mistura de surfactantes ( $S_{mis}$ ) utilizou-se Span 80 (12,75 g) e Tween 80 (4,25 g). O total de  $S_{mis}$  foi de 17 g (4,7 g foram utilizados em cada mistura). A  $S_{mis}$  recebeu 5 minutos de agitação magnética e aquecimento de 100 graus. No preparo da mistura da fase aquosa ( $A_{mis}$ ) foi utilizado 1,75 g de água e 5,25 g de Transcutol®. O total de  $A_{mis}$  foi de 7 g (1,5 g foram utilizados em cada mistura). Ao misturar a fase oleosa com a  $S_{mis}$  ( $SO_{mis}$ ), utilizou-se 4,7 g de  $S_{mis}$  e 3,8 g de óleo. As misturas foram agitadas em vórtex por 30 segundos e reservadas por 24 horas. Após análise das três misturas foi verificado que a Mistura B (TCC,  $A_{mis}$ ,  $S_{mis}$  38%:15%:47%) mostrou melhores resultados, tendo um aspecto transparente, no entanto, após 24 horas apresentou separação em duas fases.

Após essas tentativas optou-se por testar o Óleo de Rícino ao Surfactante Cremophor ELP e Água Ultrapura, os quais acabaram formando um sistema transparente e estável, numa observação macroscópica após 48 horas, que manteve-se após adição dos fármacos (Figura 30). Dessa forma, o sistema de nanoemulsão escolhido para caracterização físico-química foi formado por Cremophor ELP, Óleo de Rícino, Água Ultrapura e 5 gramas de cada fármaco. A Tabela 19 cita os reagentes da nanoemulsão e suas concentrações.

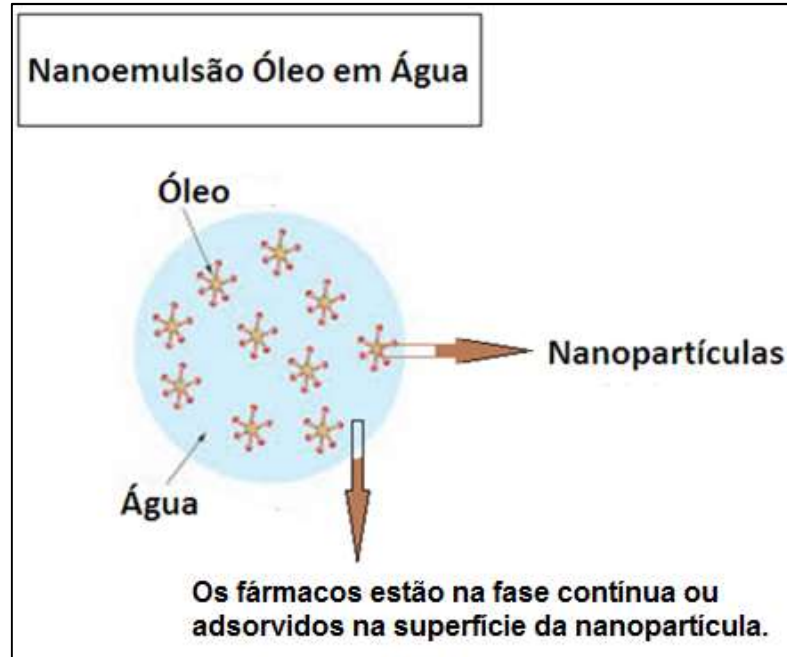


**Figura 30.** Visualização macroscópica da Nanoemulsão de GS e CS, após 48 horas de formulação.

**Tabela 19.** Componentes da formulação.

Reagentes		Quantidade	%
Sulfato de Glucosamina	Fármaco 1	5 g (50 mg/ml)	5
Sulfato de Condroitina	Fármaco 2	5 g (50 mg/ml)	5
Cremophor ELP	Surfactante	9 g (90 mg/ml)	9
Óleo de Rícino	Fase oleosa	3 g (30 mg/ml)	3
Água ultrapura	Fase aquosa	80 ml	78

Os fármacos em estudo são extremamente hidrofílicos, dessa forma, houve a necessidade de aumentar a concentração de água para diluição dos mesmos. Nesse sentido, a adição de água interrompeu a organização dos sistemas W/O e melhorou a organização dos sistemas O/A. Dessa forma, foi desenvolvido um sistema O/A para entrega transdérmica de GS e CS. Como os fármacos são hidrofílicos, os mesmos foram incorporados na fase contínua do sistema. A Figura 31 ilustra a representação da nanoemulsão em estudo.



**Figura 31.** Representação da Nanoemulsão de GS e CS. Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

### 5.2.1 Análise das propriedades coloidais

O Diâmetro Hidrodinâmico (DH), o Índice de Polidispersão (PDI) e o Potencial zeta (Pz) são geralmente os parâmetros físico-químicos utilizados para monitorar a estabilidade das nanoemulsões. Esses parâmetros estão apresentados na Tabela 20, tanto da nanoemulsão carregada, quanto da nanoemulsão livre de fármaco, de amostras frescas.

**Tabela 20.** O Diâmetro Hidrodinâmico (DH), o Índice de Polidispersão (PDI) e o Potencial Zeta (Pz) da Nanoemulsão com os fármacos e do branco.

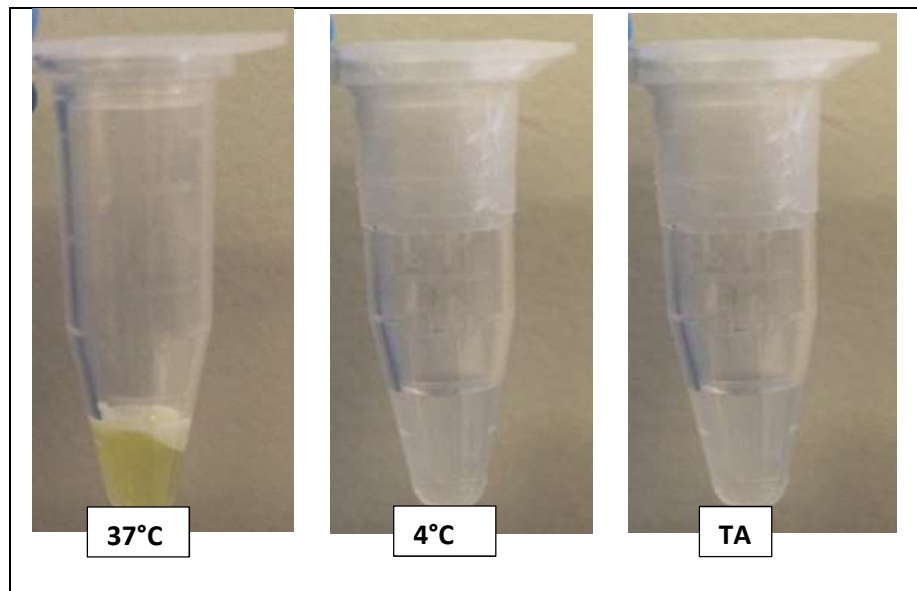
Formulação	DH (nm)	PDI	Pz (mV)
Nanoemulsão GS e CS	29,3± 0,6	0,11± 0,01	- 2.44 ± 1,5
Nanoemulsão Branco	23,3 ± 0.14	0,07 ± 0,07	- 1.2 ± 0,02

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média.

### 5.2.2 Avaliação da estabilidade da formulação

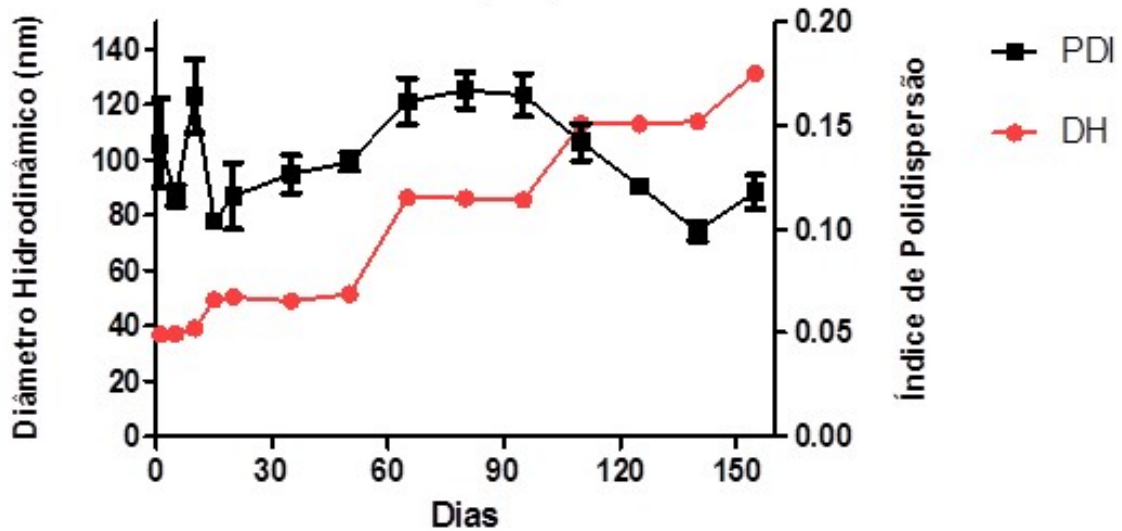
A avaliação dos parâmetros físico-químicos, com diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância para controle da estabilidade do sistema. Nesse sentido, a Nanoemulsão de GS e CS foi avaliada sob 3 diferentes condições de temperatura e sob centrifugação, durante o período de 150 dias.

As amostras de Nanoemulsão de GS e CS mantidas em temperatura ambiente e a 4°C não apresentaram separação de fases após a centrifugação e mantiveram-se dispersas durante os 150 dias de análises. Entretanto, foi observada a formação de deposições superficiais na formulação mantida a 37°C. A Figura 32 ilustra amostras submetidas a diferentes condições de armazenamento e centrifugação no 1º dia de análise.



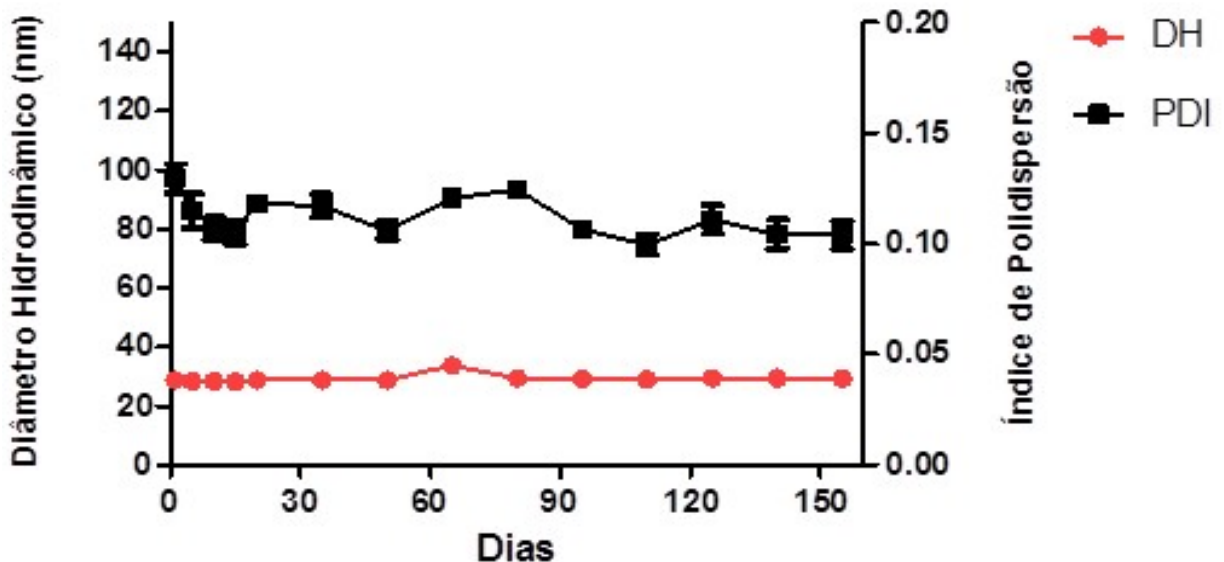
**Figura 32.** Amostras de Nanoemulsão de GS e CS submetidas à centrifugação após 24 horas de armazenagem em distintas condições de temperatura.

A Figura 33 ilustra os resultados do DH e do PDI da formulação mantida a 37 °C por 150 dias. A amostra de Nanoemulsão de GS e CS submetida a 37 °C apresentou DH de  $37,0 \pm 0,9$  nm no início da medição e DH de  $130,4 \pm 0,7$  nm após 150 dias de armazenagem. Durante esse período de estocagem a formulação apresentou aumento gradativo no DH ao longo do tempo. O PDI, na condição de 37 °C, apresentou oscilações variando entre 0,09 a 0,16.



**Figura 33.** Resultados do DH e do PDI da amostra de Nanoemulsão de GS e CS mantida a 37 °C por 150 dias.

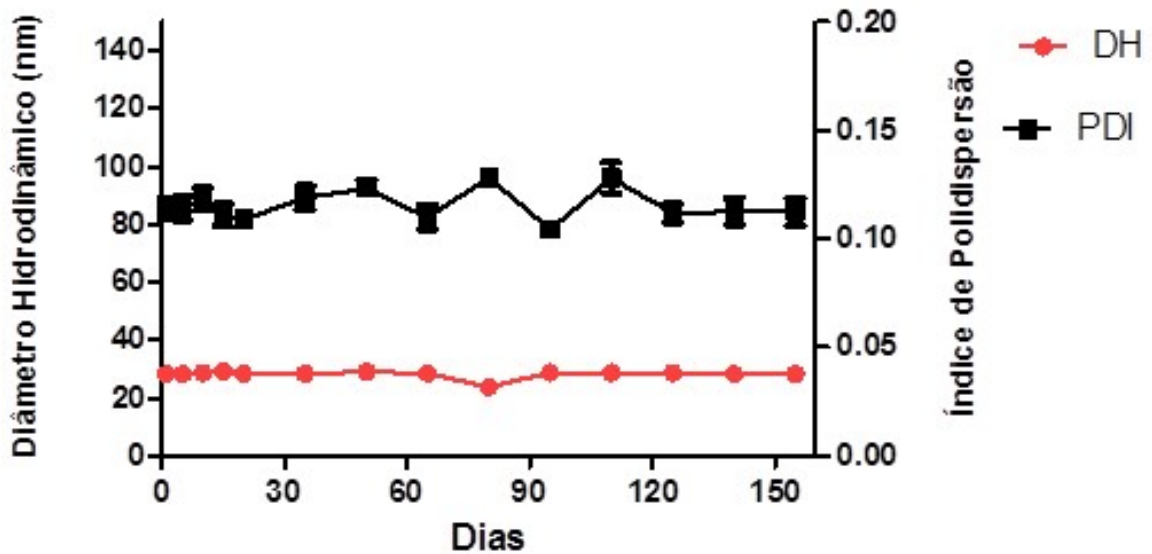
A amostra de Nanoemulsão de GS e CS armazenada sob temperatura ambiente ( $T_A = 25\text{ °C}$ ) se mostrou estável, sendo que o DH variou de  $28,56 \pm 0,13$  nm a  $29,43 \pm 0,07$  entre o primeiro e último dia de análise. O PDI se manteve abaixo de 0,2 durante todo o tempo de análise. A Figura 34 ilustra os resultados do DH e do PDI da formulação mantida em TA por 150 dias.



**Figura 34.** Resultados do DH e do PDI da amostra de Nanoemulsão de GS e CS mantida em TA por 150 dias.

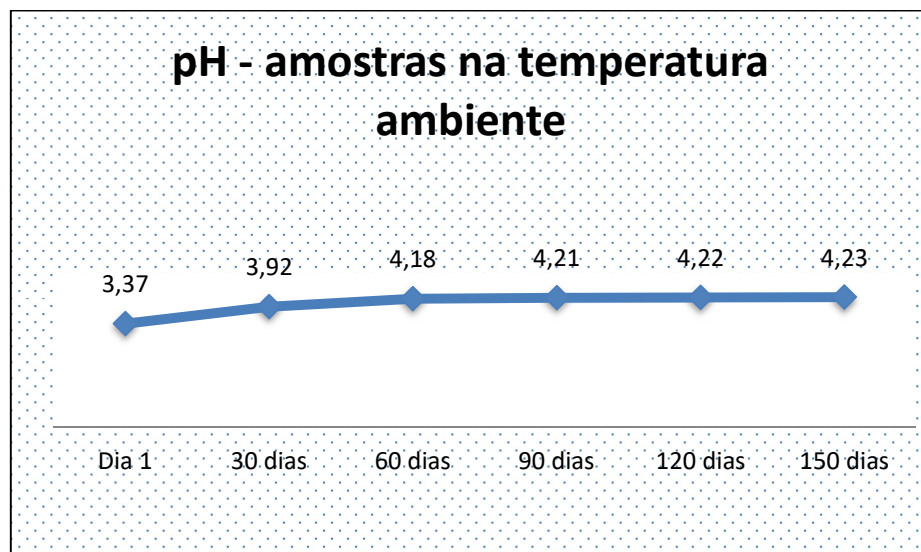
A Figura 35 ilustra os resultados do DH e do PDI da formulação mantida a 4°C por 150 dias. A amostra de Nanoemulsão de GS e CS armazenada a 4°C também se mostrou estável, sendo que o DH variou entre  $28,28 \pm 0,07$  e  $28,35 \pm$

0,14 do primeiro ao último dia de análise. O PDI também se manteve abaixo de 0,2 durante todo o tempo de avaliação.



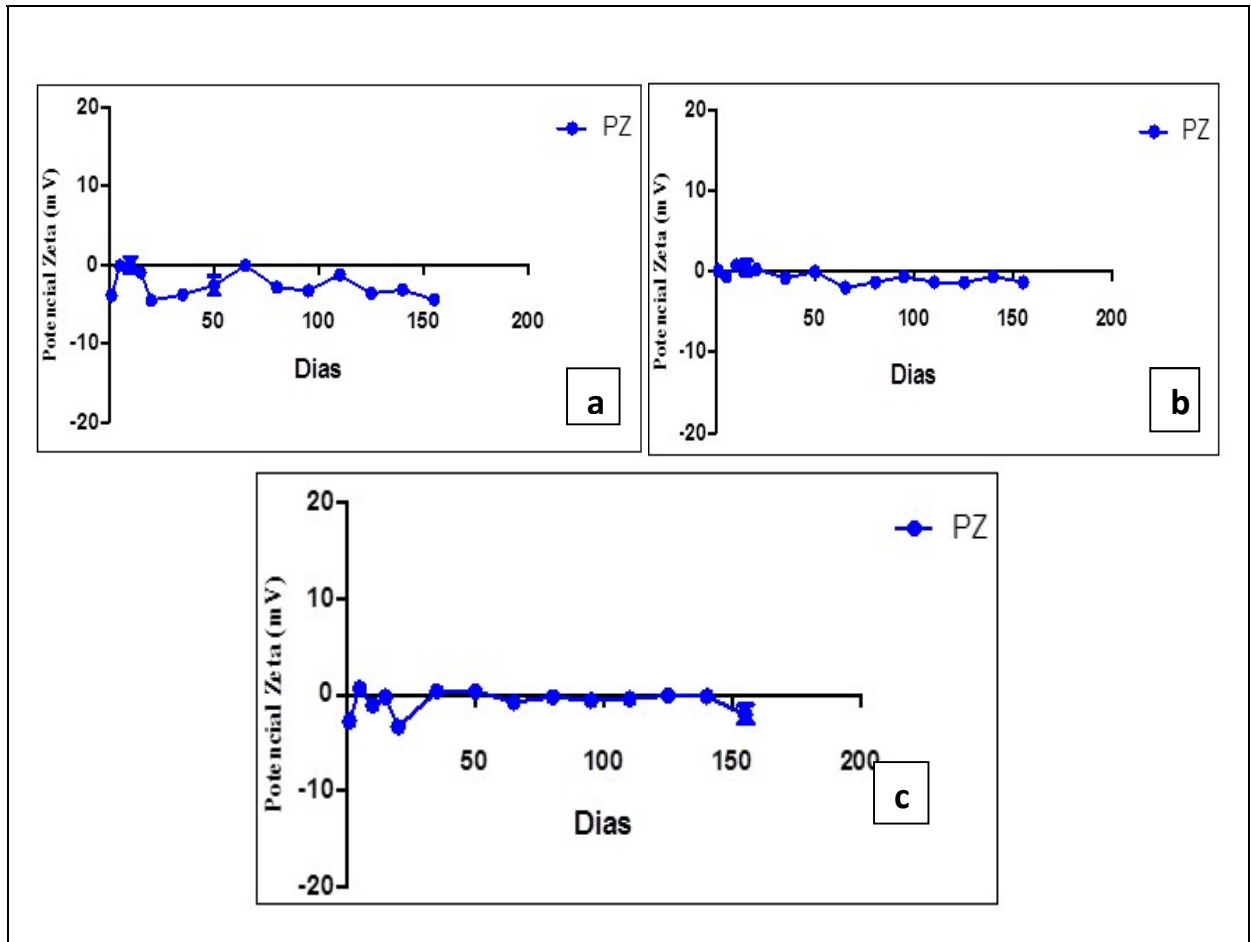
**Figura 35.** Resultados do DH e do PDI da amostra de Nanoemulsão de GS e CS mantida a 4 °C por 150 dias.

Em relação às medidas do pH, a Figura 36 ilustra que houve um ligeiro aumento do pH da nanoemulsão armazenada em temperatura ambiente por 5 meses. O aumento foi mais significativo nos primeiros 30 dias; depois disso, até o final do 5º mês, o valor de pH estabilizou-se.



**Figura 36.** Mudanças do pH da Nanoemulsão de GS e CS, durante 150 dias, mantidas na temperatura ambiente.

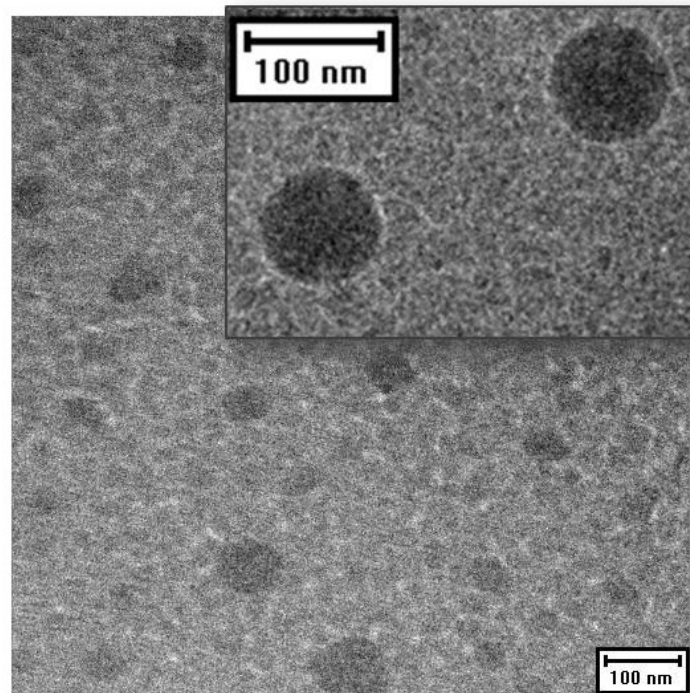
Em relação à análise do Potencial zeta, foi observado que a nanoemulsão armazenada em TA apresentou Pz negativo em todas as medições, tendo seus valores mantidos entre  $-0,02 \pm 0,9$  mV e  $-4,49 \pm$  mV (Figura 37a). Na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  o Pz esteve entre  $-0,06 \pm 0,19$  e  $-1,38 \pm 0,14$  mV (Figura 37b). Na condição de armazenamento a  $37^{\circ}\text{C}$ , o Pz variou entre  $-0,22 \pm 0,5$  mV e  $-3,33 \pm 0,2$  mV (Figura 37c).



