



UA Ig

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**Micropartículas poliméricas para entrega
de fármacos por via pulmonar com efeito
local**

Carla Patrícia Raposo Arruda

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2014



UA Ig

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

Micropartículas poliméricas para entrega de fármacos por via pulmonar com efeito local

Carla Patrícia Raposo Arruda

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2014

Micropartículas poliméricas para entrega de fármacos por via pulmonar com efeito local

Declaro ser a autora deste trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da lista da listagem de referências.

A universidade do Algarve tem direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor ou editor.

Carla Patrícia Raposo Arruda

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Margarida Grenha pela orientação, disponibilidade e ensinamentos transmitidos durante este último ano.

A todos os colegas de laboratório Ana, Susana, Pedro, Ludmylla, pela companhia e boa disposição, nos bons e maus momentos. Em especial à Filipa pela ajuda na preparação das experiências.

Aos professores do Mestrado de Ciências Biomédicas que contribuíram para a minha formação científica.

Um agradecimento muito especial aos meus pais pois sem eles nada disto seria possível. Às minhas irmãs Dora e Andreia por todo o apoio transmitido.

Agradeço a todos os meus amigos pelo seu apoio incondicional.

Resumo

A administração de agentes terapêuticos realiza-se por diversas vias anatómicas, destacando-se a via pulmonar que vem sendo amplamente estudada para tratamento local de afecções respiratórias como asma, doenças obstrutivas crônicas ou infecções microbianas. A utilização desta via na terapia de patologias respiratórias apresenta várias vantagens sobre a administração sistêmica, pois evita o metabolismo hepático associado à absorção intestinal, alguns efeitos secundários decorrentes e aumenta a biodisponibilidade do agente terapêutico. Para que se tenha um efeito terapêutico localizado é necessário um adequado sistema de transporte do fármaco, sendo exemplo destes os sistemas microparticulados. A deposição das micropartículas nas vias respiratórias requer que o transportador tenha um tamanho aproximado de 5 a 6 μm , sabendo-se que com menos de 2 μm a deposição ocorre na região alveolar. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de micropartículas poliméricas para potencial aplicação na entrega local de fármacos a nível pulmonar. As micropartículas foram produzidas pelo processo de atomização, tendo-se testado a associação de fármacos modelo quer de caráter hidrofílico (isoniazida e teofilina) quer de caráter hidrofóbico (prednisolona). O quitosano e a goma guar parcialmente hidrolisada foram os polímeros utilizados como matriz das micropartículas. O método de atomização permitiu uma eficaz associação dos fármacos, produzindo-se micropartículas com rendimento de 64% a 84% e diâmetro Feret entre 1 e 2 μm . Estas apresentam densidade real aproximada de 1.5 g/cm^3 , densidade aparente de compactação aproximada de 0.45 g/cm^3 e um diâmetro aerodinâmico teórico que varia entre 1.3 e 2.3 μm . Os sistemas tiveram eficácias de encapsulação que variaram entre 68% e 88%. O perfil de libertação dos fármacos mostrou que ocorre a completa libertação dos fármacos após 45-90 minutos (nos sistemas de quitosano) ou 30 minutos (nos sistemas de goma guar). Os ensaios de citotoxicidade demonstraram a ausência de toxicidade das formulações.

Este conjunto de resultados demonstra que as micropartículas de quitosano e goma guar parcialmente hidrolisada têm potencial na entrega local de fármacos por via pulmonar.

Palavras-chave: Atomização, micropartículas, goma guar parcialmente hidrolisada, quitosano, via pulmonar

Abstract

The administration of therapeutic agents is performed by various anatomical pathways, but the pulmonary route has been gathering popularity for the local treatment of respiratory disorders such as asthma, chronic obstructive diseases or microbial infections. The use of the pulmonary route in the treatment of respiratory diseases has several advantages over systemic administration, since it avoids the hepatic metabolism associated with intestinal absorption, inherent side effects and it increases the bioavailability of the therapeutic agent. Targeted therapies require a proper drug delivery system, such as microparticles. In order to achieve pulmonary deposition, the used carriers should have a size of approximately 5 – 6 μm , being known that a size lower than 2 μm permits deposition in the alveolar region. In this context, the aim of the present work was to prepare polymeric microparticles to be used as drug delivery system to the lungs. Chitosan (CS) and partially hydrolysed guar gum (PHGG) microparticles were prepared by spray-drying. The model drugs isoniazid, theophylline and prednisolone were successfully encapsulated in both polymeric systems. Production yields were in the range of 64% a 84%. Spray-dried microparticles had mean particle size of 1 to 2 μm , tapped density of approximately 1.5 g/cm^3 , bulk density of 0.45 g/cm^3 and a theoretical aerodynamic diameter ranging from 1.3 to 2.3 μm . Encapsulation efficiency varied between 68% to 88%. The complete release of drugs from CS microparticles occurred after 45 minutes (isoniazid) or 90 minutes (theophylline). Both isoniazid and theophylline drugs were completely released from PHGG microparticles after a period of 30 minutes. The cytotoxicity of microparticle formulations was tested and cell viability values were close to 100%. Therefore, results demonstrate the possibility of generating chitosan or partially hydrolysed guar gum microparticles that might be used as potential pulmonary drug delivery systems.

Keyword: Chitosan, microparticles, partially hydrolysed guar gum, pulmonary route, spray-drying

Abreviaturas

CS - Quitosano

D_{ac} - Densidade aparente de compactação

DMEM - Meio modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMSO - Dimetilsulfóxido

FBS - Soro bovino fetal

HCl - Ácido clorídrico

INH - Isoniazida

MTT - Brometo tetrazólio

PBS - Tampão fosfato salino

PHGG - Goma Guar parcialmente hidrolisada

SDS - Dodecilsulfato de sódio

Teo - Teofilina

Lista de figuras

Figura 1.1: Representação das diferentes regiões do sistema respiratório.....	1
Figura 1.2: Representação esquemática da Microsesféra e Microcápsula.....	6
Figura 1.3: Esquema ilustrativo do sistema de atomização.....	7
Figura 1.4: Estrutura química do quitosano.....	9
Figura 1.5: Repetição da unidade de goma guar e goma guar parcialmente hidrolisada (A), Processo de obtenção de goma guar (B).....	10
Figura 4.1: Microfotografia obtida por microscopia electrónica de varrimento (SEM, ampliação 2500x) de micropartículas de quitosano com e sem fármaco: A) CS; B) CS:INH; C) CS:Teo.....	28
Figura 4.2: Microfotografia obtida por microscopia electrónica de varrimento (SEM, ampliação 2500x) de micropartículas de quitosano com e sem fármaco: A) PHGG; B) PHGG- Man; C) PHGG-Man:INH; D) PHGG-Man:Teo.....	29
Figura 4.3: Perfil de libertação das micropartículas de CS (n=3, média \pm desvio padrão).....	33
Figura 4.4: Perfil de libertação das micropartículas de PHGG (n=3, média \pm desvio padrão).....	34
Figura 4.5: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 3 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de CS. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).....	35
Figura 4.6: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 24 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de CS. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).....	36

Figura 4.7: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólicos de MTT depois de 3 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de PHGG. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).....37

Figura 4.8: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 24 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de CS. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).....38

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Variação dos parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas (média \pm desvio padrão).....	15
Tabela 3.2: Variação dos parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas com isoniazida (média \pm desvio padrão).....	16
Tabela 3.3: Variação dos parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas com teofilina (média \pm desvio padrão).....	17
Tabela 3.4: Variação dos parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas com prednisolona (média \pm desvio padrão).....	18
Tabela 4.1: Parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas (n = 3, média \pm desvio padrão).....	22
Tabela 4.2: Rendimento de produção de micropartículas (n = 3, média \pm desvio padrão)....	27
Tabela 4.3: Diâmetro de Feret, densidade real, densidade aparente e densidade aparente de compactação das micropartículas produzidas (n = 3, média \pm desvio padrão).....	31
Tabela 4.4: Eficácias de encapsulação obtidas nas diferentes formulações de micropartículas (n = 3, média \pm desvio padrão).....	32

Índice

Resumo	v
Abstract.....	vi
Abreviaturas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas.....	ix
I- Introdução	1
1.1- Anatomia e função do sistema respiratório.....	1
1.2- O pulmão como local de administração de fármacos.....	2
1.2.1- Dispositivos de administração pulmonar de fármaco.....	4
1.2.2- Mecanismos de deposição pulmonar.....	4
1.3- Micropartículas como sistema de administração pulmonar.....	5
1.3.1- Produção de micropartículas por atomização.....	6
1.4- Os polissacáridos como matriz de micropartículas.....	7
1.4.1- Quitosano	8
1.4.2 - Goma Guar parcialmente hidrolisada.....	9
II- Objetivos.....	10
III- Material e métodos	13
3.1- Material	13
3.2- Linha celular	13
3.3- Métodos.....	14
3.3.1- Preparação de micropartículas por atomização.....	14
3.3.1.1- Associação de fármacos às micropartículas.....	15
3.3.1.1.1- Isoniazida	16
3.3.1.1.2- Teofilina.....	17
3.3.1.1.3- Prednisolona.....	17

3.3.2- Rendimento de produção das micropartículas.....	18
3.3.3- Caraterização das micropartículas	18
3.3.4- Caraterização das propriedades aerodinâmicas das microartículas	19
3.3.5- Determinação da eficácia de encapsulação dos fármacos.....	19
3.3.6- Avaliação do perfil de libertação dos fármacos.....	20
3.3.7- Avaliação do perfil de citotoxicidade das micropartículas.....	20
IV- Resultados e discussão.....	22
4.1- Preparação e caraterização das micropartículas.....	22
4.1.1- Associação de fármacos às micropartículas.....	22
4.1.1.1- Isoniazida.....	23
4.1.1.2-Teofilina.....	24
4.1.1.3- Prednislolona.....	25
4.2- Caraterização das micropartículas.....	26
4.3- Determinação da eficácia de encapsulação dos fármacos.....	31
4.4- Determinação do perfil de libertação.....	33
4.5- Avaliação da citotoxicidade das micropartículas.....	34
V- Conclusão.....	39
VI- Referências bibliográficas.....	40

I- Introdução

1.1- Anatomia e função do sistema respiratório

O sistema respiratório funciona em conjunto com o sistema circulatório para a entrega de oxigénio dos pulmões para as células e a remoção de dióxido de carbono que retorna aos pulmões para ser expirado para o exterior. Este processo de trocas gasosas é designado por respiração.¹ O sistema respiratório consiste em duas zonas: a zona respiratória e a zona condutora (Figura 1.1).²

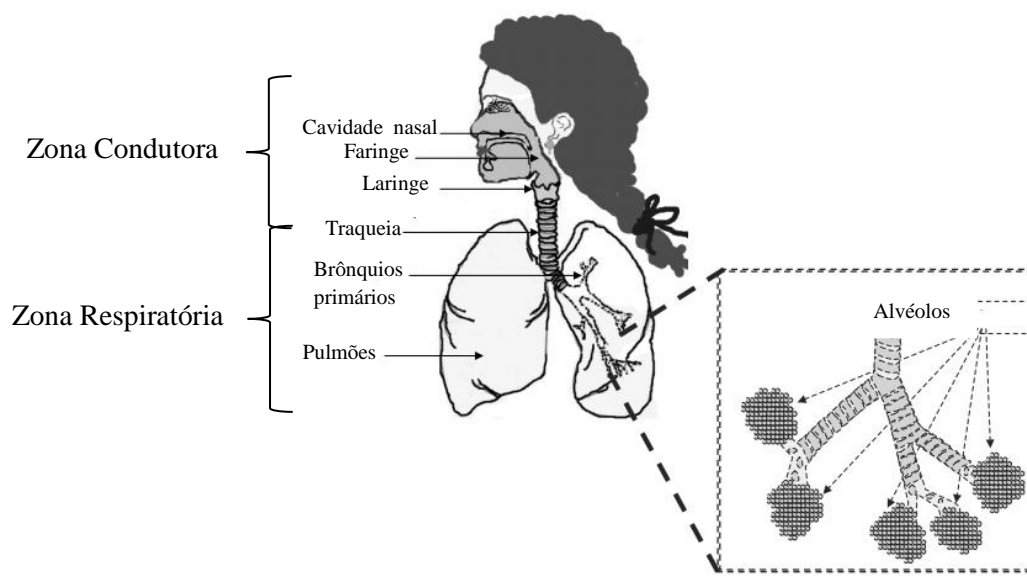


Figura 1.1: Representação das diferentes regiões do sistema Respiratório (Adaptado de 1).

Na zona condutora estão incluídas a cavidade nasal, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos, tendo a função de permitir a entrada e saída do ar em direcção aos pulmões. Na zona respiratória é onde ocorrem trocas gasosas, sendo constituída pelos bronquíolos respiratórios, os ductos, os sacos alveolares e os alvéolos.²⁻³ A traqueia bifurca-se em dois brônquios. Estes dividem-se posteriormente em brônquios de menor calibre designados de bronquíolos, que terminam em zonas mais amplas designadas por alvéolos.²⁻³ Os bronquíolos terminais representam a passagem da região condutora para a região respiratória.²

As vias aéreas superiores têm a função de conduzir, aquecer, humedecer e filtrar o ar, sendo que o aquecimento e humidificação do ar inspirado ocorre predominantemente na cavidade nasal e faringe. Este processo continua nas vias aéreas mais profundas, de modo que o ar que alcança os alvéolos esteja à temperatura corporal e completamente saturado de água. A limpeza do ar inspirado ocorre na cavidade nasal, onde a poeira, as bactérias e as partículas são capturadas por impacto e são depositadas sobre a camada de muco.⁴ Este é segregado pelas células da submucosa e pelas células caliciformes, formando um gel que reveste as paredes das vias aéreas condutoras, cujo componente maioritário é a mucina.⁵

No epitélio pulmonar existem vários tipos celulares e este divide-se em duas regiões principais, o epitélio bronquial e alveolar. Na região bronquial predominam as células ciliadas mas existem ainda células Clara, em número mais reduzido. As células ciliadas têm como função principal a propulsão ascendente do muco em direção à orofaringe, permitindo a eliminação por deglutição de substâncias estranhas aos pulmões.⁶⁻⁸