**Figura 37a.** Resultados do Pz. a: Pz da formulação mantida em TA; **Figura 37b:** Pz da formulação mantida à  $4^{\circ}\text{C}$  e **Figura 37c:** Pz da formulação mantida à  $37^{\circ}\text{C}$ . Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.2.3 Análise da morfologia – Cryo-TEM

Os resultados da Cryo-Tem evidenciaram o formato esférico das nanopartículas, e por meio da barra de escala, foi possível verificar que as nanopartículas apresentaram diâmetros variados, porém, menores do que 100 nm. A Figura 38 mostra a imagem Cryo-Tem da nanoemulsão de GS e CS.



**Figura 38.** Cryo-Tem de nanopartículas de Óleo de Rícino em Nanoemulsão de GS e CS. Observa-se o formato esférico e nanopartículas menores que 100 nm. Barra de escala de 100 nm.

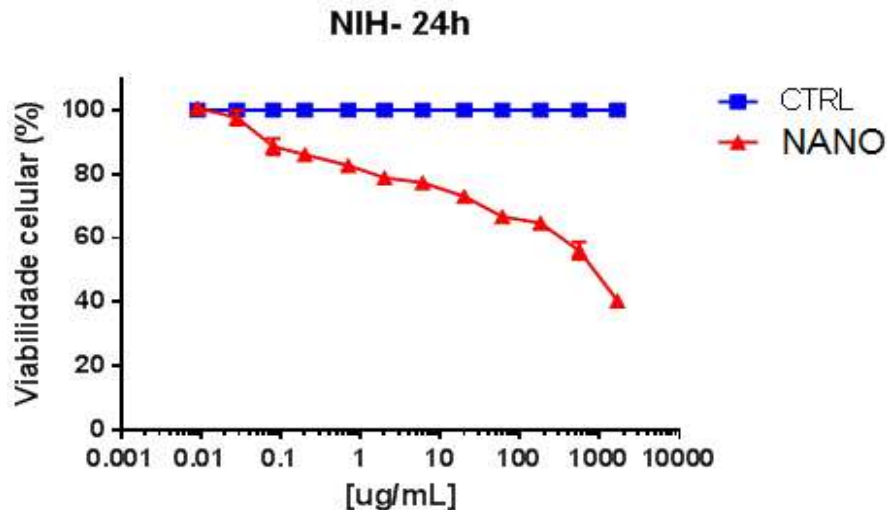
### 5.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO*

#### 5.3.1 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

Linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. Os ensaios de citotoxicidade avaliam a interferência induzida por agentes químicos (surfactante, óleo e fármaco) e pelo pH nos processos metabólicos celulares (crescimento, multiplicação e morte celular). O efeito citotóxico da Nanoemulsão de GS e CS na linhagem NIH-3T3, por um período de 24 horas, foi determinado utilizando o ensaio MTT. O resultado foi representado como porcentagem de viabilidade celular, em comparação com controle mantido em meio de cultivo.

O sistema em estudo não apresentou citotoxicidade *in vitro*. O  $IC_{50}$  ocorreu em concentrações extremamente altas da Nanoemulsão (869,2  $\mu\text{g/mL}$ ), conforme mostra a Figura 39. O  $IC_{50}$  é um índice que indica a quantidade da substância capaz de inibir o processo biológico da linhagem celular em 50% ou mais. Esse índice é o máximo de inviabilidade celular aceitável pela ISO 10993-5/1999 e é considerado como corte padrão nas pesquisas (Willians, 2008; Tang *et al.*, 2007).

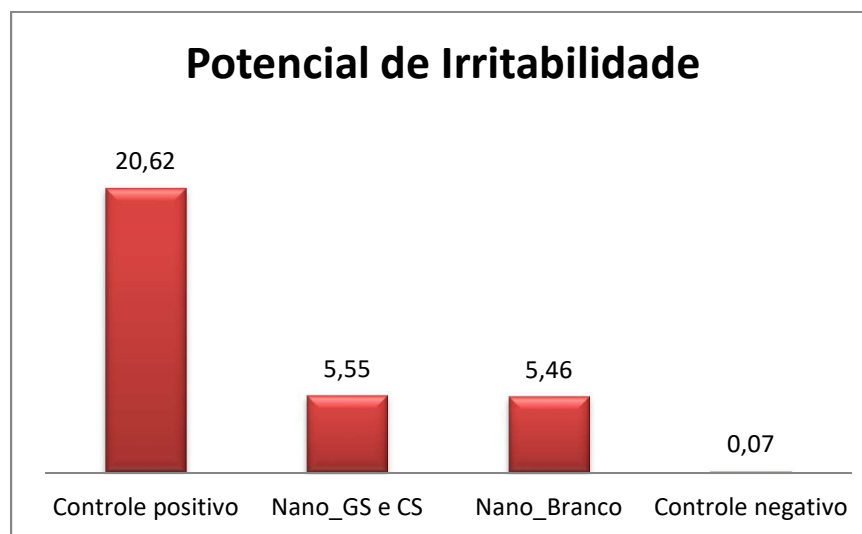




**Figura 39.** Viabilidade de células NIH-3T3 após exposição à Nanoemulsão de GS e CS e meio de cultivo (Controle) por 24 horas. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.  $a = p < 0,05$ .

### 5.3.2 Avaliação do potencial irritativo pelo método HET\_CAM

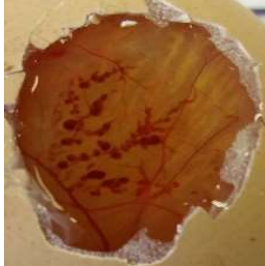
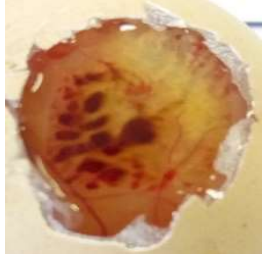
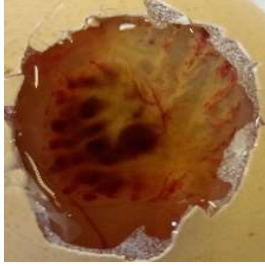

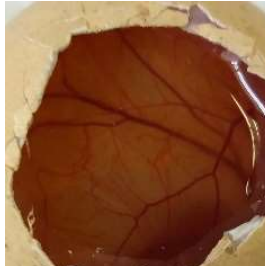







No teste HET-CAM, as amostras de Nano-Branco (sem fármacos) e Nanoemulsão de GS e CS apresentaram índice de irritabilidade de 5,46 e 5,55, respectivamente. Portanto, não houve variação significativa entre elas. O patamar numérico desses 2 índices indicam que os sistemas têm potencial moderado de irritabilidade, porém estão classificados como limites inferiores. Os produtos considerados irritantes leves vão até o índice-limite de 4,9. Os produtos de potencial severo de irritação estão acima de 9,0. É possível observar que os valores das nanoemulsões estão bem inferiores em comparação ao controle positivo (Figura 40).



**Figura 40.** Potenciais de irritabilidade dos controles e das nanoemulsões. Controle positivo (NaOH a 0,1 M); e Controle negativo (Soro Fisiológico a 9%).

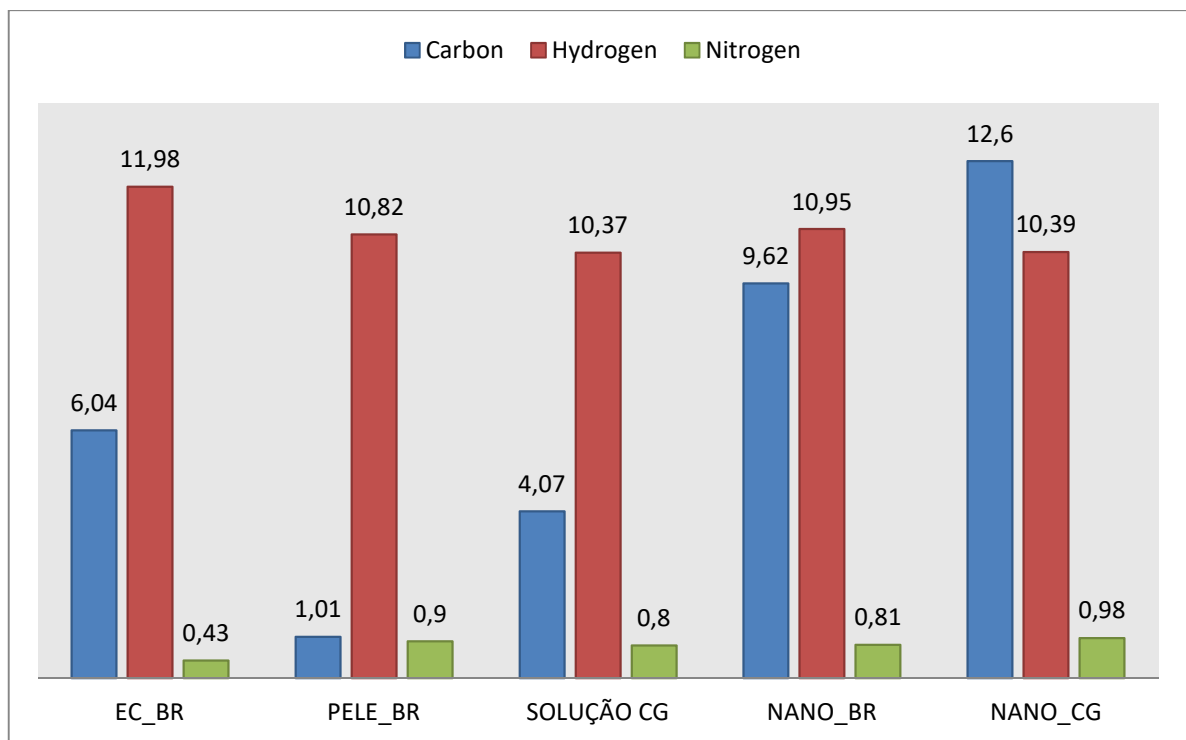
Como pode ser observado na Tabela 21, o controle positivo apresentou hemorragia e lise. O controle negativo não desencadeou nenhum processo de alteração vascular. As nanoemulsões testadas ficaram mais próximas do controle negativo, ou seja, elas não apresentaram eventos como a lise ou coagulação. Pode-se perceber nas imagens que a Nano-branco, a Nano-fármaco e o Controle negativo são visualmente muito parecidos.

**Tabela 21.** Imagens da CAM durante o teste de irritabilidade. Resultados observados em 20 segundos, 2 minutos e 5 minutos.

AMOSTRAS	20 SEG	2 MIN	5 MIN
<b>CONTROLE POSITIVO</b> NaOH a 0,1 M			
<b>NANO SEM FÁRMACOS</b>			
<b>NANO COM FÁRMACOS</b>			
<b>CONTROLE NEGATIVO</b> Soro Fisiológico a 9%			

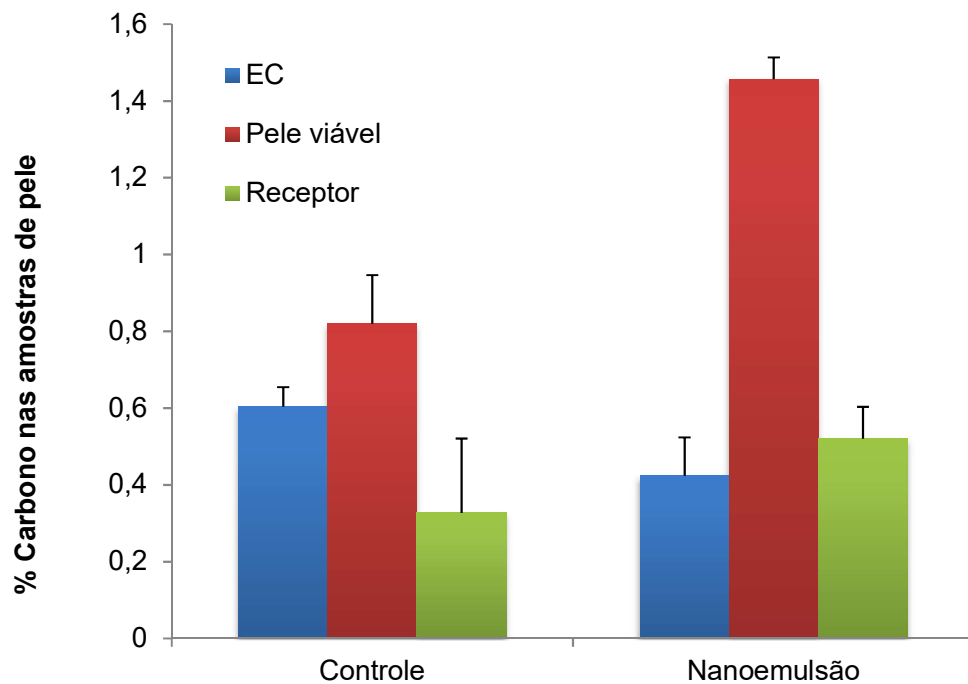
### 5.3.3 Avaliação da permeação cutânea *in vitro*

Comparando os resultados das amostras avaliadas em CHN antes de serem submetidas ao teste de permeação (Figura 41) foi possível verificar que não houve diferença, entre as amostras, dos valores quantificados de nitrogênio e hidrogênio. Porém, houve diferença na quantificação de carbono, dessa forma, a continuidade das análises teve o foco nas concentrações de carbono. Também foi possível observar nessa figura que a Nanoemulsão de GS e CS apresentou maior concentração de carbono em relação aos seus brancos (Estrato Córneo, Pele Viável, Solução GS/CS e Nano-Branco) e essa diferença representa justamente a presença dos fármacos.



**Figura 41.** Concentrações (%) Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio em amostras (2,5 mg) analisadas antes de serem submetidas ao teste de permeação.

Observando os valores quantificados de carbono, foi possível verificar que houve maior permeação quando utilizado a Nanoemulsão de GS e CS (Figura 42). Quando testado a Nanoemulsão, a retenção de carbono no estrato córneo (EC) foi 30% menor e na pele viável foi 78% maior em relação a formulação controle. A quantidade de carbono recuperada na solução receptora foi 62,5% maior quando testado a Nanoemulsão. A técnica conseguiu mostrar qualitativamente o efeito positivo da formulação proposta, no aumento da permeação através da pele.



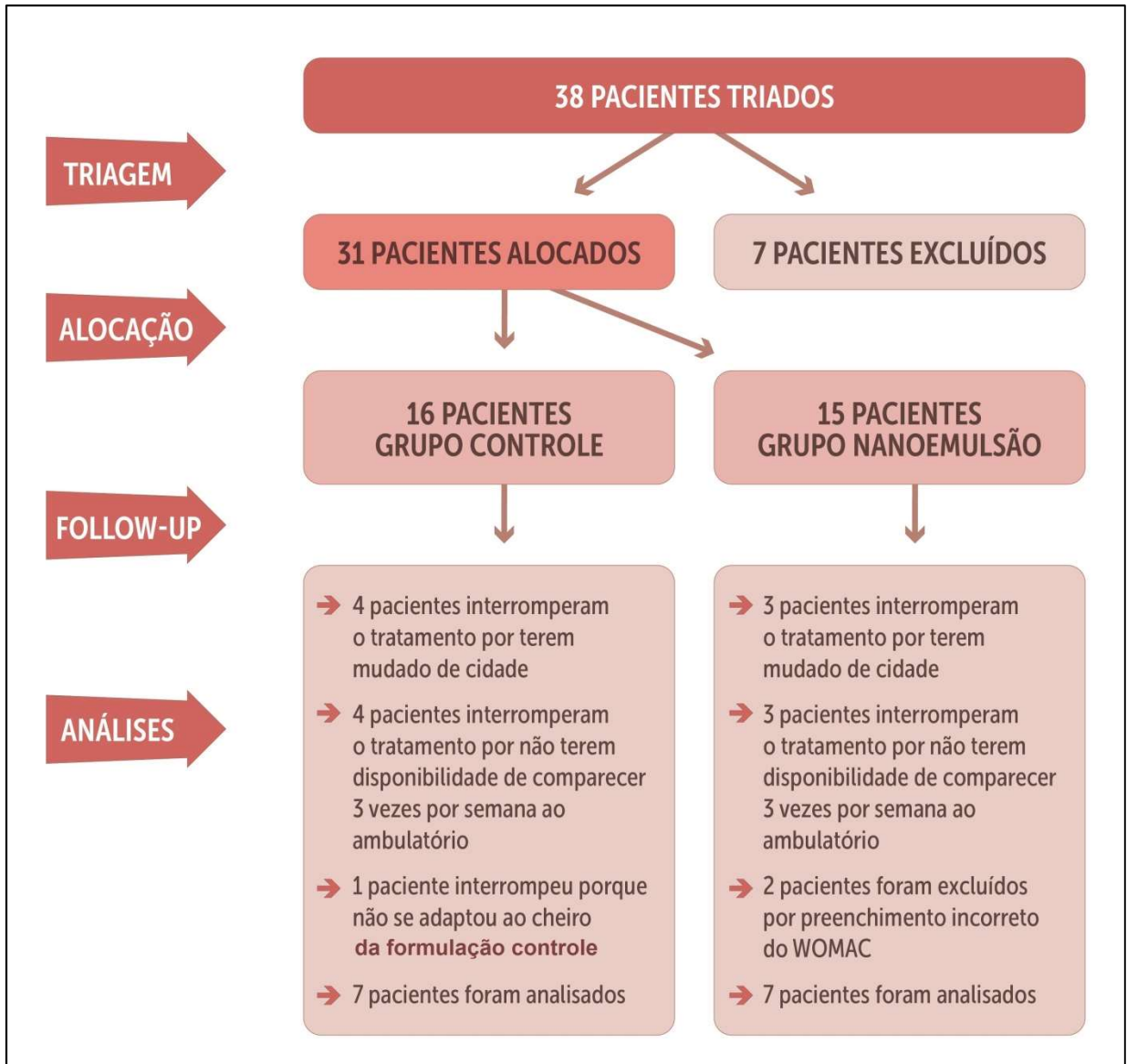
**Figura 42.** Resultados comparativos da quantificação de carbono na Análise CHN, após teste de permeação *in vitro*. Controle (Solução de Glucosamina e Condroitina) e Nanoemulsão de Glucosamina e Condroitina.

## 5.4 ESTUDO PILOTO

### 5.4.1 Triagem, alocação e baixas de participantes

Durante o período de triagem, 38 pacientes foram avaliados quanto à elegibilidade, entre o período de 15 de setembro de 2017 e 15 de janeiro de 2018. Em relação às baixas de participantes, 2 pacientes não aceitaram assinar o TCLE, 3 participantes foram excluídos por estarem usando GS e CS via oral e 2 pacientes também foram excluídos por apresentarem lesão de menisco e ligamentos associada à condropatia.

Dessa forma, durante a triagem, o total de 7 pacientes foi excluído da pesquisa. Durante os 2 meses de alocação, 31 participantes foram randomizados, sendo 16 deles alocados no grupo “Controle” e 15 alocados no grupo “Nanoemulsão”. Dos 31 pacientes randomizados, 17 deles não completaram a primeira fase de tratamento (primeiras 10 sessões). Os motivos das baixas estão descritos na Figura 43.



**Figura 43.** Fluxograma da triagem, alocação e análises dos participantes.

#### 6.4.2 Características gerais dos grupos e segurança da formulação

Com o objetivo de verificar a semelhança entre os participantes dos grupos foi utilizado um teste não paramétrico chamado Teste Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ) para cada uma das 3 variáveis inseridas na Tabela 22. Mesmo com a alocação aleatória dos participantes do estudo, houve equilíbrio das características, como: sexo, idade, grau de lesão e tipo de lesão entre os grupos “Controle” e “Nanoemulsão”. Quando o valor de  $\chi^2$  for menor que 3,841, admite-se que o desvio não foi significativo, dessa forma, os grupos apresentaram características semelhantes nas três variáveis acima. Ainda, quando o p-value for superior a 0,05 (nível de significância), também

admite-se a mesma hipótese de que os grupos apresentaram características semelhantes.

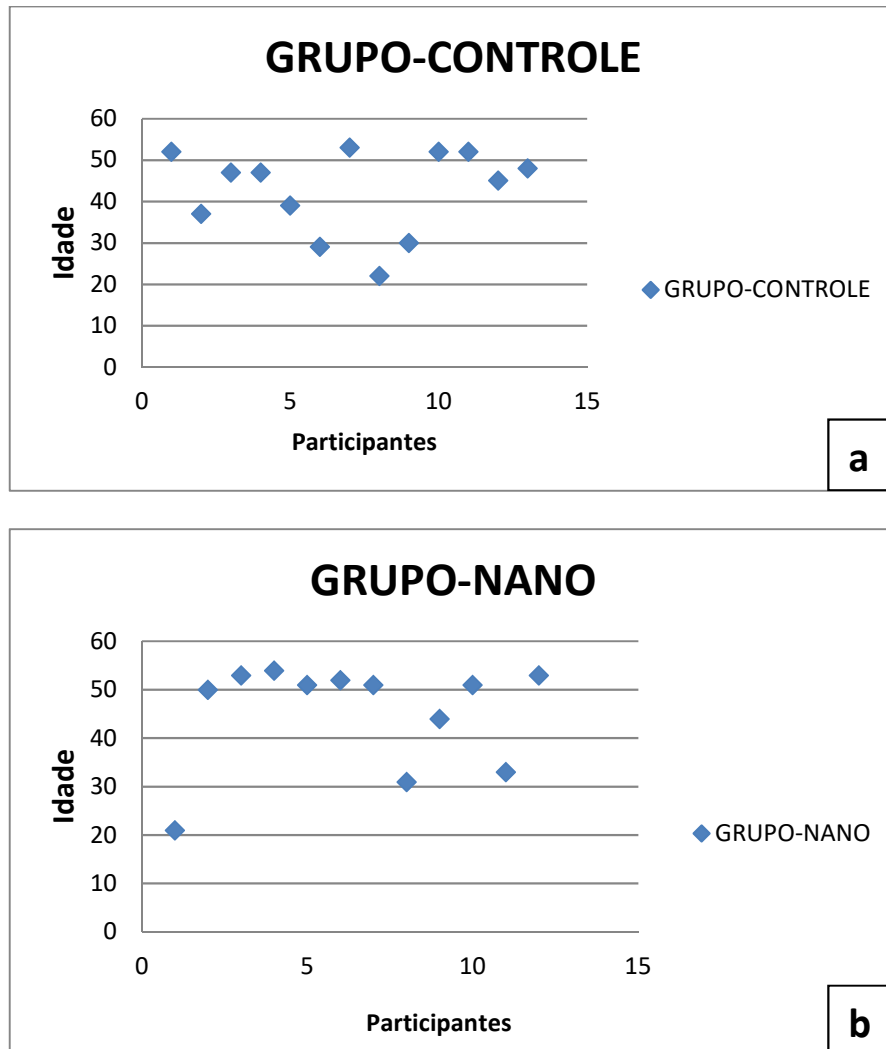
**Tabela 22.** Características gerais dos grupos e nível de significância para suas semelhanças.