A região alveolar é desprovida de uma camada de muco, estando revestida por um surfactante que cobre o epitélio, participando em diversos mecanismos de defesa e mantendo a homeostasia e a permeabilidade.^{7,9} O surfactante é constituído maioritariamente por lípidos (90%), na sua maioria fosfolípidos, e uma pequena quantidade de lípidos neutros e proteínas (10%).^{4,6,10-12} O surfactante é produzido pelos pneumócitos do tipo II, que cobrem uma pequena parte da superfície alveolar e participam no processo de diferenciação dos pneumócitos do tipo I.⁶ Os pneumócitos do tipo I são os que predominam na superfície alveolar, pois revestem 93% desta, formando uma barreira de difusão entre o sangue e o ar.^{7,13}

1.2– O pulmão como local de administração de fármacos

A administração de agentes terapêuticos realiza-se por diversas vias anatómicas, variando a sua escolha de acordo com a patologia a ser tratada, o efeito desejado e a disponibilidade do agente terapêutico.⁸

A via oral é a mais convencional por proporcionar uma administração fácil e ser amplamente aceite pelos pacientes. Apresenta, no entanto, algumas limitações como a degradação do princípio ativo pelo pH do trato digestivo e por destruição enzimática, e também a baixa absorção do fármaco. A via parental é também muito utilizada, mas implica

uma injeção e é por esse facto mal recebida pelos doentes, além de implicar custos mais elevados relacionados com os dispositivos de administração e com a necessidade de pessoal especializado para a administração.⁸ Uma alternativa não invasiva para a administração de agentes terapêuticos é a via de administração pulmonar, que tem sido estudada nos últimos anos para a administração de fármacos com efeito sistémico, mas que desde há muitos anos tem uma grande relevância para a terapêutica de afeções locais.¹⁴⁻¹⁵ Neste contexto, muitas formulações têm sido desenvolvidas sob forma de aerossol com vista à obtenção de um efeito local no tratamento de patologias respiratórias localizadas como a asma, doenças obstrutivas crónicas ou infeções microbianas.¹⁶⁻¹⁷

A utilização da administração pulmonar no tratamento de afeções respiratórias apresenta várias vantagens sobre a administração sistémica para obter esse efeito, o que geralmente ocorreria por via oral. De facto, a administração pulmonar com fins locais permite evitar o metabolismo hepático associado à absorção intestinal, o que potencia o aumento da biodisponibilidade. Por outro lado, ao administrar o fármaco diretamente no local de ação, existe grande probabilidade de se verificar um início de ação mais rápido. Acresce que desta forma se podem utilizar doses de fármaco mais reduzidas, levando a um decréscimo dos efeitos secundários.^{8,15,17}

Não obstante as suas vantagens, a via de administração pulmonar também apresenta algumas limitações, como o efeito de filtro aerodinâmico dos pulmões que tem de ser ultrapassado para que ocorra uma deposição eficiente do fármaco, e a eliminação mucociliar das partículas depositadas. Além disso, geralmente apenas 10-40 % do fármaco inspirado é depositado nos pulmões quando utilizados dispositivos convencionais.^{4,8}

Os fármacos são administrados por via pulmonar sob a forma de um aerossol, definido em farmácia como um sistema de partículas sólidas ou líquidas em suspensão num gás.^{1,15,18} A deposição do aerossol depende tanto das características da formulação em si como do estado em que se encontra o doente, particularmente do seu padrão de respiração.¹⁹ Os aerossóis que são utilizados para fins terapêuticos são polidispersos e a sua característica mais importante é o tamanho da partícula, porque disso vai depender a capacidade de penetração no trato respiratório.^{1,19} Para penetrar nas regiões respiratórias, as partículas devem ter um tamanho aproximado de 5 a 6 µm e com menos de 2 µm, estas depositam-se na região alveolar.^{10,15} As partículas com maior tamanho depositam-se na parte superior do trato respiratório e são rapidamente depuradas pelo mecanismo de eliminação mucociliar.¹³ É necessário ter em

conta, no entanto, que uma partícula ao penetrar nas vias respiratórias, sofre uma mudança para um meio com uma humidade relativa muito elevada (aproximadamente 99%), pelo que haverá condensação de água sobre a sua superfície até que a pressão de vapor de água se iguale à atmosfera em que esta se encontra. Nas substâncias solúveis em água pode ocorrer a formação de uma solução sobre a superfície da partícula, uma vez que a pressão de vapor da superfície é menor do que a do meio envolvente e a água continuará a condensar-se até alcançar o equilíbrio entre pressões de vapor. Isto conduz a um aumento do tamanho de partícula, o que afetará a sua deposição, que pode sofrer alterações face ao estimado a partir de medições.¹⁷

Tendo em conta as vantagens e a fisiologia da via pulmonar têm-se desenvolvido vários dispositivos de administração pulmonar.

1.2.1- Dispositivos de administração pulmonar de fármacos

Na via pulmonar os dispositivos utilizados para a administração dos fármacos assumem um papel tão importante como o da própria formulação.²⁰ De facto, se não houver um dispositivo adequado para uma formulação, a administração nunca terá sucesso.¹⁶ Como referido anteriormente, as formulações para administração pulmonar são líquidas (solução ou suspensão) ou sólidas (pós secos).¹⁷ São três os principais tipos de dispositivos a considerar para a administração destas formulações, a saber I) inaladores pressurizados com válvula doseadora (MDIs), II) inaladores de pó seco (DPIs) e III) nebulizadores.²¹ O nebulizador foi o primeiro dispositivo a aparecer e não apresenta portabilidade, pelo que é utilizado com menos frequência e mais em ambiente hospitalar.^{15,17} Nos MDI o fármaco é administrado sob a forma de uma solução ou suspensão, que assume a forma de um spray após ativação do dispositivo.²²⁻²³ Estes dispositivos exigem a coordenação entre o momento da inalação e o acionamento da válvula, tarefa de alguma dificuldade para os doentes e que conduz a variações na quantidade e local da deposição nas vias aéreas superiores.²⁴ Esta dificuldade de coordenação foi ultrapassada com os DPIs, que libertam o conteúdo pela força de inalação do doente. Assim a reprodutibilidade da dose inalada depende do doente, tendo em conta a sua capacidade respiratória. Além disso, os DPIs usam formulações em pó, que têm potencialmente mais estabilidade do que as congéneres líquidas.²⁵

1.2.2- Mecanismos de deposição pulmonar

Existem três mecanismos responsáveis pela deposição de partículas/gotículas nos pulmões: sedimentação gravitacional, colisão inercial e a difusão browniana.¹⁰ A sedimentação gravitacional depende do seu tamanho e densidade, assim como do tempo que esta permanece nas vias respiratórias.^{1,10} A colisão inercial ocorre no local onde se verifica a bifurcação do sistema respiratório em que acontece uma mudança na direção do ar, e onde as partículas presentes no ar colidem nas paredes das vias respiratórias, não seguindo a direção da corrente de ar.^{1,26} Este mecanismo é mais importante em partículas com um diâmetro superior a 5 μm (mas essencialmente para partículas com um diâmetro superior a 10 μm). Este é o principal mecanismo de deposição na zona condutora. À medida que o sistema respiratório de condução se ramifica, a velocidade da corrente de ar diminui e a colisão torna-se o mecanismo de deposição menos importante.²⁷