VARIÁVEL	GRUPO		Total	$\chi^2$	p-value	
	CONTROLE	NANO				
SEXO	FEMININO	7	6	13	0,037	<b>0,848</b>
	MASCULINO	6	6			
	<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>12</b>			
GRAU DE LESÃO	I	6	5	11	0,363	<b>0,834</b>
	II	5	4			
	III	2	3			
	<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>12</b>			
TIPO DE CONTRAPATIA	FEMORAL	5	3	8	0,52	<b>0,471</b>
	PATELAR	8	9			
	<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>12</b>			

Ao comparar as idades dos pacientes dos 2 grupos, utilizando o teste Mann-Whitney, o p-value obtido foi de 0,339. Mais uma vez superior a 0,05 e, portanto, aceita-se também a hipótese de que os grupos apresentaram semelhança, agora no que diz respeito às idades (Figura 44a e 44b). A idade média dos dois grupos foi de 43 anos.

Nenhum dos participantes, durante todo o período da intervenção, relatou sinais ou sintomas no que diz respeito às reações tóxicas. Nenhum paciente necessitou ser encaminhado para o serviço de dermatologia para controle de

irritações cutâneas. Esse resultado, associado aos resultados pré-clínicos, mostrou que a formulação é segura em curto e médio prazo.



**Figura 44a.** Dispersão das idades dos participantes do Grupo-Controle (20 aos 55 anos).  
**Figura 44b.** Dispersão das idades dos participantes do Grupo-Nano (20 aos 55 anos).

### 5.4.3 Avaliação da Dor, da Rigidez Articular e da Funcionalidade

A VAS, considerada um instrumento unidimensional, pois avalia a dor em apenas uma dimensão (nesse caso avalia apenas a intensidade do sintoma), foi utilizada para avaliar o grau de dor durante o tratamento proposto em ambos os grupos. O WOMAC é um instrumento considerado multidimensional. Ele avalia a dor em mais de uma dimensão, como, intensidade da dor, seu impacto nas atividades do dia a dia e na qualidade de vida. As Tabelas 23 e 24 mostram os resultados dos 2 grupos, entre as 3 primeiras avaliações, em relação à VAS e WOMAC.

No estudo estatístico foram considerados como resultados significativos os valores menores ou iguais a 0,05. O que significa que, quanto menor for o valor de p, mais distante os dados do estudo, estarão da possibilidade representada pela hipótese nula. A hipótese nula é representada pela ausência de diferença significativa entre os dois grupos de tratamento no que diz respeito a melhora da dor, da rigidez e da funcionalidade.

**Tabela 23.** Médias obtidas pelos grupos para cada variável (grupo e sessão). Valores dos participantes que completaram as primeiras 10 sessões. Coluna “1ª SESSÃO” representa os resultados da avaliação inicial (pré-tratamento).

VARIÁVEL	GRUPO	1ª SESSÃO	10ª SESSÃO
VAS	CONTROLE	4,54	3,37
	NANO	5,60	3,99
WOMAC DOR	CONTROLE	33,57	23,57
	NANO	37,14	28,57
WOMAC RIGIDEZ	CONTROLE	30,36	37,50
	NANO	46,50	35,00
WOMAC FUNCIONALIDADE	CONTROLE	35,92	19,53
	NANO	40,33	23,84
WOMAC TOTAL	CONTROLE	34,31	21,87
	NANO	39,02	25,44

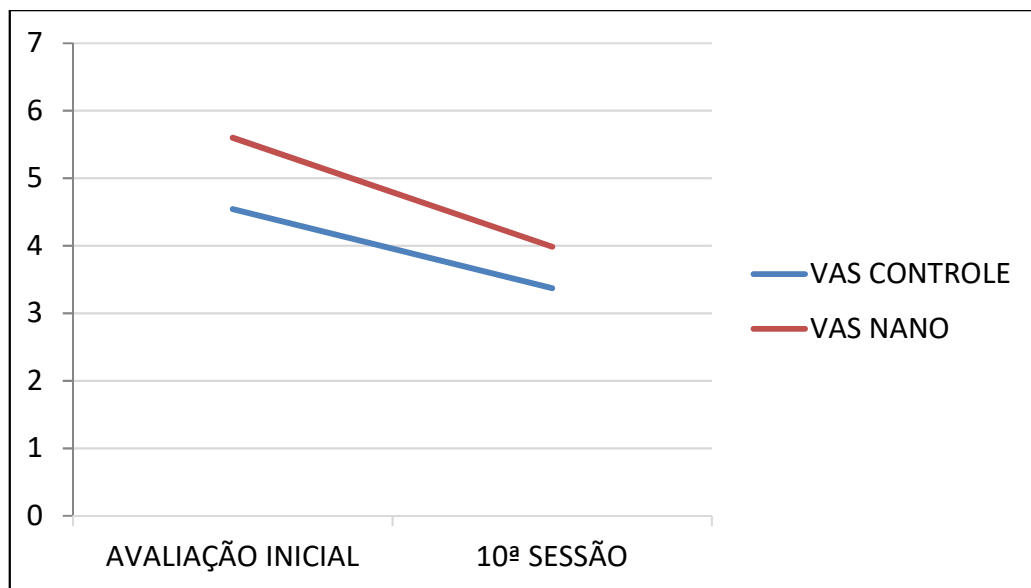
**Tabela 24.** Médias obtidas pelos grupos para cada variável (grupo e sessão). Valores dos participantes que completaram as primeiras 20 sessões. Coluna “1ª SESSÃO” representa os resultados da avaliação inicial (pré-tratamento).

VARIÁVEL	GRUPO	1ª SESSÃO	10ª SESSÃO	20ª SESSÃO
VAS	CONTROLE	4,60	3,93	3,00
	NANO	6,47	3,57	2,00
WOMAC DOR	CONTROLE	33,33	25,00	15,00
	NANO	38,33	30,00	15,00
WOMAC RIGIDEZ	CONTROLE	17,64	9,80	8,09
	NANO	32,35	16,90	19,12
WOMAC FUNCIONALIDADE	CONTROLE	29,41	22,05	8,33
	NANO	43,62	25,49	16,17
WOMAC TOTAL	CONTROLE	28,68	23,95	9,47
	NANO	43,75	27,08	17,01



#### 5.4.3.1 Avaliação da Dor (VAS e WOMAC)

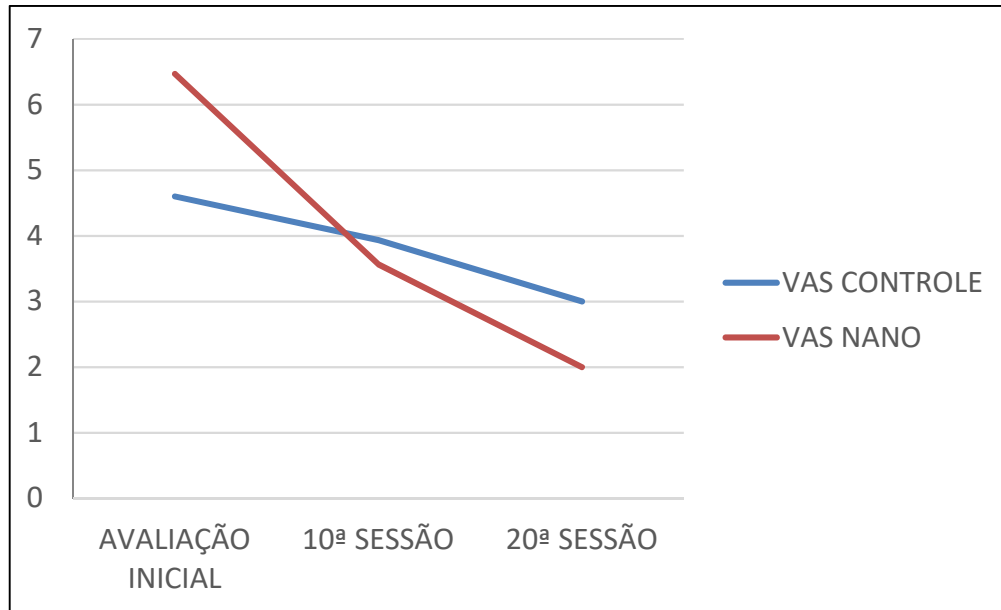
Nos resultados da VAS, nas primeiras 10 sessões de tratamento (Figura 45), foi possível observar que houve diminuição significativa da dor para os 2 grupos, quando o p-value foi menor que 0,05 em ambos os grupos. Porém, não houve diferença significativa entre os 2 grupos, sendo o valor dessa significância  $p = 0,9657$ .



**Figura 45.** Dor avaliada por VAS nas primeiras 10 sessões. Grau de Dor de zero a 10 (Eixo X). Os 2 grupos com evolução significativa. Diferença entre os grupos:  $p = 0,9657$ .

Ao avaliar os resultados da VAS dos participantes que completaram 20 sessões (Figura 46), foi possível observar que o Grupo-Controle não apresentou evolução satisfatória da dor, sendo  $p = 0,497$ . Entretanto, o Grupo-Nano mostrou evolução satisfatória da dor, sendo  $p = 0,05$ . Não houve diferença significativa entre os 2 grupos, sendo  $p = 0,77$ .

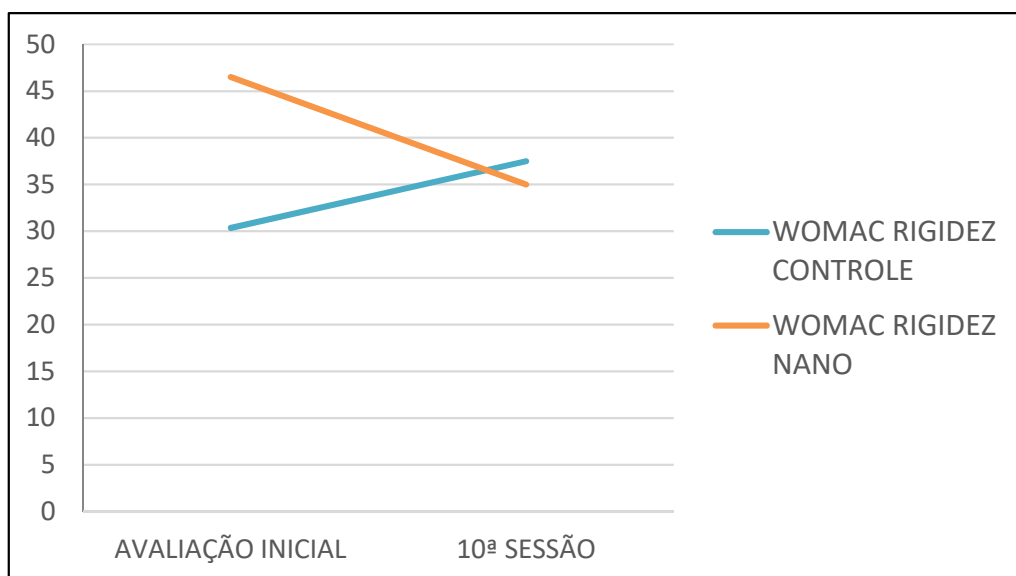
Utilizando o WOMAC para avaliação da dor, onde a intensidade da dor foi relatada ao caminhar, ao subir e descer escadas, ao sentar-se e deitar-se, ao ficar de pé e ao ficar deitado durante a noite, foi possível observar que tanto nas primeiras 10 sessões, como após 20 sessões, não houve evolução satisfatória da dor em nenhum dos 2 grupos e também não houve diferença significativa entre eles. Todos os p-value's foram superiores a 0,05.



**Figura 46.** Dor avaliada por VAS em 20 sessões. Grau de Dor de zero a 10 (Eixo X). Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os dois grupos:  $p = 0,77$ .

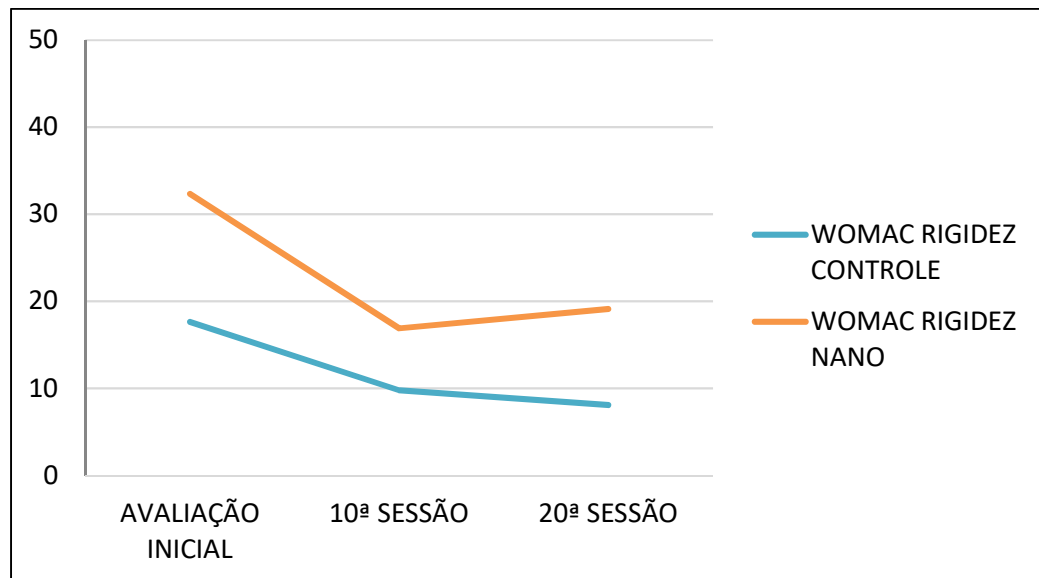
#### 5.4.3.2 Avaliação da Rigidez Articular (WOMAC)

Na análise de rigidez articular, por meio do WOMAC, foram colhidos os relatos de intensidade de rigidez logo após acordar de manhã, após sentar-se, deitar-se e repousar por tempo prolongado. Nas primeiras 10 sessões houve aumento do grau de rigidez no Grupo-Controle. Já no Grupo-Nano houve diminuição do grau de rigidez (Figura 47).



**Figura 47.** Rigidez avaliada pelo WOMAC nas primeiras 10 sessões. Grau de rigidez articular de zero a 50 (Eixo X). Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Grupo-Controle com regressão do quadro.

Ao avaliar a evolução do mesmo sintoma nos participantes que completaram 20 sessões foi possível observar que a rigidez articular teve diminuição significativa no Grupo-Nano, sendo  $p = 0,05$ , não acontecendo o mesmo com o Grupo-Controle (Figura 48).

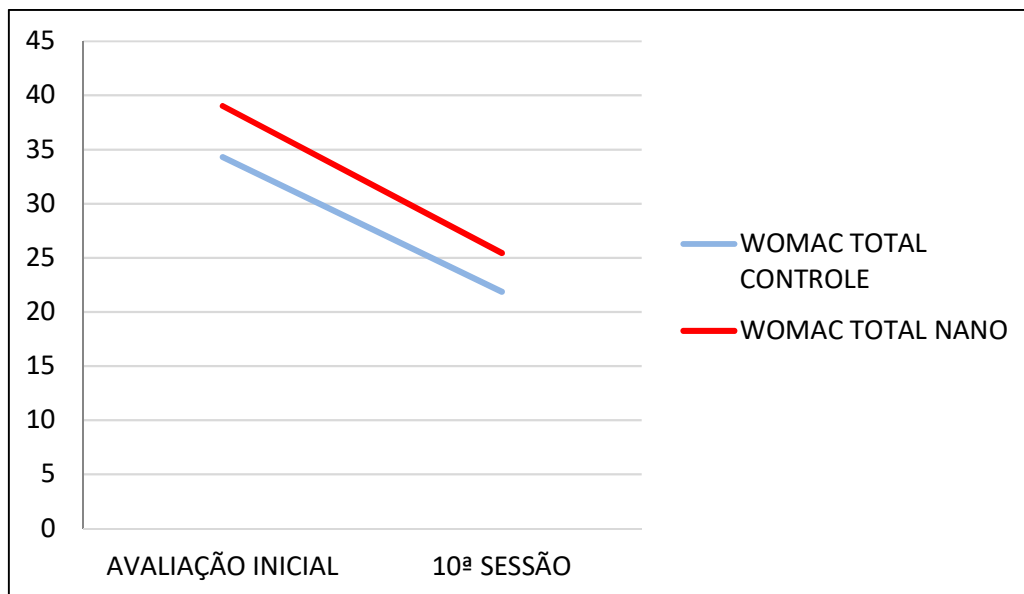


**Figura 48.** Rigidez avaliada pelo WOMAC durante 20 sessões. Grau de rigidez articular de zero a 50 (Eixo X). Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os grupos:  $p = 0,84$ .

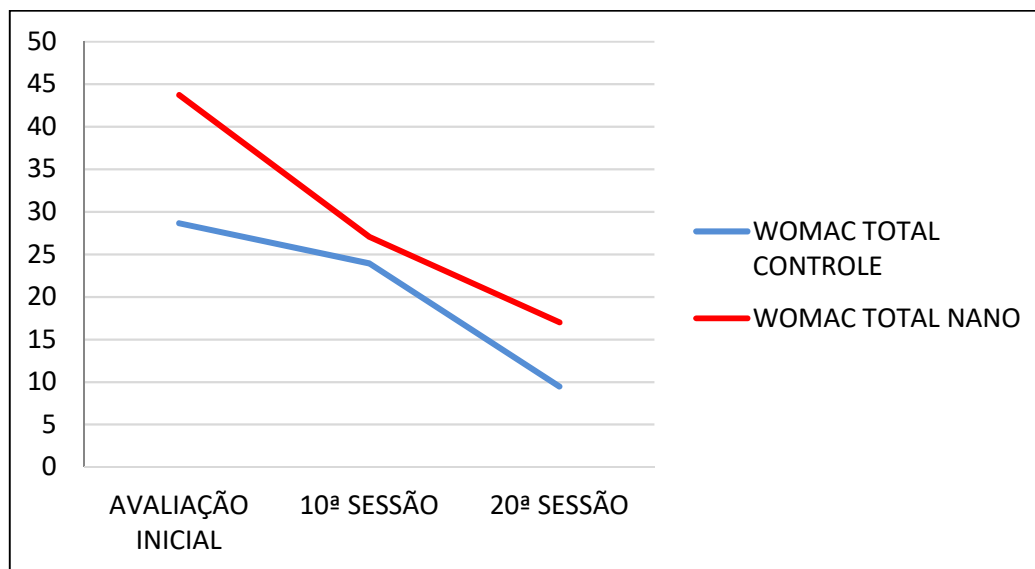
#### 6.4.3.3 Avaliação da Funcionalidade (WOMAC) e WOMAC Total

A funcionalidade também foi avaliada utilizando o WOMAC. Foram 17 perguntas que avaliaram, mediante relatos, o grau de dificuldade nos movimentos das atividades diárias. Tanto nas primeiras 10 sessões, como após 20 sessões de tratamento, o Grupo-Nano apresentou melhora significativa da funcionalidade, sendo os p-value's 0,01 e 0,05, respectivamente. Não houve uma evolução significativa da funcionalidade no Grupo-Controle, sendo os p-value's superiores a 0,05.

O WOMAC permite que a análise chegue num valor total, que representa a média geral das dimensões dor, rigidez e funcionalidade. Semelhante aos resultados da *Avaliação da Funcionalidade*, tanto nas primeiras 10 sessões (Figura 49), como após 20 sessões de tratamento (Figura 50), o Grupo-Nano apresentou melhor índice de WOMAC Total, mostrando que em geral houve melhora significativa nas 3 dimensões avaliadas pelo teste. O mesmo não ocorreu com o Grupo-Controle.



**Figura 49.** WOMAC total nas primeiras 10 sessões. Graus de zero a 40 referentes a média total entre dor, rigidez e funcionalidade (Eixo X). Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os grupos:  $p = 0,95$ .



**Figura 50.** WOMAC Total durante 20 sessões. Graus de zero a 40 referentes a média total entre dor, rigidez e funcionalidade (Eixo X). Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença entre os grupos:  $p = 0,58$ .

#### 5.4.4 VAS e WOMAC após 30 sessões de tratamento

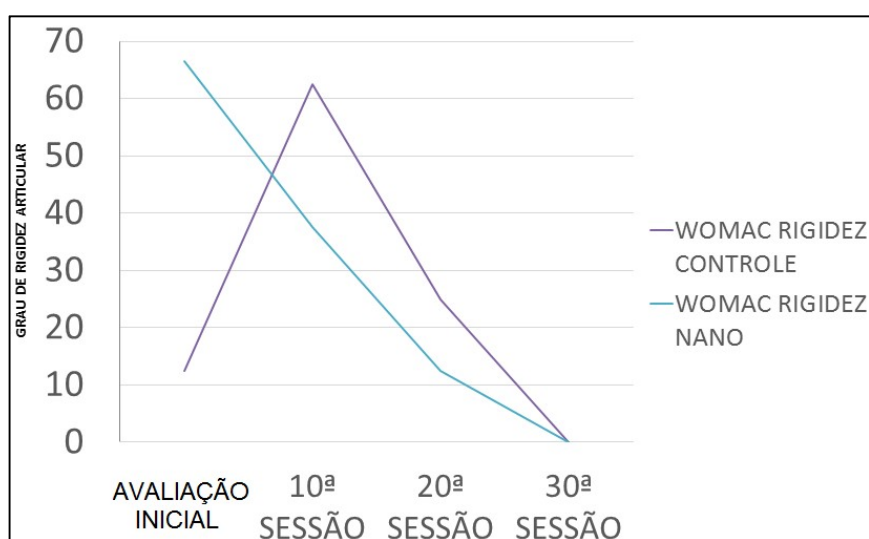
Durante o período de intervenção terapêutica, 2 participantes completaram 30 sessões de tratamento, sendo um paciente de cada grupo. Dessa forma, os resultados desses 2 pacientes estão sendo apresentados separadamente dos outros participantes (Tabela 25). Analisando os resultados da Tabela 25, foi possível concluir que os dois grupos apresentaram evolução satisfatória no alívio da dor

medida por VAS e WOMAC. Não houve diferença significativa entre os 2 grupos no final da trigésima sessão, sendo  $p = 0,58$  (VAS) e  $p = 0,54$  (WOMAC).