A difusão browniana é o movimento aleatório de partículas num fluido como consequência dos choques entre todas as moléculas ou átomos presentes no fluido. O movimento ocorre de zonas de maior concentração de partículas para zonas de menor concentração, sendo a velocidade de difusão inversamente proporcional ao tamanho da partícula. Este mecanismo é essencial nas partículas com diâmetro inferior a 0.5 μm .^{1,16}

Assim sendo, o tamanho das partículas de fármaco e os diferentes mecanismos de deposição assumem posições de relevo.¹⁷ As partículas depositadas nas zonas ciliadas são eliminadas após 24 horas e posteriormente são deglutidas, aquelas que penetram até regiões alveolares sem serem solubilizadas *in situ*, são eliminadas mais lentamente. Os macrófagos alveolares fagocitam essas partículas, migrando para as regiões mais profundas dos alvéolos ou em alternativa são removidos por via linfática a fim de serem eliminados.^{4,17}

1.3- Micropartículas como sistema de administração pulmonar

As micropartículas (MPs) são partículas geralmente esféricas, sólidas, com um diâmetro entre 1 a 1000 μm .¹⁶ Estas podem ser classificadas como microsferas ou microcápsulas consoante a sua constituição. As microsferas são constituídas por uma matriz polimérica contínua onde o fármaco se encontra absorvido, encapsulado ou ligado covalentemente numa rede tridimensional. Ao contrário, as microcápsulas são sistemas do

tipo reservatório, que contêm uma cavidade bem definida onde o fármaco se encontra encapsulado em estado sólido ou líquido, estando separado do meio exterior por uma membrana polimérica (Figura 1.2).²⁸

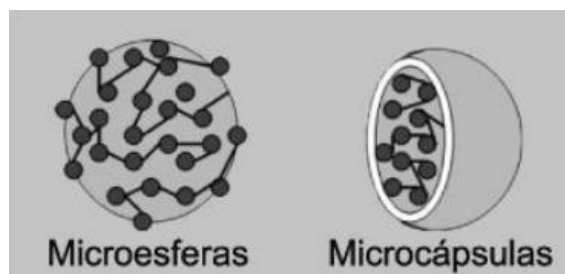


Figura 1.2: Representação esquemática da Microesfera e Microcápsula (Adaptado de 29).

O processo de microencapsulação tem sido muito estudado na área farmacêutica para desenvolver sistemas de liberação controlada de fármacos. Este procedimento é considerado vantajoso por proporcionar proteção aos agentes terapêuticos face à ação enzimática, dar sustentação à liberação do fármaco, prolongar o seu efeito terapêutico e diminuir a toxicidade gastrointestinal, quando aplicável.¹¹

Existem vários métodos para a produção de Micropartículas e a escolha do método deve ser feita consoante a natureza do polímero, do fármaco, bem como a sua finalidade terapêutica.³⁰ O método escolhido deve evidenciar algumas características, incluindo a capacidade para manter a estabilidade do fármaco; proporcionar um elevado rendimento do processo e eficácia de encapsulação; produzir micropartículas com propriedades de fluxo adequadas para o objetivo final, com características reprodutíveis.³¹ Entre os métodos descritos na literatura encontram-se processos de emulsificação-difusão/evaporação, coacervação simples e complexa e atomização.⁸ O último tem sido descrito como adequado para a produção de micropartículas para administração pulmonar de fármacos

1.3.1- Produção de micropartículas por atomização

A atomização é o processo pelo qual ocorre a produção de micropartículas a partir da transformação de soluções ou suspensões em partículas secas, formadas por atomização e

posterior secagem.³² Este processo ocorre de forma contínua e inclui as seguintes etapas: I) Fornecer a solução ou suspensão ao atomizador; II) Atomização (produção de um spray); III) Mistura do spray com o ar de secagem; IV) Evaporação do solvente; V) Separação do produto Seco. Neste processo, a solução ou suspensão é bombeada até ao injetor, onde é transformada em gotículas dentro de uma câmara de secagem cuja temperatura é superior à temperatura de evaporação do solvente utilizado. Ocorre assim a evaporação do solvente, que resulta na formação de partículas, as quais são posteriormente separadas por um separador ciclónico e recolhidas num copo coletor (Figura 1.3).³³

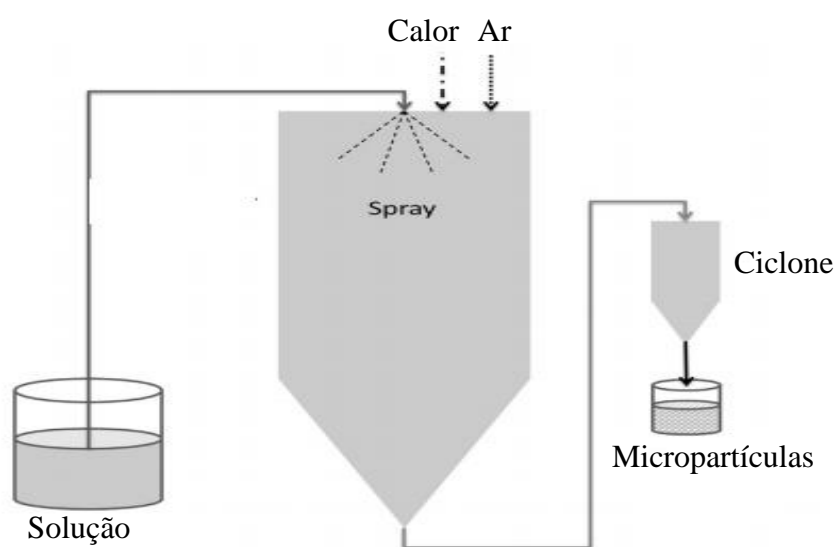


Figura 1.3: Esquema ilustrativo do sistema de atomização (Adaptado de 33).

O processo de atomização decorre de acordo com a fixação de vários parâmetros, os quais devem ser otimizados para se obterem micropartículas com as propriedades desejadas. O tamanho das partículas produzidas por esta técnica depende de vários parâmetros, como a temperatura, fluxo da amostra e do ar, o tipo de extremidade do nozzle e o fluxo de ar quente da câmara de secagem.³⁴ A modificação dos parâmetros de atomização permite alterar algumas características das micropartículas obtidas, como o seu tamanho e a distribuição granulométrica, a aparência, a humidade, e em suma, as propriedades de fluxo.³⁵

Este processo apresenta uma desvantagem que é o grande consumo de energia devido à necessidade de fornecer calor para a evaporação em curto espaço de tempo.

Esse meio de produção de micropartículas apresenta algumas vantagens nomeadamente: existência de uma grande variedade de atomizadores o que permite obter uma grande variedade de produtos específicos tendo em conta a sua finalidade, permite controlar a densidade do produto, bem como manter as características do pó durante todo o processo.³⁶

Por tudo o descrito anteriormente, esta é uma técnica muito utilizada para a produção de micropartículas.

1.4- Os polissacáridos como matriz de micropartículas

A produção de micropartículas pode realizar-se utilizando materiais de composição variada, como lípidos, proteínas e polímeros. Dentro dos polímeros podemos fazer uma divisão entre os que são de origem natural e sintética.³⁷ Os polímeros de origem sintética são compostos maioritariamente por compostos orgânicos produzidos pelo homem através do processo de polimerização, como por exemplo, o polietileno.³⁸

Por contraposição, os polímeros naturais são encontrados na natureza sem interferência humana, sendo exemplos as proteínas e os polissacarídeos, entre outros. Estes têm assumido posições de relevo na investigação científica, dada a sua propensão para serem biocompatíveis e biodegradáveis, e a facilidade de obtenção na maioria dos casos.³⁸ O quitosano e a goma guar parcialmente hidrolizada são exemplo de polissacarídeos utilizados como matriz para as micropartículas.

1.4.1- Quitosano

A quitina é um biopolímero natural que se encontra presente no meio ambiente no exoesqueleto de crustáceos, insetos, moluscos e nas paredes celulares dos microrganismos. A partir da desacetilação da quitina é possível obter o quitosano, que é um polissacarídeo constituído por a ligação $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetoamino-2-desoxi-D-glucopiranosose com 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose que se repete entre cada molécula de quitosano.³⁹

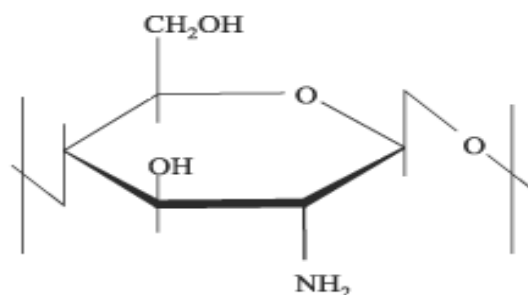


Figura 1.4: Estrutura química do quitosano (Adaptado de 46).

Este apresenta diferentes graus de desacetilação que variam entre 40-80% e seu peso molecular varia 50 e 2000 kDa.⁴⁰ Essa variação do seu peso molecular e grau de desacetilação deve-se às condições do processo de obtenção, podendo contudo ser modificados posteriormente.⁴¹ O quitosano pode ser encontrado comercialmente sob a forma de pó, pasta, filme ou fibra.⁴²⁻⁴³

Devido às suas propriedades físico-químicas, tais como elevado teor de azoto, com um pK_a de 6.3, alta cristalinidade e insolubilidade em água mas solúvel em soluções ácidas devido à protonação dos grupos amina, este composto é amplamente utilizado em diferentes áreas. Para além disso apresenta ainda capacidade de formação de ligações intermoleculares através de pontes de hidrogénio e capacidade de estabelecer ligações eletrostáticas com moléculas aniónicas, uma vez que apresenta densidade de carga positiva em meio ácido.⁴⁴⁻⁴⁵

Outro facto que o torna tão aplicável nas mais diversas áreas são as suas características biológicas, nomeadamente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade.⁴⁶ Este ainda apresenta propriedades mucoadesivas, ação antimicrobiana, antitumoral e anticoagulante.^{42-43, 47-48}

Estas características fazem do quitosano um biopolímero muito promissor para utilização em sistemas de libertação de fármaco.⁵⁰

1.4.2- Goma Guar parcialmente hidrolisada

A Goma Guar é também de origem natural, sendo extraída a partir do endosperma de um vegetal da espécie *Cyamopsis tetragonolobus*. É originária do Paquistão e da Índia,

ocorrendo a sua produção maioritariamente neste último país (cerca de 80%).⁵⁰ A goma guar pertence ao grupo dos galactomananos, um grupo de polímeros caracterizado por uma estrutura linear de manose (β -1,4) com resíduos de galactose como cadeias laterais ligadas a partir de ligações glicosídicas numa proporção de 2:1 (Manose: Galactose). Com uma massa molecular que varia entre 200 e 300 kDa, produz soluções aquosas altamente viscosas, o que limita a sua aplicação.⁵¹ Esta é utilizada em várias indústrias, como a indústria alimentar, têxtil e cosmética, pois apresenta propriedades de espessante, estabilizador e emulsificante.⁵² A goma guar é solúvel em água e é estável quando exposta a temperaturas elevadas devido à presença do grupo galactose que dificulta a interação entre as moléculas de polissacarídeos, podendo formar dispersões coloidais em água, altamente viscosas, por possuir uma cadeia pouco ramificada.⁵³ A sua elevada viscosidade faz com que a sua aplicação seja limitada.

Uma alternativa desenvolvida pela indústria para diminuir a sua viscosidade foi a produção de goma guar parcialmente hidrolisada, sendo esta obtida por hidrólise enzimática controlada utilizando β -endo-mananase seguindo-se de uma esterilização e atomização.⁵⁴ A representação do processo e a unidade de repetição da estrutura molecular da goma guar parcialmente hidrolisada são apresentadas a seguir (Figura 1.6).

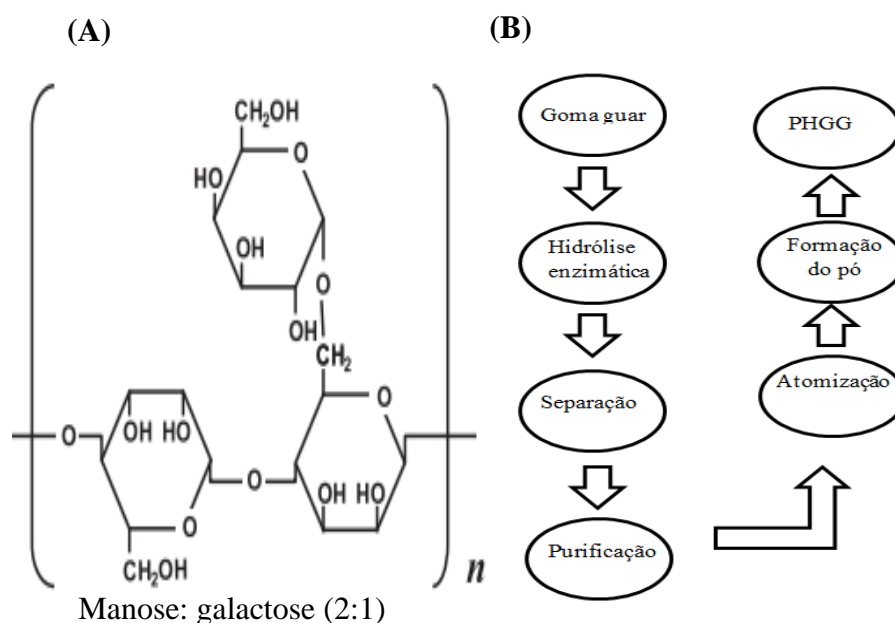


Figura 1.5: Repetição da unidade de goma guar e goma guar parcialmente hidrolisada (A), Processo de obtenção de goma guar (B) (Adaptado de 55).