**Tabela 25.** Médias obtidas pelos grupos para cada variável (grupo e sessão). Valores dos participantes que completaram 30 sessões de tratamento. Coluna “1ª SESSÃO” representa os resultados da avaliação inicial (pré-tratamento).

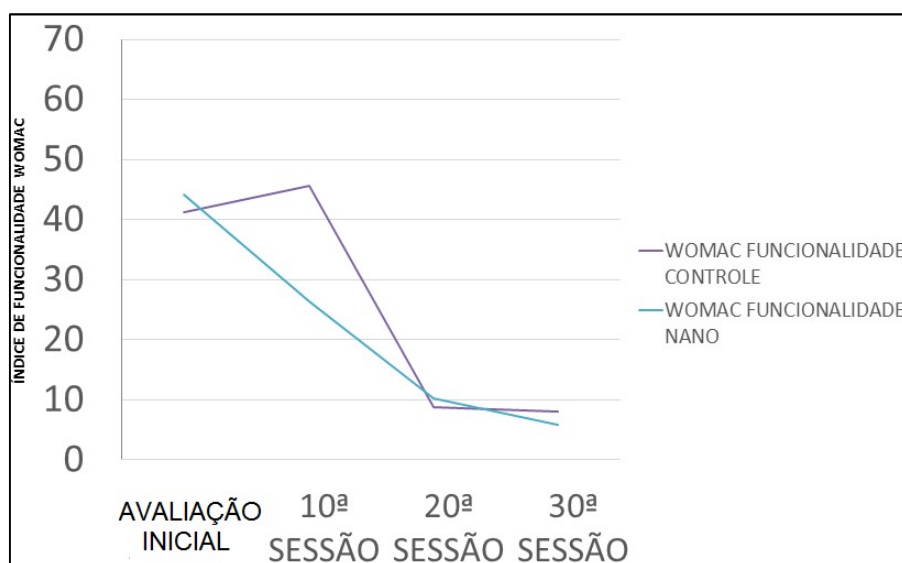
VARIÁVEL	GRUPO	1ª SESSÃO	10ª SESSÃO	20ª SESSÃO	30ª SESSÃO
VAS	CONTROLE	10,00	10,00	5,20	3,20
	NANO	7,30	3,50	1,50	0,50
WOMAC DOR	CONTROLE	55,00	50,00	20,00	10,00
	NANO	40,00	40,00	10,00	4,00
WOMAC RIGIDEZ	CONTROLE	12,50	62,50	25,00	0,00
	NANO	66,50	37,50	12,50	0,00
WOMAC FUNCIONALIDADE	CONTROLE	41,17	45,58	8,82	8,10
	NANO	44,11	26,47	10,29	5,88
WOMAC TOTAL	CONTROLE	41,66	47,91	12,50	10,20
	NANO	44,79	30,20	10,41	6,25

Na avaliação da rigidez articular, foi possível constatar que o Grupo-Controle teve aumento intenso do grau nas primeiras 10 sessões (Figura 51). O mesmo não ocorreu com o Grupo-Nano que apresentou redução satisfatória do grau desde a primeira sessão. Ao se comparar os 2 grupos houve diferença significativa entre eles, sendo o Grupo-Nano o de melhor evolução ( $p = 0,0001$ ).



**Figura 51.** Evolução da rigidez articular durante 30 sessões. Grau de rigidez articular de zero a 70 (Eixo X). Grupo-Nano com resultado superior ao Grupo-Controle. Diferença significativa entre os grupos:  $p = 0,0001$ .

Na avaliação da funcionalidade (Figura 52) e do WOMAC Total, no final da 30ª sessão, foi possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Nano, sendo  $p = 0,24$  (Funcionalidade) e  $p = 0,35$  (WOMAC Total). Entretanto o Grupo-Nano apresentou melhora dos sintomas desde o início do tratamento, o que não aconteceu com o Grupo-Controle, que mostrou inclusive uma regressão dos resultados nas primeiras 10 sessões.

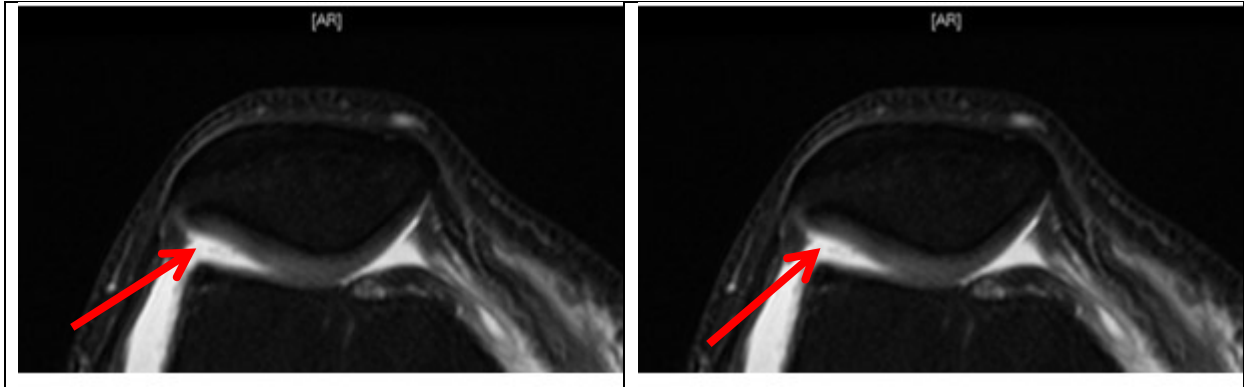


**Figura 52.** Evolução da funcionalidade durante 30 sessões. Linha roxa: resultados do Grupo-Controle. Linha azul: resultados do Grupo-Nano. Diferença entre os grupos no final da 30ª sessão:  $p = 0,24$ .

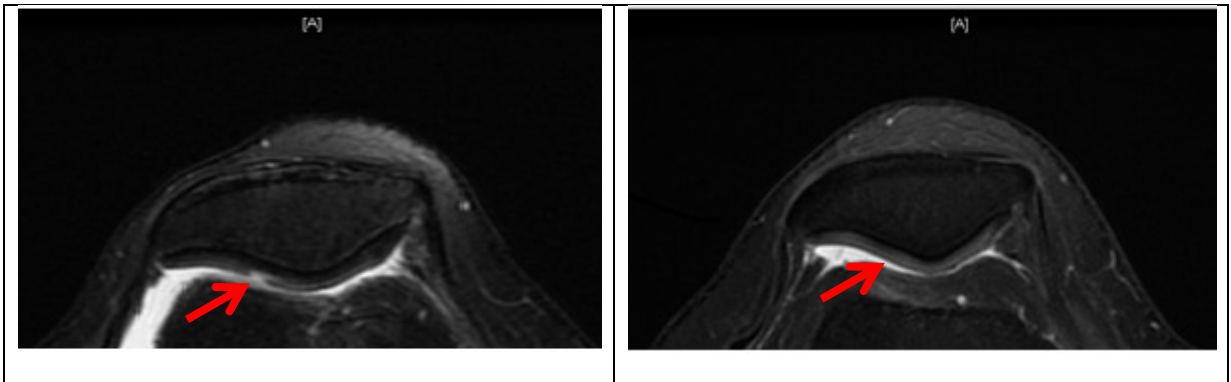
#### 5.4.5 Avaliação da modificação da estrutura articular

A Glucosamina e a Condroitina são consideradas fármacos modificadores de estrutura. Dessa forma, um dos objetivos dessa pesquisa é avaliar a presença de mudanças na estrutura articular por meio de Ressonância Magnética Nuclear. Os exames pós-tratamento com 30 sessões foram avaliados e comparados com as imagens dos exames pré-tratamento.

As Figuras 53a e 53b mostram os resultados pré e pós-tratamento do Grupo-Controle e as Figuras 54a e 54b mostram os resultados do Grupo-Nano. Foi possível concluir que não houve nenhuma mudança na estrutura da cartilagem no Grupo-Controle. Entretanto, o participante do Grupo-Nano apresentou recuperação total da cartilagem patelar.



**Figura 53a.** Ressonância Magnética Nuclear: aumento do sinal indicado pela seta vermelha, mostrando a lesão de Grau I da cartilagem patelar do Grupo-Control. Exame pré-tratamento. **Figura 53b.** Ressonância Magnética Nuclear: igual aumento de sinal indicado pela seta vermelha, mostrando a lesão de Grau I da cartilagem patelar do Grupo-Control. Exame pós-tratamento com 30 sessões.



**Figura 54a.** Ressonância Magnética Nuclear: cartilagem com aumento do sinal ou fissura, indicado pela seta vermelha, mostrando a lesão de Grau II da cartilagem patelar do Grupo-Nano. Exame pré-tratamento. **Figura 54b.** Ressonância Magnética Nuclear: cartilagem sem alteração do sinal, mostrando integridade da cartilagem patelar do Grupo-Nano. Exame pós-tratamento com 30 sessões.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO*

A seleção de excipientes para nanoemulsões requer considerações teóricas e experimentais, uma vez que muitos dos excipientes e até mesmo o próprio fármaco podem afetar a estabilidade físico-química desses sistemas. A formulação para entrega tópica da Glucosamina e Condroitina necessitou de estratégias específicas e projetadas para melhorar a permeação desses fármacos, uma vez que um fármaco hidrofílico, em comparação aos fármacos lipofílicos, tem menos afinidade com a estrutura da pele e maior dificuldade de permeação.

Durante o desenvolvimento da Nanoemulsão de GS e CS buscou-se um equilíbrio entre compostos capazes de formar um sistema estável, não tóxico e capaz de cumprir os requisitos de um bom veículo para a absorção dérmica. Um dos compostos foi o Cremophor ELP, que contribuiu para a formação de um sistema O/A. Esse resultado veio ao encontro da literatura, onde surfactantes com HLB maiores apontam a prevalência da região polar e o emprego dessas substâncias é indicado principalmente na obtenção de sistemas desse tipo (Lawrence e Rees, 2000; Kahlweit *et al.*, 1987). A quantidade de surfactante utilizada nesse estudo (9%) foi mínima o suficiente para produzir um sistema com filme interfacial estável e com DH e PDI baixos. O Cremophor ELP foi selecionado, devido à sua característica não iônica. A literatura deixa bem estabelecido que os surfactantes não iônicos são menos tóxicos e mais adequados para aplicações médicas (Tenjarla, 1999; Anton e Vandamme, 2011).

A escolha do Óleo de Rícino, como fase oleosa, deu-se pelo fato da grande utilização de óleos vegetais no desenvolvimento de sistemas tópicos. Esse óleo vem sendo utilizado em diversas aplicações cosméticas e farmacêuticas (Friedman *et al.*, 2010; Muehlmann *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016). O tipo de fase oleosa escolhida contribuiu para associação do óleo com o filme interfacial de surfactante, não sendo necessária, inclusive, a adição de co-surfactante nesse sistema. Ressalta-se que o Óleo de Rícino já foi utilizado como co-surfactante, e não como fase oleosa, em outro estudo (Pereira *et al.*, 2016). Pesquisadores relatam que óleos com elevada massa molecular podem não permitir a obtenção de sistemas estáveis (Kreilgaard,



2002; Osborne *et al.*, 1991). Apesar dos valores críticos de massa molar não estarem muito bem estabelecidos na literatura, o Óleo de Rícino (em torno de 90% de ácido ricinoléico), com sua massa molar de 298.461 g/mol, não prejudicou a formação do sistema. A literatura relata que existe uma relação crítica de óleo/surfactante para formação das nanoemulsões (Hessien *et al.*, 2011; Chiesa *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2016). A relação de 1/3 (óleo/surfactante) da formulação em estudo foi adequada para formação da Nanoemulsão O/A e tem sido selecionada em outras pesquisas (Junyapraserta *et al.*, 2008; Schmidts *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2011).

A concentração da fase aquosa de 78% foi necessária, principalmente, devido às características hidrossolúveis dos fármacos. Dessa forma, não foi possível formar um sistema A/O. Esse resultado relaciona-se com a literatura que fundamenta que o ponto de transição para inversão do sistema é em torno de 35 a 40% de fase aquosa (Monzer, 2011; Boonme *et al.*, 2006). Os sistemas A/O geralmente têm menos de 35% de fase aquosa. Por outro lado, sistemas O/A têm mais de 45% de fase aquosa (Junyapraserta *et al.*, 2008; Changez *et al.*, 2006; Hosmer *et al.*, 2009; Schmidts *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2011).

A formação de um sistema O/A tem vantagens, primeiramente pelo fato das possibilidades de utilizar menores concentrações de surfactantes para estabilização do sistema. Geralmente os sistemas A/O têm concentrações acima de 40% de surfactante, aumentando, dessa forma, o potencial tóxico da formulação (Kalaitzaki *et al.*, 2014; Tirnaksiz *et al.*, 2012; Sintov e Brandys-Sitton, 2006). Outra vantagem é que pesquisas vêm apontando para os melhores efeitos dos sistemas O/A em relação ao A/O, no aumento da permeação transdérmica (Schmidts *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014). Assim, foi decidido pela adoção do sistema O/A, com os fármacos hidrofílicos contidos na fase contínua, experimento desse tipo, com outros fármacos, já foi relatado na literatura (Trotta *et al.*, 1989).

O DH, o PDI e o Pz da formulação em estudo aumentaram após a adição dos fármacos. Esse resultado vem ao encontro da literatura que deixa bem estabelecido que a adição do fármaco na nanoemulsão pode modificar a microestrutura do sistema, elevando principalmente o DH e o PDI (Kreilgaard, 2002; Sintov e Shapiro, 2004). Essas mudanças nas propriedades coloidais da nanoemulsão mostram a

importância de comparar os resultados físicos-químicos da nanoemulsão carregada de fármaco com os seus homólogos em branco (livre de fármaco).

O aumento no índice de DH, após inclusão dos fármacos, manteve-se dentro de padrões adequados para a estabilidade do sistema. O DH (29,3 nm) foi um dos fatores determinantes da grande estabilidade da nanoemulsão em estudo. Geralmente, quanto menor o tamanho da partícula, maior a estabilidade do sistema. Pesquisadores relatam que nanopartículas maiores se sedimentam sob a ação do campo gravitacional, separando a fase dispersa da contínua (Tadros *et al.*, 2004; Capek, 2004; Taylor, 1998). O Pz negativo também contribuiu para um sistema estável, pois as partículas carregadas, que envolvem externamente a nanopartícula, repelem-se umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação (Schaffazick e Guterres, 2003; Roland *et al.*, 2003; Benita e Levy, 1993). O PDI estreito (0,1) foi também uma condição necessária para que a nanoemulsão apresentasse estabilidade. A monodispersão é considerada indispensável para evitar a agregação (Roland *et al.*, 2003; Jaiswal *et al.*, 2015). Esse aumento nos índices de DH, PDI e Pz sugere que o fármaco, ao ser adicionado na fase contínua, pode ter permanecido na camada de adsorção formada na superfície da nanopartícula, o que acabou proporcionando um sistema mais estável, por evitar a agregação.

A aplicabilidade industrial das nanopartículas pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química em períodos de armazenamento prolongados. Dessa forma, tornam-se fundamentais os testes de estabilidade com diferentes condições de armazenagem, simulando condições normais de envelhecimento. Durante os testes de estabilidade, num período de 150 dias, foi possível observar que as amostras centrifugadas e mantidas em temperatura ambiente e temperatura de 4°C apresentaram estabilidade, não ocorrendo o mesmo, entretanto, com a amostra mantida a 37°C. Observações semelhantes já foram obtidas em outras pesquisas (Mahboobiana *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017; Prasert e Gohtani, 2016). Esses testes, conhecidos como “testes de estabilidade acelerada”, têm como objetivo acelerar o aparecimento de sinais de instabilidade, produzindo uma estimativa de tempo para a estabilidade do sistema (Maruno e Rocha-Filho, 2010).

Temperaturas elevadas podem diminuir a viscosidade aparente do sistema e aumentar a motilidade cinética da fase dispersa ou do agente surfactante. Isso pode promover a coalescência das nanopartículas e, automaticamente, modificar o DH, PDI e Pz da nanoemulsão (Pereira *et al.*, 2016). As alterações das propriedades coloidais após a exposição da nanoemulsão em alta temperatura já foram relatadas na literatura e podem ser explicadas: i) pela ocorrência de desidratação do grupo da cabeça polar das moléculas do surfactante, levando ao seu vazamento da interface óleo-água, permitindo a agregação das partículas (Yilmaz e Borchert, 2005; Prasert e Gohtani, 2016); ii) pela oxidação em fase oleosa com formação de hidroperóxido, comprometendo a estabilidade e a segurança do sistema (Pereira *et al.*, 2016); iii) pela hidrólise de ésteres de ácidos graxos que costumam ocorrer em nanoemulsões produzidas com óleos vegetais. Essa hidrólise gera ácidos graxos livres, comprometendo a estabilidade do sistema (Martini, 2005; Bernardi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2016); e iv) pelas moléculas do óleo que podem ser transferidas da fase interna para a fase aquosa externa, fazendo com que as gotículas se encolham, como também pode ocorrer a transferência de massa entre nanopartículas modificando o PDI (Pereira *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 1996). Existe uma temperatura de armazenamento ideal onde as nanoemulsões mantêm a estabilidade durante um período mais longo. A formulação estudada aqui pode ser armazenada em temperatura ambiente (26°C) ou 4°C, porque apresentaram alteração mínima sob essa condição.

Os resultados da Cryo-Tem corroboraram com os resultados da DLS, quando foi observado formato esférico e leve variação nos diâmetros das nanopartículas. Com essa técnica de microscopia, foi possível confirmar que as nanopartículas atingiram diâmetros menores do que 100 nm. A variação no tamanho das nanopartículas pode ser explicada pelo fenômeno de *Ostwald ripening*, que ocorre com a difusão do conteúdo lipofílico das gotículas menores para as maiores através da fase externa hidrofílica da nanoemulsão, o que causa o crescimento de algumas nanopartículas do sistema (Capek, 2004; Taylor, 1998).

O controle do pH em temperatura ambiente, durante 150 dias, não apresentou uma variação significativa. No primeiro dia o valor do pH apresentou-se ácido, mas no decorrer do período, o valor apresentou um ligeiro aumento. Ressalta-se que o valor de pH não apresentou decréscimo. O contrário disso, caso ocorrido, seria

indicativo de degradação dos componentes da fase oleosa. Uma queda nos valores de pH pode representar uma oxidação em fase oleosa, com formação de hidroperóxido ou hidrólise de triglicerídeos, levando à formação de ácidos graxos livres, ou seja, a uma queda nos valores de pH (Masmoudi *et al.*, 2005; Rosani, 2011; Bernardi *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2016).

O pH da pele é normalmente ácido, variando em valores de pH de 4-6, enquanto o ambiente interno do corpo mantém um pH quase neutro (7-9). Isso cria um gradiente de pH acentuado de 2-3 unidades entre o estrato córneo e a derme. A literatura estabelece que muitas irritações de pele são decorrentes de agentes tópicos com valores de pH inadequados. Nesse sentido, os produtos tópicos devem ser compatíveis com o manto ácido, ou seja, devem estar preferencialmente na faixa de pH entre 4 a 6 (Dikstein e Zlotogorski, 1994; Rippke *et al.*, 2002; Ali e Yosipovitch, 2013).

Após os resultados favoráveis da caracterização físico-química e dos testes de estabilidade, iniciou-se a avaliação (*in vitro*) da segurança da formulação. As metodologias de MTT e HET-CAM foram selecionadas porque constituem importante etapa prévia ao ensaio clínico e, principalmente, representam uma forma de analisar se o pH e as características dos reagentes teriam potencial para reações tóxicas na pele.

O sistema em estudo não apresentou citotoxicidade *in vitro*. O efeito citotóxico da Nanoemulsão de GS e CS na linhagem NIH-3T3, por um período de 24 horas, foi determinado utilizando o ensaio MTT. O IC<sub>50</sub> ocorreu em concentrações extremamente altas da Nanoemulsão. Pesquisadores já analisaram o efeito citotóxico, pelo mesmo método, com nanoemulsões contendo Óleo de Rícino (Rachmawati *et al.*, 2017) e Cremophor ELP (Bup *et al.*, 2016; Pedersen *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2005), quando o perfil de toxicidade dos dois reagentes foi favorável, relacionando com os resultados da Nanoemulsão de GS e CS em estudo. Em se tratando do Óleo de Rícino, ressalta-se o estudo de Katzer *et al.* (2014), onde foram desenvolvidas nanoemulsões à base de Óleo de Rícino para entrega ocular. Nesse estudo, a Nanoemulsão foi considerada não-citotóxica num teste de HET-CAM, o que foi confirmado por estudos de citotoxicidade com MTT. Uma revisão de Moshiri *et al.* (2016), a respeito da toxicidade da ricina, concluiu que a gravidade dos efeitos depende da via de exposição. De acordo com esses pesquisadores, a inalação foi

mais potente do que a ingestão oral e nenhuma toxicidade dérmica foi observada em pele de ratos.

Ainda nesse contexto, pesquisadores analisaram a citotoxicidade com MTT da Glucosamina (Reis *et al.*, 2003; Setnikar *et al.*, 1984; Setnikar *et al.*, 1991) e Condroitina (Reis *et al.*, 2003; Dwivedi *et al.*, 2015; Craciunescu *et al.*, 2013) e, também, não encontraram um potencial de toxicidade. A Glucosamina e a Condroitina são polímeros naturais que apresentam, além de alta estabilidade, uma baixa toxicidade, justificando sua ampla aplicação no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos (Reis *et al.*, 2003). Ressalta-se um estudo de Craciunescu *et al.* (2013), que num ensaio de MTT observaram que um sistema lipossomal à base de Condroitina, além de não apresentar efeito citotóxico, aumentou a atividade celular após 72 horas de cultivo.

Derivados do Óleo de Rícino já foram analisados com HET-CAM em outras pesquisas e apresentaram resultados similares (Zanatta, 2008; Pereira, 2008). Por outro lado, na pesquisa de Bernardi *et al.* (2011), com derivados do mesmo óleo, não houve sinais de irritação em HET-CAM. Nos resultados da presente pesquisa, no teste HET-CAM, tanto a nanoemulsão como seu homólogo em branco mostraram-se moderadamente irritantes. Esse resultado pode estar relacionado com o valor de pH das formulações que apresentou-se com característica ácida. Não houve diferença significativa entre as duas amostras, podendo-se concluir que o potencial irritante não foi dos fármacos e sim dos outros reagentes (óleo e surfactante). Ressalta-se que os valores ficaram no limite inferior da faixa considerada “moderadamente irritante” e isso, associado aos resultados do teste de citotoxicidade *in vitro*, aos resultados do ensaio clínico e aos achados na literatura que relatam que essa técnica apresenta baixa sensibilidade para classificar produtos “moderadamente irritantes” (Debbasch *et al.*, 2005; Alany *et al.*, 2006), é possível considerar que os índices de irritação foram satisfatórios para a aplicação do produto com segurança.

Diante dos resultados dos testes *in vitro*, pode-se concluir que os reagentes e o pH não causaram citotoxicidade à formulação. Dessa forma, os excipientes selecionados e suas composições não afetaram o sistema, formando uma Nanoemulsão tanto estável, como não tóxica. A partir desse momento, o estudo dirigiu-se para a análise da eficiência da formulação como um veículo para

permeação transdérmica. A Análise Elementar CHN, proposta como metodologia analítica para quantificação da GS e CS, após os ensaios *in vitro* de permeação cutânea, se mostrou com pouca sensibilidade quantitativa, porém, pode ser considerada como um bom método qualitativo para a devida proposta. Foi possível observar por meio desse método que, quando utilizado a Nanoemulsão de GS e CS, houve maior retenção de carbono na pele viável e maior dose de carbono foi quantificada no líquido receptor. Esses índices foram significativamente maiores em comparação à formulação controle. A literatura relata que os pontos fortes do CHN são que ele é um instrumento rápido em sua operação, prontamente acessível e relativamente de menor custo quando comparado a outros métodos analíticos (Braun e Pantano, 2014). Não foram encontrados na literatura relatos da utilização desse método para quantificação de fármacos após teste de permeação *in vitro*, podendo ele representar uma nova proposta metodológica.

## 6.2 ESTUDO PILOTO

### 6.2.1 Ajustes na metodologia da pesquisa

Durante os 6 meses de triagem dos participantes e aplicação dos protocolos de tratamento, foi possível identificar necessidades de ajustes na metodologia da pesquisa. Um dos ajustes diz respeito ao número de 3 sessões de fisioterapia por semana, que fez com que um número significativo de participantes não desse continuidade ao tratamento. Dessa forma, indica-se a mudança para 2 sessões de fisioterapia por semana. Numa revisão sistemática de Silva, Serrão *et al.* (2012), avaliando protocolos de tratamento para osteoartrite de joelho, foi detectado que a frequência da intervenção variou de duas a cinco vezes por semana, e que não se pode concluir que os resultados terapêuticos sejam inferiores quando diminui o número de sessões por semana.

Outro ponto que precisa ser ajustado refere-se à aplicação e cálculo dos domínios do WOMAC. Nesse sentido, o avaliador cegado deverá acompanhar o participante em cada uma das respostas do questionário para garantir que todas sejam compreendidas e respondidas. No mesmo dia, um outro avaliador, cegado quanto aos protocolos e identificação dos pacientes, deverá fazer o cálculo de cada

domínio do instrumento, e essas informações irão alimentando uma planilha de dados.

Esse procedimento permitirá que se percebam, em tempo, os erros de preenchimentos do WOMAC, cometidos pelos participantes, como, também, evitará viés de pesquisa, quando, tanto o avaliador responsável pela aplicação dos instrumentos de avaliação, como o responsável pela aplicação dos protocolos, não terão acesso aos resultados quantitativos entre as avaliações dos participantes. Malavolta *et al.* (2011) discutem a respeito das dificuldades de ensaios clínicos randomizados na área ortopédica e manifestam que o cegamento ou mascaramento é um ponto importante para evitar vieses de pesquisa. Esses pesquisadores ressaltam a importância do cegamento das pessoas responsáveis pela aplicação dos instrumentos de avaliação, bem como das pessoas que irão cuidar da interpretação numérica dos dados.

Outra dificuldade encontrada durante o estudo piloto, foi a resistência apresentada pelos participantes em responder por 3 vezes ou mais o instrumento WOMAC. Já que ele era aplicado no início do tratamento e depois, ao final de cada 10 sessões. Uma sugestão para amenizar essa problemática é a aplicação dos instrumentos de avaliação ao final de cada 15 sessões. A periodicidade de aplicação de instrumentos de avaliação é bastante variada na literatura (Silva, Serrão *et al.*, 2012).

No presente estudo, a proposta de tratamento tem duração de aproximadamente 4 meses. Sugere-se a inclusão de sessões de manutenção a cada quinze dias, prática muito utilizada no ambiente de tratamento fisioterapêutico. Essas sessões de manutenção serão importantes para manter o vínculo com os participantes e, também, para observar a manutenção do quadro clínico durante, pelo menos, 6 meses. Ressalta-se que a GS e CS são fármacos considerados como modificadores de estrutura e, assim, considera-se importante um maior tempo para analisar a presença dessas modificações estruturais (Clegg *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2003; Erhan *et al.*, 2012; Hammad *et al.*, 2015; Henrotin e Lambert, 2013).

Desse modo, o participante, ao final de 6 meses, retornaria ao médico para reavaliação e solicitação de exames pós-tratamento. Caromano *et al.* (2008) avaliaram como fundamental a manutenção de tratamento por 6 meses para

concretizar as mudanças de comportamento (cuidados corporais, por exemplo), como, também, identificaram uma melhora adicional no ganho de força muscular.

### **6.2.2 Relevância clínica e significância estatística**

A análise estatística dos resultados foi importante para testar métodos estatísticos mais adequados para o ensaio clínico. A população do estudo foi homogênea, ou seja, as características procuradas podiam ser encontradas em qualquer elemento da população com a mesma probabilidade. A literatura relata que a homogeneidade da população traz vantagens, como menor probabilidade de erro amostral e maior probabilidade de encontrar significância no estudo (Malavolta *et al.*, 2011; Silva, Serrão *et al.*, 2012; Paes, 1998).

Com a análise dos resultados foi possível verificar que após 20 sessões de tratamento o Grupo-Nano apresentou evolução clínica estatisticamente significativa nos domínios VAS-Dor, WOMAC-Rigidez, WOMAC-Funcionalidade e WOMAC-Total. Por outro lado, os participantes do Grupo-Controle não apresentaram evolução clínica com significância estatística nos mesmos 4 domínios. Importante salientar que o Grupo-Nano teve melhor resultado em 4 dos 5 domínios avaliados. A ausência de diferença significativa entre os grupos pode estar relacionada ao pequeno número de participantes de um estudo piloto. Porém, seria insensato ignorar as primeiras evidências disponíveis de superioridade da intervenção no Grupo-Nano.

Chamou a atenção nesse presente estudo o fato de que o domínio WOMAC-Dor, que até a vigésima sessão não tinha apresentado evolução satisfatória, apresentou melhora significativa após 30 sessões de tratamento. O fato ocorreu nos dois grupos. Outro ponto, nesse mesmo sentido, foi o que aconteceu com os resultados após 30 sessões do domínio WOMAC-Rigidez. O Grupo-Nano veio apresentando melhor evolução clínica da rigidez articular desde a 1ª reavaliação, mas até a 20ª sessão não apresentava diferença significativa em relação ao Grupo-Controle. Entretanto, ao analisar o WOMAC-Rigidez na 30ª sessão o Grupo-Nano, não só apresentou melhor resultado, como houve diferença significativa, estatisticamente, em comparação ao Grupo-Controle. Esse resultado vem ao encontro da literatura que deixa bem estabelecido que o tratamento com a GS e CS deve ser por tempo prolongado. O limite de tempo não está bem definido, mas as



pesquisas variam de 8 a 12 semanas de intervenção (Clegg *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2003; Erhan *et al.*, 2012; Hammad *et al.*, 2015; Henrotin e Lambert, 2013). Esse resultado leva a outra reflexão, no sentido de que, se todos os participantes dos dois grupos tivessem completado 30 sessões de tratamento, poderia ter sido alcançado mais resultados com significância estatística ao se comparar os dois grupos.

Ressalta-se a recuperação total da cartilagem articular, evidenciada em RNM, apresentada pelo participante do Grupo-Nano. O participante do Grupo-Controle, não apresentou nenhum sinal de regeneração da cartilagem. Esse resultado remete a dois contrapontos na literatura: o primeiro está relacionado às meta-análises que apontam que a GS e CS, utilizadas via oral, têm efeitos incertos como modificadores de estrutura (Towheed *et al.*, 2005; Jimenez e Dodge, 1997; Mcalindon *et al.*, 2000; Richy *et al.*, 2003; Leeb *et al.*, 2000); o segundo está relacionado aos estudos randomizados de aplicação tópica de GS e CS (sem nanotecnologia), que não apresentaram resultados promissores (Cohen *et al.*, 2003; Erhan *et al.*, 2012; Hammad *et al.*, 2015; Onigbinde *et al.*, 2011; Onigbinde *et al.*, 2014). O presente estudo procurou investigar a eficácia da GS e CS, aplicando outra forma de intervenção, tendo encontrado relevância clínica em seu resultado. Por se tratar de uma lesão que pode levar à incapacidade física e necessita de investigações promissoras, esse resultado também não pode ser ignorado.

A presente proposta terapêutica difere das outras intervenções encontradas na literatura, pela associação de diferentes estratégias: i) a via transdérmica, com suas diferentes vantagens em relação às outras vias (Silva *et al.*, 2010; Badran *et al.*, 2009; Chorilli *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2009); ii) o ultrassom, com o seu poder de induzir um novo estado estrutural no estrato córneo (Bare *et al.*, 1996; Trommer e Neubert, 2006; Polat *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 1998) e aumentar a permeação de nanomaterias (Schroeder, Honen *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2011; Polat *et al.*, 2011; Victor *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2016; Paliwal *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Seto *et al.*, 2010; Schlicher *et al.*, 2006; Hussein e Pitt, 2008; Prato *et al.*, 2015); iii) as condições ocluídas do estrato córneo, deixando-o mais semelhante à epiderme viável (Ferderber *et al.*, 2009; Saliba *et al.*, 2007; Williams e Barry, 2004; Zhai e Maibach, 2001); e iv) a formulação desenvolvida com nanotecnologia, que permite penetração rápida na pele de moléculas ativas, devido à grande área de superfície da fase interna e aos seus componentes reduzirem a propriedade de barreira do

estrato córneo (Abd *et al.*, 2016; Figen *et al.*, 2012; Kalaitzaki *et al.*, 2013). Essas estratégias, em conjunto, podem ter aumentado a captação da GS e CS, que são acreditadas como fármacos capazes de proporcionar processos de regeneração da cartilagem (Toffoletto *et al.*, 2005; Jerosch, 2011; Provenza *et al.*, 2015; Jimenez e Dodge, 1997).

Dadas as limitações de um estudo piloto para atingir a significância estatística, é importante salientar a importância dos resultados clínicos atingidos tendo em vista a relevância clínica dos resultados da pesquisa em discussão. Importante aqui, é que a intervenção teve um impacto nos resultados clínicos. Segundo Armijo-Olivo (2018), os pesquisadores que conduzem ensaios clínicos no campo da terapia física têm a obrigação de relatar a relevância clínica dos resultados à comunidade clínica para aderir aos princípios da prática baseada em evidências. Isso ajudará a divulgar evidências de uma maneira útil e compreensível para os usuários finais, como pacientes, clínicos de saúde e tomadores de decisões.

## 7. CONCLUSÕES

Uma vez cumprido todo o delineamento experimental e avaliado todos os resultados, a pesquisa trouxe algumas conclusões em relação à Nanoemulsão de Glucosamina e Condroitina, do tipo O/A:

- i) apresenta características físico-químicas adequadas para aplicações clínicas, sendo seu DH de 29,3 nm, seu PDI de 0,11 e seu Pz -2,44 mV;
- ii) sua morfologia, por meio do Cryo-Tem, mostrou nanopartículas esféricas com diâmetros menores do que 100 nm;
- iii) é estável em temperatura ambiente e a 4 °C, mantendo por 150 dias o DH, PDI e o Pz estáveis;
- iv) o pH é estável por 150 dias em temperatura ambiente e adequado para aplicações dérmicas;
- v) apresentou potencial citotóxico favorável no ensaio de MTT e potencial de irritabilidade também favorável no teste de irritação HET-CAM;
- vii) no teste de permeação *in vitro*, com seus resultados sendo quantificados pelo CHN, mostrou uma menor retenção no estrato córneo, uma maior retenção na pele viável e uma maior quantificação no líquido receptor (resultados comparados com formulação controle);
- viii) no estudo piloto, mostrou resultados superiores ao controle, em relação aos domínios VAS-Dor, WOMAC-Rigidez, WOMAC-Funcionalidade e WOMAC-Total; e
- ix) no estudo piloto, mostrou regeneração total da cartilagem articular, enquanto que o participante do Grupo-Controle não apresentou nenhuma melhora da estrutura articular.

Mediante os fatos expostos, a Nanoemulsão óleo em água de Glucosamina e Condroitina, associada ao ultrassom, à cinesioterapia e a oclusão, foi capaz de melhorar a absorção transdérmica e mostrar relevância clínica no alívio dos sintomas e na modificação da estrutura articular em humanos com condropatia patelar. O estudo piloto foi de fundamental importância para aprimorar o delineamento experimental.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd E., Namjoshil S., Mohammed Y.H., Roberts M.S., Grice J.E. Synergistic Skin Penetration Enhancer and Nanoemulsion Formulations Promote the Human Epidermal Permeation of Caffeine and Naproxen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105 (1), p. 212–220, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.24699>
- Aboofazelli R., Barlow D.J., Lawrence M.J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: I. Total intensity light scattering. **AAPS Pharm Sci**, v. 2, p. 27–39, 2000.
- Afadzi M., Davies C.D., Hansen Y.H., Johansen T., Standal O.K., Hansen R., Masoy S.E. *et al.* Effect of ultrasound parameters on the release of liposomal calcein. **Ultrasound Med Biol**, v. 38, p. 476-486, 2012.
- Alany R.G., Rades T., Nicoll J., Tucker I.G., Davies N.M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **J Control Release**, v. 10;111(1-2), p.145-152, 2006.
- Ali S.M, Yosipovitch G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. **Acta Derm Venereol**, v. 93, p. 261-267, 2013. Doi:10.2340/00015555-1531
- Alkilani A.Z., McCrudden M.T.C., Donnelly R.F.. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 438-470, 2015. Doi:10.3390/pharmaceutics7040438.
- Altman R., Alarcón G., Appelrouth D., Bloch D., Borenstein D., Brandt K., Brown C., Cooke T.D., Daniel W., Gray R., *et al.* The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. **Arthritis Rheum**, v. 33, p. 1601-1610, 1990.
- Altman R.D., Gray R. Diagnostic and therapeutic uses of the arthroscope in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Am J Med**, v. 75(4B), p. 50-55, 1983.
- Andega S., Kanikkannan N., Singh M. Comparison of the fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 77 (1), p.17-25, 2001.
- Anton N., Vandamme T.F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharm Res**, v. 28, p. 978–985, 2011.
- Argoff C.E., Gloth F.M. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for management of osteoarthritis in long-term care patients. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 7, p. 393-399, 2011.
- Armijo-Olivo S. The importance of determining the clinical significance of research results in physical therapy clinical research. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, p. 1-2, 2018. Doi.org/10.1016/j.bjpt.2018.02.001

Attur M., Samuels J., Krasnokutsky S., Abramson S.B. Targeting the synovial tissue for treating osteoarthritis (OA): where is the evidence? **Best Practice and Research**, v. 24(1), p. 71–79, 2010.

Azeem A., Rizwan M., Ahmad F.J., Iqbal Z., Khar R.K., *et al.* Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, p. 69–76, 2009.

Badran M.M., Kuntsche J., Fahr A. Skin penetration enhancement by a microneedle device in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **Eur J Pharm.Sci**, v. 36(4-5), p. 511-523, 2009.

Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v.18(1), p.77-140, 2001.

Bare A.C., McAnaw M.B., Pritchard A.E., Struebing J.G., Smutok M.A., Christie D.S., Domenech M.A., Bare M.A., Bloodworth M.L., Seal L.A. Phonophoretic Delivery of 10% Hydrocortisone Through the Epidermis of Humans as Determined by Serum Cortisol Concentrations. **Physical Therapy**, v.76, p. 738-745, 1996.

Barja P.R., Veloso D.J.D.V. Photoacoustic study of the penetration kinetics of nimesulid into human skin. 15th International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena. **Journal of Physics**, Conference Series 214 012017, 2010. Doi:10.1088/1742-6596/214/1/012017

Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **J Pharm Sci**, v. 99(1), p. 21-50, 2010.

Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., Lopez-Quintela M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. **J Invest Dermatol**, v. 127(7), p. 1701-1712, 2007.

Barry B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur J Pharm Sci**, v. 14, p.101-114, 2001.

Basad E., Ishaque B., Bachmann G., Stürz H., Steinmeyer J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 18(4), p. 519-527, 2010.

Baskurt F., Özcan A., Algun C. Comparison of effects of phonophoresis and iontophoresis of naproxen in the treatment of lateral epicondylitis. **Clin Rehabil**, v. 17, p. 96-100, 2003.

Bastiaansen-Jenniskens Y.M., Koevoet W., de Bart A.C., van der Linden J.C., Zuurmond A.M., Weinans H., Verhaar J.A., van Osch G.J., Degroot J. Contribution of collagen network features to functional properties of engineered cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 16(3), p. 359-366, 2008.

Batista L.H., Camargo P.R., Aiello G.V., Oishi J., Salvini T.F. Avaliação da amplitude articular do joelho: correlação entre as medidas realizadas com o goniômetro universal e no dinamômetro isocinético. **Rev. Bras. Fisioter**, v. 10(2), p. 193-198, 2006.

Bekkers J.E., Inklaar M., Saris D.B. Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review. **Am J Sports Med.** v. 37(1), p.148-155, 2009.

Benita S., Levy M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **J Pharm Sci**, v. 82(11), p. 1069-79, 1993. Doi.org/10.1002/jps.2600821102

Bennell K.L., Ahamed Y., Bryant C., Jull G., Hunt M.A., Kenardy J., Forbes A., Harris A., Nicholas M., Metcalf B., Egerton T., Keefe F.J. A physiotherapist-delivered integrated exercise and pain coping skills training intervention for individuals with knee osteoarthritis: a randomised controlled trial protocol. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13(129), p. 1-17, 2012.

Bernardi D.S., Pereira T.A., Maciel N.R., Bortoloto J., Viera G.S., Oliveira G.C., Rocha-Filho P.A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9(44), p. 1-9, 2011.

Bhatia S.K., Yetter A.B. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biol Toxicol**, v. 24, p. 315-319, 2008.

Boonme P., Krauel K., Graf A., Rades T., Junyaprasert V.B. Characterization of microemulsion structure in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol. **AAPS Pharm SciTech**, v. 7(2), p. 99-104, 2006.

Bortolon F.F., Sato M.E., Andreazza R.C.S., Bresolin T.M.B. Effect of enhancers on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam from compounding formulations. **Rev.Bras.Farm.** v. 44(3), p. 433-49, 2008.

Braun E.I., Pantano P. The importance of an extensive elemental analysis of singlewalled carbon nanotube soot. **Carbon NY**, v. 1(77), p. 912–919, 2014. Doi:10.1016/j.carbon.2014.06.005.

Brittberg M., Aglietti P., Gambardella R., Hangody L. *et al.*, ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. The clinical evaluation system can also be combined with the ICRS Imaging **Protocol as well as the ICRS Biomechanical Protocol**. 2014.  
[https://cartilage.org/content/uploads/2014/10/ICRS\\_evaluation.pdf](https://cartilage.org/content/uploads/2014/10/ICRS_evaluation.pdf)

Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. **N Engl J Med**, v. 331(14), p. 889-95, 1994.

Bronaugh R.L.; Stewart R.F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. **J Pharm Sci**. v. 73(9), p. 1255-1258, 1984.

Brucks R., Nanavaty M., Jung D., Siegel F. The effect of ultrasound on the in vitro penetration of ibuprofen through human epidermis. **Pharm Res**, v. 6(8), 697-701, 1989.

Bruyère O. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 44, p. 253-263, 2014.

Bu P., Narayanan S., Dalrymple D., Cheng X., Serajuddin A.T. Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. **Eur J Pharm Sci**, v. 25(91), p. 162-71, 2016.

Caffey S., McPherson E., Moore B., Hedman T., Vangsness C.T. Effects of radiofrequency energy on human articular cartilage: an analysis of 5 systems. **Am J Sports Med**, v. 33(7), p. 1035-1039, 2005.

Canhota C. Qual a importância do estudo piloto? In: SILVA, E. E. (Org.). Investigação passo a passo: perguntas e respostas para investigação clínica. Lisboa: **APMCG**, p. 69-72, 2008.

Capek I. Degradation of kinetically-stable O/W emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p.125-155, 2004.

Caromano F.A., Carlis M., Santos L.S., Panades C., Ide M.R., Assis S.M.B. Extremity superior exercises practice among Physiotherapy students - six-month follow-up study. **Rev. Ter. Ocup**, v.19(1), p. 56-60, 2008.

Carvalho W.A., Carvalho R.D.S., Rios-Santos F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos \* Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances. **Rev Bras Anestesiol**, v. 54(3), p. 448-464, 2004.

Cavalcanti Filho M.M.C., Doca D., Cohen M., Ferretti M. Atualização no diagnóstico e tratamento das lesões condrais do joelho. **Rev Bras Ortop**. v. 47(1), p. 12-20, 2012.

Ceschel G.C., Maffei P., Moretti M.D.L., Demontis S., Peana A.T. In vitro permeation trough porcine buccal mucosa of Salvia desoleana Atzei & Picci essential oil from topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1-2(195), p.171-177, 2000.

Cevc G., Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **J Control Release**, v. 141(3), p. 277-299, 2010.

Changez M., Chander J., Dinda A.K. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 48, p. 58–66, 2006.

Chao T.C., Chu Z., Tseng L.M., Chiou T.J., Hsieh R.K., Wang W.S., Yen C.C., Yang M.H., Hsiao L.T., Liu J.H., Chen P.M. Paclitaxel in a novel formulation containing less Cremophor EL as first-line therapy for advanced breast cancer: A phase II trial. **Investigational New Drugs**, v. (23)2, p. 171-177, 2005. Doi:10.1007/s10637-005-5863-8

Chappell JC, Song J, Burke CW, Klibanov AL, Price RJ. Targeted delivery of nanoparticles bearing fibroblast growth factor-2 by ultrasonic microbubble destruction for therapeutic arteriogenesis. **Small**, v. 4, p. 1769-1777, 2008.