No que respeita às suas propriedades físicas esta apresenta um perfil de viscosidade inferior com relação à goma guar. Comercialmente ela está disponível sob a forma de pó, solúvel em água e produz soluções aquosas incolores. A goma guar parcialmente hidrolisada quando exposta a elevadas temperaturas não sofre alteração na sua estrutura química, é estável e solúvel em diferentes valores de pH, apresenta baixa toxicidade o que torna a sua aplicação mais ampla. Destaca-se como aplicação deste polímero o tratamento da constipação, da diarreia e melhoria da resposta glicémica.⁵⁶

II– Objetivo

O objetivo global deste trabalho foi o desenvolvimento de micropartículas poliméricas produzidas por atomização com potencial aplicação na entrega local de fármacos a nível pulmonar.

Objectivos específicos

- 1) Selecionar os materiais adequados para a produção das micropartículas por atomização, cumprindo o requisito de utilização de polímeros naturais;
- 2) Associar às micropartículas fármacos modelo de carácter hidrofílico (isoniazida e teofilina) e hidrofóbico (prednisolona);
- 4) Avaliar as propriedades morfológicas e aerodinâmicas das micropartículas produzidas;
- 5) Determinar o perfil de libertação dos fármacos *in vitro*;
- 6) Avaliar o perfil de citotoxicidade das micropartículas produzidas, em células representativas do epitélio respiratório.

III- Material e Métodos

3.1- Material

Os materiais quitosano, manitol, isoniazida, teofilina, prednisolona, tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4 em pastilhas, brometo tetrazólio (MTT), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicilina/estreptomicina (10000 unidades/mL, 10000 µg/mL), aminoácidos não essenciais, L-glutamina, dodecilsulfato de sódio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido clorídrico (HCl) e ácido acético foram fornecidos pela Sigma (Alemanha). A Goma Guar parcialmente hidrolisada (PHGG) foi gentilmente oferecida pela empresa Taiyo (Alemanha), o polissorbato 20 (Tween[®] 20) foi fornecido pela Amresco, o polissorbato 80 (Tween[®] 80) foi fornecido pela Merk e o soro bovino fetal (FBS) pela Gibco (USA). Foi utilizada água ultrapura para a realização de todo o trabalho experimental (MilliQ, Interface, Portugal).

3.2- Linha celular

Foi utilizada a linha celular A549, uma linha do sistema respiratório, mais concretamente da zona alveolar. Esta linha tem origem no carcinoma alveolar do pulmão humano e foi fornecida pela American Type Culture Collection (Rockville, USA). As células foram utilizadas entre as passagens 33 e 43.

As culturas de células foram mantidas numa atmosfera húmida de 5% de CO₂/95% de ar atmosférico numa incubadora a 37 °C. O meio de cultura utilizado foi o DMEM, o qual foi suplementado com 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de solução de aminoácidos não essenciais, 1% (v/v) L-glutamina e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina. Este meio foi substituído a cada 2-3 dias.

3.3- Métodos

3.3.1- Preparação das micropartículas por atomização

Foram preparadas micropartículas de quitosano e de goma guar parcialmente hidrolisada por atomização, utilizando um atomizador de escala laboratorial (Buchi® Mini Spray Dryer, B-290, Buchi, Suíça). O equipamento foi sempre operado com uma pressão de ar de 400 NI/h. A solução de quitosano para atomização foi preparada à concentração de 2% (m/v), usando-se como solvente ácido acético a 1% (m/m). A solução foi mantida em agitação durante cerca de 40 minutos, até homogeneização. A solução de goma guar foi igualmente preparada à concentração de 2% (m/v), tendo sido solubilizada em água ultrapura, sob agitação por cerca de 25 minutos. Foi ainda preparada uma formulação de micropartículas de goma guar que contém 0.5% (m/v) de manitol. Neste caso, o manitol foi pulverizado juntamente com a goma guar antes da solubilização em água.

Após a completa dissolução dos polímeros procedeu-se à atomização das soluções. Os parâmetros da atomização foram ajustados de forma a produzir pós secos com propriedades de fluxo consideradas adequadas para o objetivo da administração pulmonar. Os parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas estão descritos na Tabela 3.1. As amostras foram preparadas em triplicado para todas as formulações desenhadas. Após atomização das várias formulações, recolheram-se as micropartículas, que foram armazenadas num exsiccador com sílica até à sua utilização.

Tabela 3.1: Variação dos parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas (média \pm desvio padrão).

Formulações	T entrada (°C)	T saída (°C)	Velocidade de fluxo (mL/min)	Aspirador (%)
CS	160	116	0.48	80
PHGG	*150 \pm 1	*95 \pm 5	*0.7 \pm 0.5	*60
	185 \pm 1	118 \pm 3	0.8 \pm 0.5	85
PHGG-Man	*160 \pm 1	96 \pm 2	*96 \pm 2	*60
	170 \pm 1	194 \pm 2	104 \pm 2	80

*Varia entre; CS: quitosano; Man: manitol; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada.

3.3.1.1– Associação de fármacos às micropartículas

Foram utilizados três fármacos modelo: a isoniazida, a teofilina e a prednisolona. A quantidade de fármaco associada a cada formulação foi calculada de forma a representar um conteúdo teórico de 10% (m/m), em relação ao polímero utilizado como matriz. As soluções poliméricas foram preparadas como descrito anteriormente. Abaixo descrevem-se os procedimentos diferenciados utilizados na preparação das formulações contendo cada um dos fármacos. Os parâmetros de atomização que foram otimizados para cada formulação com fármaco estão descritos nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4. As amostras foram preparadas em triplicado. Depois da atomização das várias formulações, recolheram-se as micropartículas, que foram armazenadas num exsiccador com sílica até à sua utilização.

3.3.1.1.1- Isoniazida

Depois da completa solubilização dos polímeros (quitosano e PHGG) adicionou-se gradualmente isoniazida previamente pulverizada, ficando sob agitação durante 25 minutos até homogeneização da solução.

Tabela 3.2: Variação dos parâmetros utilizados para a produção de micropartículas com isoniazida (média \pm desvio padrão).

Formulação	T entrada (°C)	T saída (°C)	Velocidade de fluxo (mL/min)	Aspirador (%)
CS:INH	*160 \pm 1	*115 \pm 3	*0.5 \pm 0.5	*80
	175 \pm 1	125 \pm 1	0.8 \pm 0.5	85
PHGG-Man:INH	*160 \pm 1	*115 \pm 3	*0.7 \pm 0.5	*80
	175 \pm 1	125 \pm 1	0.8 \pm 0.5	85

*Varia entre; CS: quitosano; INH: isoniazida; Man: manitol; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada.

Foi produzida uma formulação de micropartículas de PHGG contendo 0.5% (m/v) de manitol. Neste caso, manitol foi pulverizado juntamente com a goma guar antes de adicionar a água. Após completa solubilização do polímero adicionou-se gradualmente a isoniazida previamente pulverizada ficando em agitação durante 30 minutos até obtenção de uma solução homogênea.

3.3.1.1.2- Teofilina

Após a completa dissolução dos polímeros em água adicionou-se a teofilina previamente pulverizada, ficando sob agitação durante cerca de 35 minutos até obtenção de uma solução homogênea.

Tabela 3.3: Variação dos parâmetros utilizados para a produção de micropartículas com teofilina (média \pm desvio padrão).

Formulação	T entrada (°C)	T saída (°C)	Velocidade de fluxo (mL/min)	Aspirador (%)
CS:Teo	*160 \pm 1	*115 \pm 3	*0.5 \pm 0.5	*80
	175 \pm 1	125 \pm 1	0.8 \pm 0.5	85
PHGG:Teo	*160 \pm 1	*115 \pm 3	*0.7 \pm 0.5	*80
	175 \pm 1	125 \pm 1	0.8 \pm 0.5	85

*Varia entre; CS: quitosano; Man: manitol; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada; Teo: teofilina.

3.3.1.1.3- Prednisolona

Após a completa dissolução do polímero (quitosano ou PHGG) adicionou-se Tween[®] 20 na mesma proporção do fármaco (10%), ficando sob agitação durante duas horas. Após completa homogeneização adicionou-se a prednisolona não pulverizada, ficando em agitação durante 19 horas de modo a permitir uma incorporação completa.

Tabela 3.4: Variação dos parâmetros utilizados para a produção de micropartículas com prednisolona (média ± desvio padrão).

Formulação	T entrada (°C)	T saída (°C)	Velocidade de fluxo (mL/min)	Aspirador (%)
CS- Tween20:Prednisolona	*120 ± 1	*87 ± 3	*0.8 ± 0.5	*65
	150 ± 1	95 ± 1	1.02 ± 0.5	80
PHGG- Tween20:Prednisolona	*120 ± 1	*98 ± 3	*0.84 ± 0.5	*70
	150 ± 1	109 ± 1	1.05 ± 0.5	85

*Varia entre; CS: quitosano; Man: manitol; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada.

3.3.2- Rendimento de produção das micropartículas

O rendimento de produção das micropartículas foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa das Micropartículas}}{\text{Massa total de sólidos na solução}}$$

3.3.3- Caracterização morfológica das micropartículas

A análise morfológica das micropartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM, Leo 435VP, UK). Para a sua visualização, as micropartículas foram dispersadas numa membrana adesiva de carbono colocada sobre um suporte de metal e posteriormente revestidas com uma membrana de irídio de 5 nm de espessura (Sistema preparador de amostras Q150T S/E/ES, Quorum Technologies, Reino Unido).

3.3.4- Caracterização das propriedades aerodinâmicas das micropartículas

O tamanho das micropartículas produzidas foi determinado por microscopia ótica (Olympus BH-2, Japão), tendo-se determinado o diâmetro de Feret (distância entre as duas tangentes em lados opostos da micropartícula). O cálculo baseou-se no diâmetro médio resultante da avaliação de 300 micropartículas (para cada um dos três replicados de cada formulação).

A densidade real das micropartículas foi determinada por picnometria de hélio (Micromeritics AccuPyc 1330 Pycnometer) (n = 3).

A densidade aparente de compactação (D_{ac}) foi obtida por medição do volume ocupado por uma massa conhecida de micropartículas, após compactação. A compactação das micropartículas foi permitida até que o volume permanecesse inalterado (n = 3).⁵⁶ A densidade aparente de compactação foi calculada pela fórmula:

$$D_{ac} = \frac{\text{Massa de partículas}}{\text{Volume final}}$$

O diâmetro aerodinâmico teórico foi estimado a partir do diâmetro Feret e da densidade real, de acordo com a seguinte fórmula.⁵⁷

$$D_{aer} = \text{Diâmetro geométrico} \times \sqrt{\text{densidade real}}$$

3.3.5- Determinação da eficácia de encapsulação dos fármacos

Para determinar a eficácia de encapsulação, pesaram-se 5 mg de micropartículas de cada amostra em análise e adicionaram-se 10 mL de HCl 0.1N. A mistura foi colocada sob agitação durante um período pré-determinado de forma a permitir a dissolução das micropartículas. Após dissolução procedeu-se a uma filtração do meio (0.22 μm , Frilabo, Portugal) e a quantidade de fármaco no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria UV, variando o comprimento de onda utilizado em função do fármaco. A quantificação de INH foi realizada a 265.5 nm e a da teofilina feita a 270.0 nm. Para ambos os polímeros foi

necessário recorrer a uma diluição dos sobrenadantes para proceder à quantificação (1:1 no caso da INH e 1:4 para a teofilina).

A eficácia de encapsulação foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficácia de encapsulação} = \frac{\text{Quantidade de fármaco determinado}}{\text{Quantidade teórica de fármaco}}$$

Foram preparadas retas de calibração para ambos os fármacos e ambos os polímeros.

3.3.6- Avaliação do perfil de libertação dos fármacos

O perfil de libertação dos fármacos foi determinado por incubação das várias formulações de micropartículas (CS:INH, CS:Teo, PHGG-Man:INH, PHGG:Teo) em PBS pH 7.4. Pesaram-se num tubo cerca de 5 mg de cada amostra de micropartículas e adicionaram-se 20 mL de PBS. Os tubos foram colocados num agitador orbital horizontal à velocidade de 80 rpm e incubados a 37 °C. A intervalos de tempo pré-determinados foram recolhidas amostras, as quais foram posteriormente filtradas (filtros 0.22 µm, Frilabo, Portugal).

A quantidade de fármaco libertado a cada tempo foi determinada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda adequado (265.5 nm e 270.0 nm para a isoniazida e teofilina, respetivamente) (n = 3). A quantificação requereu uma diluição das amostras, que foi de 1:2 para todas as amostras de micropartículas, com exceção da CS:INH, em que se usou uma diluição de 1:1. Foram preparadas retas de calibração para ambos os fármacos e ambos os polímeros.

3.3.7- Avaliação do perfil de citotoxicidade das micropartículas

A análise *in vitro* da citotoxicidade das formulações foi realizada pelo ensaio metabólico MTT.

Utilizaram-se células A549, que foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço, em 100 μL do mesmo meio utilizado para a cultura em frascos de cultura de células. As células foram cultivadas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO_2 durante 24 horas antes de adicionar as micropartículas. Após esse tempo, adicionaram-se sobre as células diferentes concentrações (0.1, 0.5 e 1.0 mg/mL) de micropartículas de cada formulação. Testaram-se formulações com e sem fármaco separadamente (CS, CS:INH, CS:Teo, PHGG, PHGG-Man, PHGG-Man:INH e PHGG:Teo), em dois tempos de exposição, 3 horas e 24 horas. Uma solução de SDS a 2% (v/v) foi utilizada como controlo positivo de morte celular. Todas as formulações foram preparadas como soluções/suspensões no meio de cultura de células sem FBS, que foi previamente aquecido antes da sua utilização. Após 3 horas ou 24 horas de incubação, as amostras foram removidas e foram adicionados 30 μL da solução de MTT (0.5 mg/mL em PBS, pH 7,4). Depois de 2 horas, os cristais de formazano formados entretanto foram solubilizados com 50 μL de DMSO. Quando estes já se encontravam completamente solubilizados, foi medida a absorvência de cada poço por espectrofotometria (Infinito M200, Tecan, Áustria) a 540 nm, a qual foi corrigida para uma absorvência de fundo utilizando um comprimento de onda de 650 nm.⁵⁸

A viabilidade celular (%) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (A - S)/(CM - S) \times 100$$

Em que A é a absorvência obtida para cada uma das concentrações das formulações a testar, S é a absorvência do SDS e CM é a absorvência obtida para as células não tratadas (incubadas em meio de cultura celular). A última leitura foi assumida como correspondendo a 100% de viabilidade celular. O ensaio foi realizado em três ocasiões, com seis réplicas para cada formulação e respetiva concentração.