Chen A.C., Temple M.M., Ng D.M., Verzijl N., DeGroot J., TeKoppele J.M., Sah R.L. Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage. **Arthritis Rheum**, v. 46(12), p. 3212–3217, 2002.

Chen H., Chang X., Du D., Li J., Xu H., Yang X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, p.52–58, 2006.

Chi X., Huang D., Zhao Z., Zhou Z., Yin Z., Gao J.. Nanoprobes for in vitro diagnostics of cancer and infectious diseases. **Biomaterials**, v. 33(1), p.189-206, 2012.

Chiesa M., Garg J., Kang Y.T., Chen G. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nano-emulsions. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp**, v.326, p.67–72, 2008.

Cho H., Stuart J.M., Magid R., Danila D.C., Hunsaker T., Pinkhassik E., Hasty K.A. Theranostic immunoliposomes for osteoarthritis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, p. 619–627, 2014.

Chorilli M., Brizante A.C., Rodrigues C.A., Salgado H.R.N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev.Bras.Farm**, v. 88(1), p.7-13, 2007.

Clegg D., Reda D.J., Harris C.L., Klein M.A., O'Dell J.R., Hooper M.M., Bradley J.D., *et al.* Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. **N Engl J Med**, v. 354, p.795-808, 2006.

Cohen M., Wolfe R., Mai T., Lewis D. A randomized, double blind, placebo controlled trial of a topical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of the knee. **J Rheumatol**, v. 30(3), p.523-528, 2003.

Cohen-Levi, D. Ultrasound for targeted delivery of cytotoxic drugs from liposomes. MSc Thesis (Kost, J., Barenholz, Y., supervisors). Faculty of Engineering Sciences, Ben Gurion University, Beer Sheva, Israel, p. 115, 2000.

Conrad JM, Stanitski CL. Osteochondritis dissecans: Wilson's sign revisited. **Am J Sports Med**, v. 31(5), p. 777-778, 2003.

Craciunescu O., Moldovan L., Moisei M., Trif M. Liposomal formulation of chondroitin sulfate enhances its antioxidant and anti-inflammatory potential in L929 fibroblast cell line. **J Liposome Res**, v. 23(2), p.145-153, 2013.

Crane M., Handy R.D., Garrod J., Owen R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17(7), p. 421-437, 2008.

Cui H., Hodgkin T.K., Kaler E.W., Abezgauz L., Danino D., Lubovsky M., Talmon Y., Pochan D.J. Elucidating the assembled structure of amphiphiles in solution via cryogenic transmission electron microscopy. **Soft Matter**, v. 3, p. 945-955, 2007. Doi:10.1039/B704194B

Davidson P.A., Rivenburgh D.W., Dawson P.E., Rozin R. Clinical, histologic, and radiographic outcomes of distal femoral resurfacing with hypothermically stored osteoarticular allografts. **Am J Sports Med**. v. 35(7), p.1082-90, 2007.

Debbasch C., Ebenhahn C., Dami N., Pericol M., Van Den Bergue C., Cottin M., Nohynek G.J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food Chemical Toxicology**, v. 43, p.155-165, 2005.



Delmonico M.J., Harris T.B., Visser M., Park SW, Conroy M.B., Velasquez-Mieyer P., Boudreau R., *et al.* Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. **Am J Clin Nutr**, v.90(6), p.1579–1585, 2009.

Detterline A.J., Goldberg S., Bach B.R. Jr, Cole B.J. Treatment options for articular cartilage defects of the knee. **Orthop Nurs**, v. 24(5), p.361-366, 2005.

Dikstein S., Zlotogorski A. Measurement of skin pH. **Acta Derm Venereol**, v. 185, p. 18-20, 1994.

Dobson F., Hinman R.S., Roos E.M., Abbott J.H., Stratford P., Davis A.M., Buchbinder R., Snyder-Mackler L, Henrotin Y, Thumboo J, Hansen P, Bennell KL.. OARSI recommended performance-based tests to assess physical function in people diagnosed with hip or knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.21, p.1042-1052, 2013.

Dominkus M., Nicolakis M., Kotz R., Wilkinson F.E., Kaiser R.R., Chlud K. Comparison of tissue and plasma levels of ibuprofen after oral and topical administration. **Arzneimittel-Forschung**. V. 46(12), p.1138-1143, 1996.

Duarte V.S., Santos M.L., Rodrigues K.A., Ramires J.B., Arêas G.P.T., Borges G.F. Exercise and osteoarthritis: a systematic review. **Fisioter. Mov**, v. 26(1), p. 193-202, 2013.

Dwivedi P., Nayak V., Kowshik M. Role of Gold Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles for Chondroitin Sulfate in the Treatment of Osteoarthritis. **Biotechnol. Prog**. v.31(5), p.1416-1422, 2015.

Ebrahimi S., Abbasnia K., Motealleh A., Kooroshfard N., Kamali F., Ghaffarinezhad F. Effect of lidocaine phonophoresis on sensory blockade: pulsed or continuous mode of therapeutic ultrasound? **Physiotherapy**, v. 98(1), p. 57-63, 2012. Doi: 10.1016/j.physio.2011.01.009.

Edwards R.B., Lu Y., Nho S., Cole B.J., Markel M.D. Thermal chondroplasty of chondromalacic human cartilage. An ex vivo comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices. **Am J Sports Med**. v. 30(1), p.90-97, 2002.

El Maghraby G.M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. **Int J Pharm**, v. 355(1–2), p.285–292, 2008.

Erhan B., Gunduzb, Üstunel S.H., Bardak A.N., Savas F., Iska G., Karakoyun Z. The Efficacy of Topical Glucosamine Sulfate-Chondroitin Sulfate in Knee Osteoarthritis Treated With Physical Therapy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Turk J Phys Med Rehab**, v. 58, p.194-98, 2012.

Escosteguy C.C. Tópicos Metodológicos e Estatísticos em Ensaio Clínicos Controlados Randomizados. **Arq Bras Cardiol**, v. 72(2), p. 139-143, 1999.

Eun H.C., Suh D.H. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize Test. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, p.77-91, 2000.

Fadeeva V.P., Tikhova V.D., Nikulicheva O.N. Elemental Analysis of Organic Compounds with the Use of Automated CHNS Analyzers . **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63(11), p. 1094-1106, 2008.

Farr J., Cole B., Dhawan A., Kercher J. Sherman S. Cartilage restoration: evolution and Overview. **Clin Ortho Relat Res.** v. 469(10), p.2696-2705, 2011.

Ferderber K., Hook S., Rades T. Phosphatidyl choline–based colloidal systems for dermal and transdermal drug delivery. **Journal of Liposome Research.** v. 19(4), p. 267–277, 2009.

Figen T., Ayşegül K., Nevin Ç., Esra A., Arzu E. Preparation and Evaluation of Topical Microemulsion System Containing Metronidazole for Remission in Rosacea. **Chem. Pharm. Bull.** v.60(5), p.583–592, 2012.

Fitzgerald G.A, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N Engl J Med**, v. 345, p. 433-442, 2001.

Friedman M.H., Andreu M.G., Quintana H.V., Mckenzie M. Ricinus communis, castor bean. **School of Forest Resources and Conservation, UF/IFAS Extension.** Four 244. Original publication date May 2010.

Gao Z., Fain H.D., Rapoport N. Ultrasound-enhanced tumor targeting of polymeric micellar drug carriers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, p. 317-330, 2004.

Garrido C.A., Sampaio T.C.F.V.S., Ferreira F.S. Comparative study between radiological classification and macro and microscopic analysis on osteoarthrotic lesions of the knee. **Rev Bras Ortop**, v. 46(2), p.155-159, 2011.

Garti N., Avrahami M., Aserin A. Improved solubilization of Celecoxib in U-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, p.352-365, 2006.

Gartner L.P., Hiatt J.L. Tratado de Histologia. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Gasco M.R. Microemulsions in the pharmaceutical field: perspectives and applications. In: Solans C, Kunieda H. **Industrial applications of microemulsions.** New York: Marcel Dekker. p.97-122, 1997.

Ghada M.H., Randa A., Abdel S., Samy E. Determination of Glucosamine and Carisoprodol in Pharmaceutical Formulations by LC with Pre-Column Derivatization and UV Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 307-315, 2012.

Gill H.S., Andrews S.N., Sakthivel S.K., Fedanov A., Williams I.R., Garber D.A., Priddy F.H., Yellin S., Feinberg M.B., Staprans S.I., Prausnitz M.R. Selective removal of stratum corneum by microdermabrasion to increase skin permeability. **Eur J Pharm.Sci**, v. 38(2), p.95-103, 2009.

Gobbi R.G., Demange M.K., Barreto R.B., Pécora J.R., Rezende M.U., Barros-Filho T.E.P., Lombello C.B. Transplante autólogo de condrócitos: Relato de 3 casos. **Rev Bras Ortop**, v. 45(4), p.449-56, 2010.

Gold G.E., McCauley T.R., Gray M.L., Disler D.G. What's new in cartilage? **Radiographics**, v. 23(5), p. 1227-1242, 2003.

Gomes-Neto M., Araujo A.D., Junqueira I.D.A., Diego Oliveira, Brasileiro A., Arcanjo F.L. Estudo comparativo da capacidade funcional e qualidade de vida entre idosos com osteoartrite de joelho obesos e não obesos. **Rer. Bras.Reumatol**, v.5 6(2), p. 126-130, 2016.

Goodwin W., McCabe D., Sauter E. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. **J Orthop Res**, v.28(8), p.1057–1063, 2010.

Goshen K.M., Kesselman E., Danino D., Magdassi S. Formation of celecoxib nanoparticles from volatile microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p.230-237, 2010.

Gou M., Wu L., Yin Q., Guo Q., Guo G., Liu J., Zhao X., Wei Y., Qian Z. Transdermal Anaesthesia with Lidocaine Nano-Formulation Pretreated with Low-Frequency Ultrasound in Rats Model. **J Nanosci Nanotechno**, v. 9(11), p. 6360-6365, 2009.

Gourevich D., Gerold B., Arditti F., Xu D., Liu D., Volovick A., Wang L. *et al.* Ultrasound activated nano-encapsulated targeted drug delivery and tumour cell poration. **Adv Exp Med Biol**, v. 733, p. 135-144. 2012.

Gudas R., Gudait A., Pocius A., Gudiene A., Emilis C., Monastyreckien E., Basevic A. Ten-Year Follow-up of a Prospective, Randomized Clinical Study of Mosaic Osteochondral Autologous Transplantation Versus Microfracture for the Treatment of Osteochondral Defects in the Knee Joint of Athletes. **The American Journal of Sports Medicine**, v.40(11), p. 2499-2508, 2012.

Gudas R., Stankevicius E., Monastyreckiene E., Pranys D., Kalesinskas R.J. Osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint in athletes. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 14(9), p.834-42, 2006.

Gurney A.B., Wascher D., Schenck R., Tennison A., Jaramillo B. Absorption of Hydrocortisone Acetate in Human Connective Tissue Using Phonophoresis. **Sports Health**, v. 3(4), p. 346-351, 2011. Doi:10.1177/1941738111405970

Guy R.H., Kalia Y.N., Delgado-Charro M.B., Merino V., Lopez A., Marro D. Iontophoresis: Electrorepulsion and electroosmosis. **J. Control. Release**. v. 64, p.129–132, 2000.

Habashi A.A., Sattari S., Pasutto F., Fakhreddin J. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Glucosamine in Rat Plasma. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 5(2), p.176-180, 2002.

Hammad Y.H., Hala R.M., Sobhy M.M. Clinical and biochemical study of the comparative efficacy of topical versus oral glucosamine/chondroitin sulfate on osteoarthritis of the knee. **The Egyptian Rheumatologist**, v. 37(2), p. 85–91, 2015.

Hangody L., Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85(2), p. 25-32, 2003.

Hangody L., Kárpáti Z. New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee. **Magy Traumatol Ortop Kezseb Plasztikai Seb**, v. 37(3), p. 237-43, 1994.

Hathou R.M., Woodman T.J. Applications of NMR in the characterization of pharmaceutical microemulsions. **Journal of Controlled Release**. v. 161, p.62-72, 2012.

Henrotin Y., Lambert C. Chondroitin and Glucosamine in the Management of Osteoarthritis. **Curr Rheumatol. Reports**, v. 15(10), p. 1-9, 2013.

Hernot S., Klibanov A.L. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev**, v. 60(10), p. 1153-1166., 2008.

Hessien M., Singh N., Kim C., Prouzet E. Stability and Tunability of O/W nano-emulsions prepared by phase inversion composition. **Langmuir**, v. 27(6), p. 2299-2307, 2011.

Doi: 10.1021/la104728r

Heyneman C.A., Lawless-Liday C., Wall G.C. Oral versus Topical NSAIDs in Rheumatic Diseases. **Drugs**. v. 60(3), p.555-74, 2000.

Hochberg M.C. American College of Rheumatology 2012. Recommendations for the Use of Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapies in Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. **Arthritis Care & Research**, v. 64(4), p. 465-474, 2012.

Hosmer J., Reed R., Bentley M.V.L.B, Nornoo A., Lopes L.B. Microemulsions containing medium-chain glycerides as transdermal delivery systems for hydrophilic and hydrophobic drugs. **AAPS PharmSciTech**, v.10, p. 589-596, 2009.

Hu L., Hu Q., Yang J. Enhancement of transdermal delivery of ibuprofen using microemulsion vehicle. **Iran J Basic Med Sci**, v. 17(10), p.760-766, 2014.

Huntley J.S., Bush P.G., McBirnie J.M., Simpson A.H., Hall A.C. Chondrocyte death associated with human femoral osteochondral harvest as performed for mosaicplasty. **J Bone Joint Surg Am**, v.87(2), p.351-360, 2005.

Husseini G.A., Diaz D., La Rosa M.A., Gabuji T., Zeng Y., Christensen D.A., Pitt W.G. Release of doxorubicin from unstabilized and stabilized micelles under the action of ultrasound. **J. Nanosci.Nanotechnol**, v. 7(3), p. 1028-1033, 2007.

Husseini G.A., Pitt W.G. Micelles and Nanoparticles for Ultrasonic Drug and Gene Delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 30;60(10), p. 1137-1152, 2008.

Husseini G.A., Runyan C.M., Pitt W.G. Investigating the mechanism of acoustically activated uptake of drugs from pluronic micelles. **BMC Cancer**, v. 30, p. 2-20, 2002. Doi:10.1186 / 1471-2407-2-20

Ibsen S., Benchimol M., Simberg D., Schutt C., Steiner J., Esener S. A novel nested liposome drug delivery vehicle capable of ultrasound triggered release of its payload. **J Control Release**, v. 155, p. 358-366, 2011.

Irsay L., Borda M.I., Nitu A.D., Ciortea V., Onac-Ungur R.. Effectiveness of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Combination in Patients with Primary Osteoarthritis. **Applied Medical Informatics**, v. 27(4), p.47-54, 2010.

Jahangir M., Khalid M., Ahmad E. Simultaneous Estimation of Glucosamine Sulfate and Chondroitin Sulfate Mixture. **Int. J. Res. Chem. Environ**, v. 5(1), p. 21-27, 2015.

Jain A., Mishra S.K., Vuddanda P.R., Singh S.K., Singh R., Singh S. Targeting of diacerein loaded lipid nanoparticles to intra-articular cartilage using chondroitin sulfate as homing carrier for treatment of osteoarthritis in rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.10, p.1031–1040, 2014.

Jaiswal M., Dudhe R., Sharma P.K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, p.123–127, 2015.

Jerosch J. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. **International Journal of Rheumatology**, Article ID 969012, p. 1-17, 2011. Doi:10.1155/2011/969012

Jevsevar D.S. The American Academy of Orthopaedic Surgeons Evidence-Based Guideline on Treatment of Osteoarthritis of the Knee, 2nd Edition. **J Bone Joint Surg**, v. 21(9), p. 571-576, 2013.

Jimenez S., Dodge G. The effects of glucosamine sulfate on human chondrocyte gene expression. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 5(SA) p. 72, 1997.

Johnson M., Mitragotri S., Patel A., Blankschtein D., Langer R. Synergistic effects of chemical enhancers and therapeutic ultrasound on transdermal drug delivery. **J Pharm Sci**, v. 85(7), p. 670-679, 1996.

Johnson V.L., Hunter, D.J. The epidemiology of osteoarthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.** v. 28, p. 5-15, 2014.

Jones D.G., Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. **J Bone Joint Surg Am.** v. 88(11), p. 2502-2520, 2006.

Julio U.F., Panissa V.L.G., Franchini E. Prediction of the one-repetition maximum based on the maximum number of repetitions with submaximal loads in women. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 13(5), p. 361-366, 2011. Doi:10.5007/1980-0037.2011v13n5p361

Junqueira L.C., Carneiro J. **Histologia Básica**, 11<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Junyapraserta V.B., Boonme P., Wurster D.E., Rades T. Aerosol OT Microemulsions as Carriers for Transdermal Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Local Anesthetics. **Drug Delivery**, v. 15, p. 323-330, 2008.

Kaestli L.Z., Wasilewski-Rasca A.F., Bonnabry P., Vogt-Ferrier N. Use of Transdermal Drug Formulations in the Elderly. **Drugs Aging**, v. 25(4), p. 269-280, 2008.

Kahan A., Uebelhart D., De Vathaire F., Delmas P.D., Reginste J.Y. Long-Term Effects of Chondroitins 4 and 6 Sulfate on Knee Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60(2), p. 524-533, 2009.

Kahlweit M, Stey R, Haase D, Kuneida H, Schmeling T, Faulhaber B, Borkovec M., et al. How to study microemulsions. **J Colloid Interface Sci**, v. 118(2), p. 436-53, 1987.

Kalaitzaki A., Pouloupoulou M., Xenakis A., Papadimitriou V. Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs. **Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 442 (1), p. 80-87, 2014.

Kalia, Y.N., Naik A., Garrison J., Guy R.H. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 56, p. 619-658, 2004.

Kang M.L., Ko J.Y., Kim J.E., Im G.I. Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 35, p. 9984-9994, 2014.

Katzer T., Chaves P., Bernardi A., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Beck R.C. Castor oil and mineral oil nanoemulsion: development and compatibility with a soft contact lens. **Pharm Dev Technol**, v. 19(2), p. 232-237, 2014.

Kaya K., Delialouglu S., Babadag M., Dülgerolu D., Özel S., Çulha C., Görgün S. Combined physiotherapy in patients with arthrogenous pain of temporomandibular joint. **J Phys Med Rehab Sci**, v. 13, p. 6-14, 2010.

Kessler M.W., Ackerman G., Dines J.S., Grande D. Emerging Technologies and fourth generation issues in cartilage repair. **Sports Med Arthrosc**, v. 16(4), p. 246-254, 2008.

Kielhorn J., Melching-Kollmu S., Mangelsdorf I. Environmental health criteria (EHC) 235: Dermal absorption. **Genebra: World Health Organization**, v. 102, p. 6-36, 2006.

Kim J., Xu M., Xo R. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18(3), p. 424-432, 2010.

Knutsen G., Drogset J.O., Engebretsen L., Grøntvedt T., Isaksen V., Ludvigsen T.C., Roberts S., et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. **J Bone Joint Surg Am.** v. 89(10), p. 2105-2112, 2007.

Kock L., Donkelaar C.C.V., Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. **Cell and Tissue Research**, v. 347(3), p. 613-627, 2012.

Koshiishi I., Horikoshi E., Imanari T. Quantification of Hyaluronan and Chondroitin/Dermatan Sulfates in the Tissue Sections on Glass Slides. **Analytical Biochemistry**, v. 267, p. 222-226, 1999.

Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54(1), p. 77-98, 2002.

Kulkarni S.K., Jain N.K., Singh A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 22(5), p. 291-298, 2000.

Kushner J., Blankschtein D., Langer R. Heterogeneity in skin treated with low-frequency ultrasound. **J Pharm Sci**, v. 97(10), p. 4119-4128, 2008.

Laan A.C., Denkova A.G. Cryogenic transmission electron microscopy: the technique of choice for the characterization of polymeric nanocarriers. **EJNMMI Research**, v. 7(44), p. 1-2, 2017. Doi:10.1186/s13550-017-0290-3

Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U.J., Luengo J., Weiss B., et al. Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 66, p. 159-164, 2007.

Lafon C., Somaglino L., Bouchoux G., Mari J.M., Chesnais S., Ngo J., Mestas J.L. et al. Feasibility study of cavitation-induced liposomal doxorubicin release in an AT2 Dunning rat tumor model. **Journal of Drug Targeting**, v. 20(8), p. 691-702, 2012.

Doi:10.3109/1061186X.2012.712129

LaPrade R.F., Botker J., Herzog M., Agel J. Refrigerated osteoarticular allografts to treat articular cartilage defects of the femoral condyles. A prospective outcomes study. **J Bone Joint Surg Am**, v. 91(4), p. 805-811, 2009.

Laroui H, Grossin L, Léonard M, Stoltz JF, Gillet P, Netter P, Dellacherie E. Hyaluronate-Covered Nanoparticles for the Therapeutic Targeting of Cartilage. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3879–3885, 2007.

Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as a novel drug delivery systems. **Adv. Drug. Deliv. Rev**, v. 45, p. 89-121, 2000.

Levine D., Millis D.L., Mynatt T. Effects of 3.3-MHz ultrasound on caudal thigh muscle temperature in dogs. **Vet Surg**, v. 30(2), p. 170-174, 2001.

Lin, H.Y., Thomas, J.L. PEG-Lipids and oligo(ethylene glycol) surfactants enhance the ultrasonic permeabilizability of liposomes. **Langmuir**, v. 19, p. 1098-1105, 2003.

Liu Z., Lammers T., Ehling J, Fokong S., Bornemann J., Kiessling F., Gätjens J. Iron oxide nanoparticle-containing microbubble composites as contrast agents for MR and ultrasound dual-modality imaging. **Biomaterials**, v. 32, p. 6155-6163, 2011.

Lopez R.F.V., Seto J.E., Blankschtein D. Langer R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32(3), p. 933-941, 2011.

Lee C.W., Li Z., Patel K., Olobo J.O., Lee E.J.D., Goh L.B. The Transdermal Profiles of Mediflex. Glucosamine Cream in Mouse and Man. **National Congress of Indonesian Society of Rheumatology**, Indonesia, 2005.

Lee M.H., Lin H.Y., Chen H.C., Thomas J.L. Ultrasound mediates the release of curcumin from microemulsions. **Langmuir**, v. 24, p. 1707-1713, 2008.

- Lee S., Choi K., Menon G., Kim H. J., Choi E.H., Ahn S.K., Lee S.H. Penetration pathways induced by low-frequency sonophoresis with physical and chemical enhancers: iron oxide nanoparticles versus lanthanum nitrates. **J Invest Dermatol**, v. 130, p. 1063-1072, 2010.
- Leeb R.F., Schweitzer H., Montag K., Smolen J.S. A meta-analysis of chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. **J Rheumatol**, v. 27(1), p. 205-211, 2000.
- Leite C.B.S., Coelho J.M., Muehlmann L.A., Azevedo R.B., Sousa M.H. Skin Delivery of Glucosamine and Chondroitin Sulphates: A Perspective on the Conservative Treatment for Osteoarthritis of the Knee. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 5, p. 11-20, 2017. Doi.org/10.4236/jbm.2017.54002
- Leite C.B.S., Coelho J.M., Muehlmann L.A., Azevedo R.B., Sousa M.H. Microemulsions as Platforms for Transdermal Delivery of Hydrophilic Drugs - A Review. **Current Nanoscience**, v. 14, p. 1-9, 2018. Doi:10.2174/1573413714666171218145416
- Leite, C.B.S., Santos, W., Maia L. Transdermal administration strategies of drugs in dermatological functional physiotherapy. **Fisioterapia Ser**, v. 7(4), p. 235-240, 2012.
- Loeser R.F. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17(8), p. 971–979, 2009.
- Loeser R.F., Collins J.A., Diekmann B.O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12(7), p. 412-420, 2016. Doi:10.1038/nrrheum.2016.65.
- Loeser R.F., Goldring S.R., Scanzello C.R., Goldring M.B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis Rheum**, v. 64(6), p.1697–1707, 2012.
- Lories R.J. e Luyten F.P. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7(1), p. 43-49, 2011.
- Losina E., Weinstein A.M., Reichmann W.M., Burbine S.A., Solomon D.H., Daigle M.E., Rome B.N., *et al.* Lifetime risk and age at diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. **Arthritis Care Res**, v. 65, p.703-711, 2013.
- Mackey A., Gass S. Common data collection measures. In Second language research: methodology and design. **Lawrence Erlbaum Associates Inc. Publishers**, Mahwah-New Jersey, p. 43-99, 2005.
- Mads K. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54(1), p. S77-S98, 2002.
- Maestro A., Solé I., González C., Solans C. Gutiérrez, J.M. Influence of the phase behavior on the properties of ionic nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method. **J Colloid Interface Sci**, v. 327, p. 433-439, 2008.
- Mahboobiana M.M., Seyfoddinb A., Rupenthalc I.D., Aboofazelia R. Foroutana S.M. Formulation Development and Evaluation of the Therapeutic Efficacy of Brinzolamide Containing Nanoemulsions. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16(3), p. 847-857, 2017.



Malavolta E.A., Demange M.K., Gobbi R.G., Imamura M., Fregni F. Randomized controlled clinical trials in orthopedics: difficulties and limitations. **Rev Bras Ortop**, v. 46(4), p. 452-459, 2011.

Marcacci M., Kon E., Delcogliano M., Filardo G., Busacca M., Zaffagnini S. Arthroscopic autologous osteochondral grafting for cartilage defects of the knee: prospective study results at a minimum 7-year follow-up. **Am J Sports Med**, v. 35(12), p. 2014-2021, 2007.

Marin A., Sun H., Hussein G.A., Pitt W.G., Christensen D.A., Rapoport N.Y. Drug delivery in Pluronic micelles: effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. **J Control Release**, v. 84, p. 39-47, 2002.

Maruno M., Rocha-Filho P.A. O/W Nano-emulsion after 15 Years of Preparation: A Suitable Vehicle for Pharmaceutical and Cosmetic Applications. **J. Dispers. Sci Technol**, v. 31, p. 17-22, 2010.

Martin J.A., Buckwalter J.A. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. **Iowa Orthop J**. v. 21, p. 1-7, 2001.

Martini E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. Dissertação (mestrado). **Universidade do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre-RS, 2005.

Masmoudi H., Le Dréau Y., Piccerelle P., Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **Int. J. Pharm**, v. 289, p. 117-131, 2005.

Matsaridou I., Barmapalexis P., Salis A., Nikolakakis L. The Influence of Surfactant HLB and Oil/Surfactant Ratio on the Formation and Properties of Self-emulsifying Pellets and Microemulsion Reconstitution. **AAPS PharmSciTech**, v. 13(4), p. 1319-1330, 2012.

Doi: 10.1208/s12249-012-9855-7

McAlindon T.E., La Valley M.P., Gulin J.P., Felson D.T. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. **JAMA**, v. 283(11), p. 1469-1475, 2000.

McAlindon T.E., Underwood M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee Osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, p. 363-388, 2014.

McCauley T.R., Kornaat P.R., Jee W.H. Central osteophytes in the knee: prevalence and association with cartilage defects on MR imaging. **AJR Am J Roentgenol**, v. 176(2), p. 359-364, 2001.

McConnell S., Kolopack P., Davis A.M. The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. **Arthritis Rheum**, v. 45, p. 453-461, 2001. Doi:10.1002/1529-0131(200110)

McCormick F., Yanke A., Provencher M.T., Cole B.J. Minced articular cartilage basic science, surgical technique, and clinical application. **Sports Med Arthrosc**, v. 16(4), p. 217-220, 2008.

McCulloch P.C., Kang R.W., Sobhy M.H., Hayden J.K., Cole B.J. Prospective evaluation of prolonged fresh osteochondral allograft transplantation of the femoral condyle: minimum 2-year follow-up. **Am J Sports Med**, v. 35(3), p. 411-420, 2007.

McNeill S.C., Potts R.O., Francoeur M.L. Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: does it truly exist? **PharmRes**, v. 9(11), p. 1422-1427, 1992.

Meereis E.C.W., Mota C.B.; Silva A.D.; Schmidt A. Força Muscular de Membros Inferiores: Uma Revisão Sistemática sobre Métodos de Avaliação Utilizados na Fisioterapia. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17(4), p. 401-406, 2013.

Meidan V., Docker M., Walmsley A., Irwin W.. Phonophoresis of hydrocortisone with enhancers: an acoustically defined model. *Int J Pharm.* 170(2):157–168, 1998.

Meshali M., Abdel-Aleem H., Sakr F., Nazzal S., El-Malah Y. Effect of gel composition and phonophoresis on the transdermal delivery of ibuprofen: in vitro and in vivo evaluation. **Pharm Dev Technol**, v. 16, p. 93-101, 2011.

Meshali M., Abdel-Aleem H.M., Sakr F.M., Nazzal S., El-Malah Y. In vitro phonophoresis: effect of ultrasound intensity and mode at high frequency on NSAIDs transport across cellulose and rabbit skin membranes. **Pharmazie**, v. 63(1), p. 49-53, 2008.

Mesquita D.R., Albuquerque Junior C.F., Akerman J.P., Pedro Castro A.M. Transplante autólogo de condrocitos em lesões cartilaginosas do joelho. **Revista Científica do HCE**, v. (3)2, p. 49-53, 2007.

Merino G, Kalia Y, Delgado-Charro M, Potts R, Guy R. Frequency and thermal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. **J Control Release**, v. 88(1), p. 85-94, 2003.

Messier S.P., Legault C., Loeser R.F., Van Arsdale S.J., Davis C., Ettinger W.H., DeVita P. Does high weight loss in older adults with knee osteoarthritis affect bone-on-bone joint loads and muscle forces during walking? **Osteoarthritis Cartilage**, v. 19(3), p. 272-280, 2011.  
Doi:10.1016/j.joca.2010.11.010.

Mikulak S.A., Vangsness C.T., Nimni M.E. Transdermal delivery and accumulation of in domethacin in subcutaneous tissues in rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 50(2), p. 153-158, 1998.

Mitchell M.E., Kidd D., Lotto M.L., Lorang D.M., Dupree D.M., Wright E.J., Lubowitz J.H. Determination of factors influencing tissue effect of thermal chondroplasty: an ex vivo investigation. **Arthroscopy**, v. 22(4), p. 351-355, 2006.

Mithoefer K., Steadman J.R. The microfracture technique. **Tech Knee Surg**, v. 5(3), p. 140-148, 2006. Doi:10.1097/01.btk.0000233808.69433.c2

Monzer F. Reprint of "Properties of microemulsions with mixed nonionic surfactants and citrus oil". **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 382, p. 226-231, 2011.

- Moreira M., Afonso M., Araújo P. Anti-inflamatórios não esteroides tópicos no tratamento da dor por osteoartrose do joelho – Uma revisão baseada na evidência. **Rev Port Med Geral Fam**, v. 30, p. 102-108, 2014.
- Morey T.E., Modell J.H., Shekhawatt D., Shah D.O., Klatt B., Thomas G.P., Kero F.A., Booth M.M., Dennis D.M. Anesthetic properties of a propofol microemulsion in dogs. **Anesth.Analg**, v. 103, p. 882-887, 2006. Doi:10.1213/01.ane.0000237126.57445.80
- Moshiri M., Hamid F., Etemad L.. Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. **Rep Biochem Mol Biol**, v. 4(2), p. 60–65, 2016.
- Muehlmann L.M., Rodrigues M.C., Longo J.P.F., Garcia M.P., Py-Daniel K.R., Veloso A.B., Souza P.E.N, Silva S.W., Azevedo R.B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13(36), p. 1-11, 2015. Doi:10.1186/s12951-015-0095-3
- Mueller M.B., Tuan R.S. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. **PM R**, v. 3(6-1), p. 3-11, 2011. Doi:10.1016/j.pmrj.2011.05.009
- Muglia V.F., Simão M.N., Elias Júnior J., Trad C.S. Erros comuns de interpretação de RMN de joelho: como reconhecê-los e evitá-los. **Radiol Bras**, v. 34(3), p. 161-166, 2001.
- Musumeci G., Castrogiovanni P., Leonardi R., Trovato F.M., Szychlinska M.A., Di-Giunta A., Loreto C., Castorina S. New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. **World J Orthop**, v. 5(2), p. 80–88, 2014.
- Myhr G., Moan J. Synergistic and tumour selective effects of chemotherapy and ultrasound treatment. **Cancer Letters**, v. 232, p. 206-213, 2006. Doi:org/10.1016/j.canlet.2005.02.020
- Nehrer S., Minas T. Treatment of articular cartilage defects. **Invest Radiol**, v. 35(10), p. 639-646, 2000.
- Nelson J.L., Roeder B.L., Carmen J.C., Roloff F., Pitt W.G. Ultrasonically Activated Chemotherapeutic Drug Delivery in a Rat Model. **Cancer Research**, v. 62, p. 7280-7283, 2002
- Ngo M.A., Maibach H.I. Dermatotoxicology: historical perspective and advances. **Toxicol.Appl.Pharmacol**, v. 243, p. 225-238, 2009.
- Ogura M., Paliwal S., Mitragotri S. Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60(10), p. 1218–1223, 2008.
- Oliveira A.G., Scarpa M.V., Correa M.A., Cera L.F.R., Formariz T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím Nova**, v. 27(1), p. 131-138, 2004.
- Oliveira A.G.L., Silva R.S., Alves E.N., Presgrave R.F., Presgrave O.A.F., Delgado I.F. Ensaio da membrana córneo-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71(1), p.153-159, 2012.

O'Neill L.A. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5(7), p. 549-563, 2006.

Onigbinde A.T., Adesina O.D., Tarimo N., Ojoawo A. Comparative effects of a single treatment session using glucosamine sulphate and methyl salicylate on pain and hamstring flexibility of patients with knee osteoarthritis. **American J.of Health Research**, v. 2(5-1), p. 40-44, 2014.

Onigbinde A.T., Talabi A.E., Okulaja I.A., Dominic O. Comparative efficacy of cycle-ergometry exercise and glucosamine sulphate iontophoresis in pain management of subjects with sub-acute knee osteoarthritis. **Medicina Sportiv**, v. 3(1), p. 1517-5121, 2011.

Osborne D.W., Ward A.J., O'Neill K.J. Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 43, p. 450-454, 1991.

Outerbridge R.E. The etiology of chondromalacia patellae. **J Bone Joint Surg**, v. 43(B), p. 752-757, 1961.

Paliwal S., Menon G., Mitragotri S. Low-frequency sonophoresis: ultrastructural basis for stratum corneum permeability assessed using quantum dots. **J Invest Dermatol**, v. 126(5), p. 1095-1101, 2006.

Paes A.T. Itens essenciais em bioestatística. **Arq Bras Cardiol**, v. 71(4), p. 575-580, 1998.

Pedersen C., Slepkin A., Andersson S.B.E., Fagerberg J.H., Bergström C.A.S., Peterson E.M. Formulation of the Microbicide INP0341 for In Vivo Protection against a Vaginal Challenge by Chlamydia trachomatis. **Plos One**, v. 9(10), p. 1-12, 2014.

Doi:10.1371/journal.pone.0110918.g001

Pellanda C. Topical bioavailability of triamcinolone acetonide: effect of dose and application frequency. **Archives of dermatological**, v. 29, p. 221-230, 2006.

Pengfei J. Simultaneous determination of chondroitin sulfate sodium, allantoin and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical eye drops by an ion-pair high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 293-297, 2009.

Pereira G.G. Obtenção de nenoemulsões O/A à base de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fofoprotetor das emulsões. Tese (mestrado), **Universidade de São Paulo – USP**, Ribeirão Preto, 2008.

Pereira H.L.A., Ribeiro S.L.E., Ciconelli R.M. Tratamento com Antiinflamatórios Tópicos na Osteoartrite de Joelho. **Rev Bras Reumatol**, v. 46(3), p. 188-193, 2006.

Pereira T.A., Guerreiro C.M., Maruno M., Ferrari M., Rocha-Filho P.A. Exotic Vegetable Oils for Cosmetic O/W Nanoemulsions: In Vivo Evaluation. **Molecules**, v. 21(248), p. 1-16, 2016.

Doi:10.3390/molecules21030248

Periyasamy P.C., Leijten J.C.H., Dijkstra P.J., Karperien M., Post J.N. Nanomaterials for the Local and Targeted Delivery of Osteoarthritis Drugs. **Journal of Nanomaterials**, Article ID 673968, p. 1-13, 2012.

Peterson L., Minas T., Brittberg M., Nilsson A., Sjögren-Jansson E., Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. **Clin Orthop Relat Res**, v. 374, p. 212-234, 2000.

Pitt W.G., Hussein G.A., Staples B.J. Ultrasonic Drug Delivery – A General Review. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 1(1), p. 37-56, 2004.

Polat B.E., Blankschtein D., Langer R. Low-Frequency Sonophoresis: Application to the Transdermal Delivery of Macromolecules and Hydrophilic Drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7(12), p. 1415–1432, 2010.

Polat, B.E., Hart, D., Langer, R. Blankschtein, D. Ultrasound-Mediated Transdermal Drug Delivery: Mechanisms, Scope, and Emerging Trends. **J. Control. Release**, v. 152, p. 330-348, 2011.

Polat B.E., Seto J.E., Blankschtein D., Langer R. Application of the aqueous porous pathway model to quantify the effect of sodium lauryl sulfate on ultrasound-induced skin structural perturbation. **J Pharm Sci**, v. 100(4), p. 1387-1397, 2011. Doi:10.1002/jps.22361

Pong M., Umchid S., Guarino A.J., Lewin P.A., Litniewski J., Nowicki A., Wrenn S.P. In vitro ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. **Ultrasonics**, v. 45, p. 133-145, 2006.

Pontarolo P.R.R., Correr C.J. Determinação espectroscópica multivariada de Glucosamina e Condroitina em formulações farmacêuticas. **Quim. Nova**, v. 31(6), p. 1285-1289, 2008.

Prasert W., Gohtani S. Effect of temperature on low-energy nanoemulsification and phase behavior in water/polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester (Tweens) /vegetable oil systems. **J Food Eng**, v. 180, p. 101–109, 2016.

Prato M., Magnetto C., Jose J., Khadjavi A., Cavallo F., Quaglino E., Panariti A., *et al.* 2H,3H-Decafluoropentane-Based Nanodroplets: New Perspectives for Oxygen Delivery to Hypoxic Cutaneous Tissues. **PLoS ONE**, v. 10(3), p. 1-20, 2015.  
Doi:10.1371/journal.pone.0119769

Prieto-Alhambra D., Judge A., Javaid K., Cooper C., Diez-Perez A., Arden N.K. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. **Ann. Rheum. Dis**, v. 73, p. 1659–1664, 2014.

Provenza J.R., Shinjo S.K., Silva J.M., Peron C.R.G.S., Rocha F.A.C. Combined glucosamine and chondroitin sulfate, once or three times daily, provides clinically relevant analgesia in knee osteoarthritis. **Clin Rheumatol**, v. 34(8), p. 1455-1462, 2015.  
Doi:10.1007/s10067-014-2757-1.

Rachmawati H., Novel M.A., Ayu S., Berlian G., Tandrasasmita O.M., Tjandrawinata R.R., Anggadiredja K. The In Vitro-In Vivo Safety Confirmation of PEG-40 Hydrogenated

Castor Oil as a Surfactant for Oral Nanoemulsion Formulation. **Sci Pharm**, v. 85(18), p.1-10, 2017. Doi:10.3390/scipharm85020018.

Raeissadat S.A., Rayegani S.M., Forogh B., Abadi P.H., Moridnia M., Dehgolan S.R. Intra-articular ozone or hyaluronic acid injection: Which one is superior in patients with knee osteoarthritis? A 6-month randomized clinical trial. **J Pain Res**, v.11, p. 111-117, 2018. Doi:10.2147/JPR.S142755

Rand T., Brossmann J., Pedowitz R., Ahn J.M., Haghigi P., Resnick D. Analysis of patellar cartilage. Comparison of conventional MR imaging and MR and CT arthrography in cadavers. **Acta Radiol**, v. 41(5), p. 492-497, 2000.

Rangsimawong W., Opanasopit P., Rojanarata T., Ngawhirunpat T. Mechanistic study of decreased skin penetration using a combination of sonophoresis with sodium fluorescein-loaded PEGylated liposomes with d-limonene. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7413-7423, 2015. [Doi.org/10.2147/IJN.S96831](https://doi.org/10.2147/IJN.S96831)

Rao R., Nanda S. Sonophoresis: recent advancements and future trends. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 689-705, 2009. Doi:10.1211/jpp.61.06.0001

Rapoport N.Y., Gao Z., Kennedy A. Multifunctional Nanoparticles for Combining Ultrasonic Tumor Imaging and Targeted Chemotherapy. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, p. 1095-1106, 2007.

Rapoport N.Y., Kennedy A.M., Shea J.E., Scaife C.L., Nam K.H. Ultrasonic nanotherapy of pancreatic cancer: lessons from ultrasound imaging. **Mol Pharm**, v. 7(1), p. 22-31, 2010. Doi:10.1021/mp900128x.

Rapoport N.Y., Nam K.H., Gupta R., Gao Z., Mohan P., Payne A., Todd N., *et al.* Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. **J Control Release**, v. 153, p. 4-15, 2011.

Rehman M., Madni A., Ihsan A., Khan W.S., Khan M.I., Mahmood M.A., Ashfaq M., Bajwa S.Z., Shakir I. Solid and liquid lipid-based binary solid lipid nanoparticles of diacerein: in vitro evaluation of sustained release, simultaneous loading of gold nanoparticles, and potential thermoresponsive behavior. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2805-2814, 2015.

Reis A.V., Cavalcanti O.A., Rubira A.F., Muniz E.C. Synthesis and characterization of hydrogels formed from a glycidyl methacrylate derivative of galactomannan. **Int.J.Pharm**, v. 267(1-2), p.13-25, 2003. Doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.08.001

Rezende M.U., Gobbi R.G. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Rev.Bras.Ortop**, v. 44(1), p. 14-9, 2009.

Richardson E.S., Pitt W.G., Woodbury D.J. The Role of Cavitation in Liposome Formation. **Biophysical Journal**, v. 93, p. 4100-4107, 2007. Doi:10.1529/biophysj.107.104042

Richy F., Bruyere O., Ethgen O., Cucherat M., Henrotin Y., Reginster J.Y. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. **Arch Intern Med**, v.163(13), p.1514-1522, 2003.

Rippke F., Schreiner V., Schwanitz H.J. The acidic milieu of the horny layer: New findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. **Am J Clin Dermatol**, v. 3, p. 261-272, 2002.

Rodriguez-Devora J.I., Ambure S., Shi Z.D, Yuan Y., Sun W., Xu T. Physically facilitating drug-delivery systems. **Ther Deliv**, v. 3(1), p. 125-139, 2012. Doi:10.4155/tde.11.137

Rodrigues M.B., Camanho G.L. A avaliação da cartilagem do joelho pela Ressonância Magnética. **Rev Bras Ortop**, v. 45(4), p. 340-346, 2010.

Rodrigues T.A., Alexandrino R.A., Kanczuk M.E., Gozzani J.L., Mathias L.A.S.T. Estudo Comparativo entre Propofol em Nanoemulsão não Lipídica com Solutol e em Emulsão com Lecitina. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 62(3), p. 325-334, 2012.

Rolf C., Engström B., Beauchard C., Jacobs L.D., Le Liboux A. Intra-articular absorption and distribution of ketoprofen after topical plaster application and oral intake in 100 patients undergoing knee arthroscopy. **Rheumatology (Oxford)**, v. 38(6), p. 564-567, 1999.

Roland I., Piel G., Delattre L., Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263(1-2), p. 85-94, 2003. Doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00364-8

Rosani L. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo O/A com óleos vegetais. Dissertação (mestrado). **Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos-SP, 2011.

Rosneck J., Higuera C.A., Tadross N., Krebs V., Barsoum W.K. Managing knee steoarthritis before and after arthroplasty. **Cleve Clin J Med**, v. 74(9), 663-671, 2007.

Ross M.H., Wojciech P. Histologia: Texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. **Toxicol Sci**, v. 91(1), p. 159-165, 2006.

Sacchetti C., Liu-Bryan R., Magrini A., Rosato N., Bottini N., Bottini M. Polyethylene-Glycol-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes for Intra-Articular Delivery to Chondrocytes. **ACS Nano**, v. 12(8), 12280-12291, 2014.

Saliba S., Mistry D.J., Perrin D.H., Gieck J., Weltman A. Phonophoresis and the Absorption of Dexamethasone in the Presence of an Occlusive Dressing. **Journal of Athletic Training**, v. 42(3), p. 349-354, 2007.

Samarasinghe R.M., Kanwar R.K., Kanwar J.R. The effect of oral administration of iron saturated-bovine lactoferrin encapsulated chitosan-nanocarriers on osteoarthritis. **Biomaterials**, v. 35, p. 7522-7534, 2014.

Santos J.P.M., Andraus R.A.C., Pires-Oliveira D.A.A., Fernandes M.T.P., Frâncica M.C., Poli-Frederico R.C., Fernandes K.B.P. Analysis of functional status of elderly with osteoarthritis. **Fisioter Pesq**, v. 22(2), p. 161-168, 2015. Doi:10.590/1809-950/13922922022015

Santos G.E.O. *Cálculo amostral*: calculadora on-line. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: [08/02/2018].

Saris D.B., Vanlauwe J., Victor J., Almqvist K.F., Verdonk R., Bellemans J., Luyten F.P. Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. **Am J Sports Med**, v. 37(1), p. 10-19, 2009.

Sato M.E.O., Gomara F., Pontarolo R., Andrezza I.F., Zaroni M. Permeação cutânea in vitro do ácido fólico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43(2), p. 195-203, 2007.

Schaffazick S.R., Guterres S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim.Nova**, v. 26(5), p. 726-737, 2003.

Schmidts T., Marquardt K., Schlupp P., Dobler D., Heinz F., Mäder U., Garn H., et al. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNazymes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, p. 61-69, 2012.

Serban O., Porojan M., Deac M., Cozma F., Solomon C., Lenghel M., Micu M., et al. Pain in bilateral knee osteoarthritis – correlations between clinical examination, radiological, and ultrasonographical findings. **Med Ultrason**, v. 18(3), p. 318-325, 2016.

Doi:10.11152/mu.2013.2066.183.pin

Servaty R., Schiller J., Binder H., Arnold K. Hydration of polymeric components of cartilage: an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. **Int J Biol Macromol**, v. 28(2), p. 121-127, 2001.

Seto J.E, Polat B.E., Lopez R.F.V, Blankschtein D., Langer R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. **J Control Release**, v. 145, p. 26-32, 2010.

Seth P.L. Percutaneous absorption of ibuprofen from different formulations: comparative study with gel, hydrophilic ointment and emulsion cream. **Arzneimittelforschung**, v. 43(8), p. 919-921, 1993.

Setnikar I., Cereda R., Pacini M.A., Revel L. Antireactive properties of glucosamine sulfate. **Arzneimittel-Forschung**, v. 41(2), p.157-161, 1991.

Setnikar I., Giachetti C., Zanolo G. Absorption, distribution and excretion of radioactivity after a single intravenous or oral administration of glucosamine to the rat. **Pharmatherapeutica**, v. 3(8), p. 538-550, 1984.

Schlicher R.K., Radhakrishna H., Tolentino T.P., Apkarian R.P., Zarnitsyn V., Prausnitz M.R. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 32, p. 915- 924, 2006.



- Schroeder A., Avnir Y., Weisman S., Najajreh Y., Gabizon A., Talmon Y., Kost J., *et al.* Controlling liposomal drug release with low frequency ultrasound: mechanism and feasibility. **Langmuir**, v. 23(7), p. 4019-4025, 2007.
- Schroeder A., Honen R., Turjeman K., Gabizon A., Kost J., Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. **J Control Release**, v. 137, p. 63-68, 2009.
- Schroeder A., Kost J., Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 162, p. 1-16, 2009.
- Shah V.P.; Elkins J.S.; Willaims R.L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs from topical dermatological drug products. **Pham.Develop. Technol**, v. (4)3, p. 377-385, 1999. Doi:10.1081/PDT-100101373
- Sharma D., Hanes M., Yahya A., Mohamed M. Phonophoresis with diclofenac versus ketoprofen for knee joint injuries. **Middle East J. Int. Med**, v. 2, p. 9-12, 2009.
- Shiran M., Motevalian M., Ravanfar R., Bohlouli S. The effect of bubble surface charge on phonophoresis: implications in transdermal piroxicam delivery. **Iran J. Pharm. Ther**, v. 7(1), p. 15-19, 2008.
- Skauen D.M.; Zentner G.M. Phonophoresis. **Int. J. Pharm**, v. 20, p. 235-245, 1984.
- Silva A., Serrão P.R.M.S., Driusso P., Mattiello S.M. The effects of therapeutic exercise on the balance of women with knee osteoarthritis: a systematic review. **Rev Bras Fisioter**, v. 16(1), p. 1-9, 2012.
- Silva J.A., Apolinário A.C., Souza M.S.R., Damasceno B.P.G.L., Medeiros A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev.Ciênc.Farm.Básica**, v. 31(3), p. 125-131, 2010.
- Silva J.A., Bedor D.G.C., Damasceno B.P.G.L, Oliveira A.G., Egito E.S.T., Santana D.P. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **J.Dispers.Sci.Technol**, v. 31(1), p. 1-8, 2010.
- Silva V.R.L, Almeida M.M., Fradin A., Grice J.E., Roberts M.S. Delivery of drugs applied topically to the skin. **Expert Rev. Dermatol**, v. 7(4), p. 382-397, 2012.
- Silveira F., Barja P., Acosta-Avalos D. Photoacoustic evaluation of the penetration of piroxicam gel applied with phonophoresis into human skin. **J. Phys. Conf. Ser**, v. 214(1), p. 1-5, 2010.
- Silveira P.C.L., Victor E.G., Notoya F.S., Scheffer D.L., Silva L., Cantu R.B., Martinez V.H.C., Pinho R.A., Paula M.M.S. Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. **Drug Deliv**, v. 23(3), p. 916-922, 2016. Doi:10.3109/10717544.2014.923063
- Simonin J. On the Mechanisms of in Vitro and in Vivo Phonophoresis. **J. Control. Release**, v. 33, p. 125-141, 1995.

- Singh P., Roberts M.S. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268(1), p. 144-151, 1994.
- Sintov A.C., Brandys-Sitton R. Facilitated skin penetration of lidocaine: Combination of a short-term iontophoresis and microemulsion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, p. 58-67, 2006.
- Sintov A.C., Shapiro L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **J. Control.Release**, v. 95, p. 173-183, 2004.
- Sioufi A., Pommier F., Boschet F., Godbillon J., Lavoignat D., Salliere D. Percutaneous absorption of diclofenac in healthy volunteers after single and repeated topical application of diclofenac Emulgel. **Biopharm Drug Dispos**, v.15(6), p. 441-449, 1994.
- Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Celma M.J.G. Nano-emulsions. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci**, v. 10, p. 102-110, 2005.
- Sousa N.L., Cabral G.B., Vieira P.M., Baldoni A.B., Aragão F.J.L. Bio-detoxification of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. **Scientific Reports**, v. 7(15385), p. 1-9, 2017. Doi:10.1038/s41598-017-15636-7
- Spahn G., Kahl E., Mückley T., Hofmann G.O., Klinger H.M. Arthroscopic knee chondroplasty using a bipolar radiofrequency-based device compared to mechanical shaver: results of a prospective, randomized, controlled study. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 16(6), p. 565-573, 2008.
- Spierings E., Brevard J., Katz N. Two-minute skin anesthesia through ultrasound pretreatment and iontophoretic delivery of a topical anesthetic: a feasibility study. **Pain Med**, v. 9, p. 55-59, 2008.
- Sütő B., Berkó S., Kozma G., Kukovecz Á., Budai-Szűcs M., Erős G., Kemény L., Sztojkov-Ivanov A., Gáspár R., Csányi E. Development of ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier-based gels: characterization and investigation of in vitro and in vivo penetration through the skin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1201-1212, 2016.
- Tadros T.F.; Izquierdo P.; Esquena J.; Solans C. Formation and Stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108(109), p. 303-318, 2004.
- Talekar M., Kendall J., Denny W., Garg S. Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics. **Anti-Cancer Drugs**, v. 22(10), p. 949-962, 2011.
- Tamer T.M. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. **Interdiscip Toxicol**, v. 6(3), p. 111-125, 2013.
- Tang L.L., Liu H., Wang Y.L, Xian C.Y., Su A.H. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57(2), p. 215-218, 2007. Doi:10.1016/j.colsurfb.2007.02.009
- Taylor P. Ostwald Ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75(2), p. 107-163, 1998. Doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00035-9

Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 16, 461-521, 1999.

Tezel A., Sens A., Tuchscherer J., Mitragotri S. Frequency dependence of Sonophoresis. **Pharm. Res**, v. 18, p. 1694-1700, 2001.

Thomas B.J., Finnin B.C. The transdermal revolution. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 697-703, 2004.

Tirnaksiz F., Kayış A., Çelebi N., Adışen E., Erel A. Preparation and Evaluation of Topical Microemulsion System Containing Metronidazole for Remission in Rosacea. **Chem. Pharm. Bull.** v. 60(5), p. 583-592, 2012.

Toffoletto O., Tavares A., Casarini D.E., Redublo B.M., Ribeiro A.B. Farmacocinética da associação de Glucosamina e Sulfato de Condroitina em humanos sadios do sexo masculino. **Acta Ortop Bras**, v. 13(5), p. 235-237, 2005.

Towheed T.E., Maxwell L., Anastassiades T.P., Shea B., Houpt J., Robinson V., Hochberg M.C., Wells G. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 18(2), p.1-86, 2005. Doi:10.1002/14651858.CD002946.pub2

Trommer H., Neubert R.H.H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 19, p. 106-121, 2006.

Trotta M., Gasco M.R., Morel S. Release of drugs from oil-water microemulsions. **J Controlled Release**, v. 10(3), p. 237-43, 1989.

Tsai M.J., Fu Y.S., Lin Y.H., Huang Y.B., Wu P.C. The Effect of Nanoemulsion as a Carrier of Hydrophilic Compound for Transdermal Delivery. **Plos One**, v. 9(7), p. 1-7, 2014. Doi:10.1371/journal.pone.0102850

Tsai Y.H., Chang J.T., Chang J.S., Huang C.T., Huang Y.B., Wu P.C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **J Pharm Sci**, v. 100, p. 2358-2365, 2011.

Ueda H., Mutoh M., Seki T., Kobayashi D., Morimoto Y. Acoustic cavitation as an enhancing mechanism of low-frequency sonophoresis for transdermal drug delivery. **Biol Pharm Bull**, v. 32, p. 916-920, 2009.

Ulstein S., Aroen A., Rotterud J.H., Loken S., Engebretsen L., Heir S. Microfracture technique versus osteochondral autologous transplantation mosaicplasty in patients with articular chondral lesions of the knee: a prospective randomized trial with long-term follow-up. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 22, p. 1207-1215, 2014.

Vandamme T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Prog Retin Eye Res**, v. 21, p. 15-34, 2002.

Velosa A.P.P., Teodoro W.R., Yoshinari N.H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Rev Bras Reumatologia**, v. 43, 160-66, 2003.

Victor E.G., Silveira P.C.L, Possato J.C., Rosa G.L., Munari U.B., Souza C.T., Pinho R.A., *et al.* Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10(11), p. 1-9, 2012.

Vinardell M.P., Mitjans M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. **Toxicol in Vitro**, v. 20(6), p.1066-1070, 2006.

Vyas S.P., Singh R., Asati R.K. Liposomally encapsulated diclofenac for sonophoresis induced systemic delivery. **J Microencapsul**, v. 12, p. 149-154, 1995.

Yilmaz E., Borchert H.H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 60(1), p. 91-98, 2005.

Watkinson A.C., Bunge A.L., Hadgraft J., Majella E.L. Nanoparticles Do Not Penetrate Human Skin—A Theoretical Perspective. **Pharm Res**, v. 30(8), p. 1943-1946, 2013.

Doi:10.1007/s11095-013-1073-9

Wei W., Zheng-zhong B., Yong-jie W., Qing-wu Z., Ya-lin M. Bioeffects of low-frequency ultrasonic gene delivery and safety on cell membrane permeability control. **J. Ultrasound Med**, v. 23(12), p. 1569-1582, 2004. Doi:10.7863/jum.2004.23.12.1569

Weiss J., Coupland J.N., McClements D.J. Solubilization of hydrocarbon emulsion droplets suspended in non- ionic surfactant micelle solutions. **J. Phys. Chem**, v. 100, p. 1066–1071, 1996.

Whitmire R.E., Wilson D.S., Singh A., Levenston M.E., Murthy N., García A.J. Self-assembling nanoparticles for intra-articular delivery of anti-inflammatory proteins.

**Biomaterials**, v. 33, p. 7665-7675, 2012.

Williams A.C, Barry B.W. Penetration enhancers. **Adv Drug.Deliv Rev**, v. 56(15), p. 603-618, 2004. Doi:10.1016/j.addr.2003.10.025

Willians D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29(20), p. 2941-2953, 2008. Doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023

Wilson N., Sanchez-Riera L., Morros R., Diez-Perez A., Javaid M.K., Cooper C., Arden N.K., Prieto-Alhambra D. .Drug utilization in patients with OA: a population-based study. **Rheumatology**, v. 54, p. 860-867, 2015.

Wojdasiewicz P., Poniatowski Ł.A., Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators Inflamm**. Artigo ID 561459, p.1-19, 2014.

Wu H., Ramachandran C., Weiner N.D., Roessler B.J. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p. 63-75, 2001.

Wu J., Chappelow J., Yang J., Weimann L. Defects generated in human stratum corneum specimens by ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 24(5), p. 705-710, 1998. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629\(98\)00049-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629(98)00049-0)

Wu X., Landfester K., Musyanovych A., Guy R.H. Disposition of charged nanoparticles after their topical application to the skin. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 23(3), p. 117-23, 2010.

Wu X., Price G.J., Guy R.H. Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. **Mol Pharm**, v. 6(5), p. 1441-1448, 2009.

Yang J.H., Kim T.Y., Lee J.H., Yoon S.W., Yang K.H., Shin S.C. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of ketorolac tromethamine gel using pulsed ultrasound in inflamed rats. **Arch. Pharm. Res**, v. 31(4), p. 511-517, 2008.

Young S.R., Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. **Ultrasound Med. Biol**, v. 16, p. 261-269, 1990.

Yudina A., de Smet M., Lepetit-Coiffé M., Langereis S., Van Ruijssevelt L., Smirnov P., Bouchaud V., *et al.* Ultrasound-mediated intracellular drug delivery using microbubbles and temperature-sensitive liposomes. **J Control Release**, v. 155, p. 442-448, 2011.

Zanatta C.F. Aplicação do óleo de buriti no desenvolvimento de emulsões no estudo de citotoxicidade e potencial fotoprotetor em cultivo celular. Tese (doutorado), **Universidade de São Paulo – USP**, Ribeirão Preto, 2008.

Zhai H., Maibach H.I. Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 14, p. 1-10, 2001.

Zhang L.W., Yu W.W., Colvin V.L., Monteiro-Riviere N.A. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 228(2), p. 200-211, 2008.

Zhang S., Li F., Jiang X., Kim J., Luo J., Geng X. Advantages and Challenges of Relaxor-PbTiO<sub>3</sub> Ferroelectric Crystals for Electroacoustic Transducers- A Review. **Prog Mater Sci**, v. 1(68), p. 1-66, 2015. Doi:10.1016/j.pmatsci.2014.10.002.

Zhao Y., Moddarsi M., Jones S.A., Brown M.B. A dynamic topical hydrofluoroal kanefoam to induce nanoparticle modification and drug release in situ. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 72(3), p. 521-528, 2009.

Zhao Y.Z., Du L.N., Lu C.T., Jin Y.G., Ge P.S. Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1621-1633, 2013. Doi.org/10.2147/IJN.S43589

Zortéa D., Silveira P.C.L., Souza P.S., Fidelis G.S.P., Paganini C.S., Pozzi B.G., Tuon T., Souza C.T., Paula M.M.S., Pinho R.A. Effects of Phonophoresis and Gold Nanoparticles in Experimental Model of Muscle Overuse: Role of Oxidative Stress. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 41(1), p. 151-162, 2015. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2014.08.020>.

# ANEXO I

**Resumo do artigo: *Skin Delivery of Glucosamine and Chondroitin Sulphates—A Perspective on the Conservative Treatment for Osteoarthritis of the Knee.***



Scientific  
Research  
Publishing

Journal of Biosciences and Medicines, 2017, 5, 11-20  
<http://www.scirp.org/journal/ibm>  
 ISSN Online: 2327-509X  
 ISSN Print: 2327-5081

## Skin Delivery of Glucosamine and Chondroitin Sulphates—A Perspective on the Conservative Treatment for Osteoarthritis of the Knee

**Cláudia Batista Siqueira Leite<sup>1</sup>, Janaina Moreira Coelho<sup>1</sup>, Luis Alexandre Muehlmann<sup>2</sup>, Ricardo Bentes de Azevedo<sup>3</sup>, Marcelo Henrique Sousa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Cellândia, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

Email: claudiasiqueiraleite@yahoo.com.br, mhsqui@gmail.com

**Abstract**

Based upon a series of research studies, scientific organizations considered Glucosamine and Chondroitin “not appropriate” as osteoarthritis (OA) of the knee modifying drugs and uncertain as pain relievers. Research studies which served as foundation for the aforementioned conclusions focused on the oral use of the substances. On the other hand, studies recommend that topical administration in treating OA be considered first line therapy, since it is said to be advantageous for its efficacy in treating localized situations, as it allows greater local concentration and it results in smaller systemic effects. Studies found did not provide sufficient evidence for good development and application strategies and were not enough to prove the technique to be effective or non-effective. Several other aspects must be clarified. In order to enhance permeation and delivery of Glucosamine and Chondroitin to knee joint, combining the advantages of intravenous infusion therapy with the convenience of oral administration, the suggested course of action is to transform skin delivery technology, while clarifying other points discussed throughout this research study.

**How to cite this paper:** Leite, C.B.S., Coelho, J.M., Muehlmann, L.A., de Azevedo, R.B. and Sousa, M.H. (2017) Skin Delivery of Glucosamine and Chondroitin Sulphates—A Perspective on the Conservative Treatment for Osteoarthritis of the Knee. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5, 11-20.  
<https://doi.org/10.4236/jbm.2017.54002>

Received: December 14, 2016  
 Accepted: April 25, 2017  
 Published: April 30, 2017

Copyright © 2017 by authors and Scientific Research Publishing Inc.  
 This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>


**Open Access**

## ANEXO II

### Resumo do artigo: *Microemulsions as Platforms for Transdermal Delivery of Hydrophilic Drugs - A Review*

*Current Nanoscience*, 2018, 14, 1-9

1

#### REVIEW ARTICLE

### Microemulsions as Platforms for Transdermal Delivery of Hydrophilic Drugs - A Review

Cláudia Batista Siqueira Leite<sup>1,\*</sup>, Janaína Moreira Coelho<sup>1</sup>, Luis Alexandre Muehlmann<sup>2</sup>, Ricardo Bentes Azevedo<sup>1</sup>, Marcelo Henrique Sousa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil;*

<sup>2</sup>*Faculty of Ceilândia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil*

**Abstract: Background:** Delivery rates in cutaneous applications are limited by the skin barrier and also by the physical-chemical properties of the drug in the formulation. A lipophilic drug has more affinity, and can permeate the epidermis more easily than a hydrophilic drug. The potential use of nano-sized dispersions as distribution systems for hydrophilic drugs is being investigated.

**Objective:** To analyze the literature with regard to the development of microemulsions (ME) for transdermal delivery of hydrophilic drugs, with a view to identifying strategies to increase the permeation of these drugs.

#### ARTICLE HISTORY

Received: August 16, 2017  
Revised: November 13, 2017  
Accepted: December 1, 2017

DOI:

10.2174/1573413714666171218145416

**Results:** One hundred and eleven articles were potentially relevant to the combination of search criteria. After excluding duplicated articles, the abstracts of 83 articles were read. Of these, 73 did not meet the inclusion criteria. To complete the review process, the whole text of 10 articles was evaluated.

**Conclusion:** The main factors that positively influenced the permeation of hydrophilic drugs were low hydrophilic-lipophilic balance (HLB) values of the surfactant; concentrations of about 40% of surfactants and 30% of aqueous phase for the water-in-oil (W/O) systems; the addition of permeation promoters to the systems; and the association of physical methods during the application of the ME. The results offered support for the development of new topical microemulsions for hydrophilic drug delivery.



## ANEXO III

### PARECER DE APROVAÇÃO ÉTICA DO CEP-UNB

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Nanoemulsão Tópica de Glucosamina e Condroitina no tratamento da Osteoartrite de Joelho

**Pesquisador:** CLAUDIA BATISTA SIQUEIRA LEITE

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 65443017.5.0000.5558

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.261.866

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.261.866

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASÍLIA, 06 de Setembro de 2017

---

**Assinado por:**  
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto  
(Coordenador)



## ANEXO IV

### *Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC)*

### DOR

As perguntas a seguir se referem à INTENSIDADE DA DOR que você está atualmente sentindo devido a artrite de seu joelho. Para cada situação, por favor, coloque a intensidade da dor que sentiu nas últimas 72 horas (3 dias).

Pergunta: Qual a intensidade da sua dor?

**1-Caminhando em um lugar plano.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**2- Subindo ou descendo escadas.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**3- A noite deitado na cama.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**4-Sentando-se ou deitando-se.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

5. Ficando em pé.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**TOTAL:** \_\_\_\_\_

## RIGIDEZ

As perguntas a seguir se referem a intensidade de RIGIDEZ nas juntas (não dor), que você está atualmente sentindo devido a artrite em seu joelho nas últimas 72 horas. Rigidez é uma sensação de restrição ou dificuldade para movimentar suas juntas.

1- Qual é a intensidade de sua rigidez logo após acordar de manhã?

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

2- Qual é a intensidade de sua rigidez após se sentar, se deitar ou repousar no decorrer do dia?

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**TOTAL:** \_\_\_\_\_

## ATIVIDADE FÍSICA OU FUNCIONALIDADE

As perguntas a seguir se referem a sua ATIVIDADE FÍSICA. Nós chamamos atividade física, sua capacidade de se movimentar e cuidar de você mesmo(a). Para cada uma das atividades a seguir, por favor, indique o grau de dificuldade que você está tendo devido à artrite em seu joelho durante as últimas 72 horas.

**Pergunta: Qual o grau de dificuldade que você tem ao:**

1 - Descer escadas.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

2- Subir escadas.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

3- Levantar-se estando sentada.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

4- Ficar em pé.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

5- Abaixar-se para pegar algo.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

6- Andar no plano

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

7 – Entrar e sair do carro

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

8- Ir fazer compras

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

9- Colocar meias

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

10- Levantar-se da cama

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

10- Levantar-se da cama

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

11 – Tirar as meias

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

12 – Ficar deitado na cama

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

13 – Entrar e sair do banho

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

14 - Se sentar.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

15- Sentar e levantar do vaso sanitário.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

16- Fazer tarefas domésticas pesadas.

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

17- Fazer tarefas domésticas leves

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**TOTAL:** \_\_\_\_\_

Pontuação WOMAC

Nenhuma=0 (melhor estado), Pouca: 25, Moderada: 50, Intensa: 75, Muito intensa: 100 (pior estado)

Escore de cada domínio: valor total dividido pelo número de itens do domínio.

O valor total deve ser dividido por 24.