IV- Resultados e discussão

4.1- Preparação e caracterização das micropartículas

Para a realização deste trabalho escolheram-se como materiais formadores de micropartículas o quitosano, cuja utilização está amplamente divulgada e explorada, e a goma guar parcialmente hidrolisada. Esta última é obtida por hidrólise da goma guar, processo que se traduz numa redução da viscosidade das soluções obtidas, mais adequada aos requisitos da atomização, processo de microencapsulação utilizado neste trabalho. Apesar da goma guar ser um polissacárido conhecido e utilizado na tecnologia farmacêutica, os trabalhos que reportam a sua utilização como agente formador de matriz de micropartículas são praticamente inexistentes.

As micropartículas de CS, PHGG e PHGG-Man foram preparadas pelo método de atomização. Os parâmetros da atomização foram ajustados de forma a produzir pós secos com propriedades de fluxo adequadas para o objetivo da administração pulmonar. Como tal, para cada um dos materiais a utilizar foram realizados diversos ciclos de atomização em que se variaram os diferentes parâmetros do processo, nomeadamente a temperatura de entrada, o aspirador e a velocidade de fluxo, até obtenção de um pó que apresentasse boas propriedades de fluxo. A tabela 4.1 apresenta os parâmetros otimizados utilizados na produção das diferentes formulações de micropartículas sem adição de fármaco.

Tabela 4.1: Parâmetros utilizados para a produção das diferentes formulações de micropartículas (n = 3, média ± desvio padrão).

Formulação	T entrada (°C)	T saída (°C)	Velocidade de fluxo (mL/min)	Aspirador (%)
CS	160 ± 1	116 ± 3	0.48 ± 0.5	80
PHGG	160 ± 1	114 ± 1	1.74 ± 0.5	70
PHGG-Man	170 ± 1	119 ± 7	1.59 ± 0.5	80

CS: quitosano; Man:manitol; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada.

Após várias tentativas de solubilização da goma guar, uma vez que esta formava soluções com elevada viscosidade devido ao elevado peso molecular e pela presença de um número elevado de ligações de hidrogénio, surge como alternativa a utilização da goma guar parcialmente hidrolisada (PHGG) que apresenta massa molar inferior e origina soluções pouco viscosas que permitem fazer a atomização.⁵⁹ Após várias atomizações da PHGG em que se testaram vários parâmetros, as micropartículas continuavam a apresentar más propriedades de fluxo, ocorrendo agregação. Decidiu-se então testar a associação de 0.5% (m/v) de manitol à formulação, uma vez que este é conhecido por levar à produção de micropartículas soltas. Verificou-se uma melhoria significativa, não se observando agregação. Esta está relacionada com o teor de humidade presente no pó produzido. Encontra-se reportado na bibliografia que o manitol, por ser pouco higroscópico leva a uma redução da humidade das micropartículas.⁶⁰ Como o teor de humidade baixa, as micropartículas têm um aspeto seco, sem agregação e com melhores propriedades de fluxo.

4.1.1– Associação de fármacos às micropartículas

Após a produção das micropartículas sem fármaco procedeu-se à produção das micropartículas com associação de fármaco, usando como ponto de partida os parâmetros já otimizados para as micropartículas sem fármaco. Foram utilizados três fármacos modelo de associação individual, tendo a sua inclusão exigido a otimização dos parâmetros de atomização de forma a produzir micropartículas com propriedades de fluxo adequadas. Cada um dos fármacos exigiu também um procedimento diferenciado para mistura com os polímeros e produção das micropartículas, como se descreve abaixo.

4.1.1.1- Isoniazida

A solubilização da isoniazida na solução de polímero era um processo demasiado prolongado. Assim, foi decidido proceder a uma pulverização prévia da isoniazida, tendo-se verificado que este procedimento levou a uma redução do tempo de solubilização, o que permitiu um decréscimo no tempo de preparação da formulação.

Após vários ciclos de atomização em que foram testados os mais diversos parâmetros, chegou-se a um conjunto de parâmetros que levam à produção de micropartículas com propriedades adequadas.

Os parâmetros otimizados para a formulação de CS:INH foram: temperatura de entrada 175 ± 1 °C, temperatura de saída 129 ± 5 °C, velocidade de fluxo 0.9 ± 0.5 mL/min, aspirador 80%.

Na formulação de PHGG:INH testaram-se várias condições, mas nenhuma resultou eficaz e as micropartículas continuavam a apresentar agregação. Então, foi testada a associação de 0.5% (m/v) de manitol à formulação, beneficiando da indicação de que a sua inclusão conduz à obtenção de micropartículas soltas, como referido anteriormente.⁵⁹⁻⁶⁰ Após a adição do manitol verificou-se que o pó produzido era seco, sem evidência de agregação. Os parâmetros de atomização que produziram um pó com boas propriedades de fluxo foram: temperatura de entrada 170 ± 1 °C, temperatura de saída 120 ± 5 °C, velocidade de fluxo 1.7 ± 0.5 mL/min, aspirador 80%.

4.1.1.2- Teofilina

Tal como para a isoniazida, também no caso da teofilina foi necessária a sua prévia pulverização a fim de diminuir o tempo de preparação da solução. Após vários ciclos de atomização em que se testaram várias condições, chegou-se a um conjunto de parâmetros que resultaram em micropartículas com boas propriedades de fluxo.

Na formulação CS:Teo os parâmetros otimizados foram: temperatura de entrada 175 ± 1 °C, temperatura de saída 124 ± 4 °C, velocidade de fluxo 1.9 ± 0.5 mL/min, aspirador 80%. Já na formulação de PHGG:Teo os parâmetros foram: temperatura de entrada 170 ± 1 °C, temperatura de saída 100 ± 2 °C, velocidade de fluxo 1.1 ± 0.5 mL/min, aspirador 85%.

4.1.1.3- Prednisolona

Sendo um fármaco hidrofóbico, a solubilidade da prednisolona em ácido acético 1% e água ultrapura (solventes utilizados para solubilizar os polímeros) é baixa, levando a que a produção de micropartículas por atomização não tenha sido bem-sucedida. Com a finalidade de melhorar a sua solubilidade testou-se a adição de Tween[®] 80 e Tween[®] 20 às formulações, sob hipótese de que estes agentes atuariam como solubilizantes. A sua utilização no âmbito de processos de atomização como agentes solubilizantes já tinha sido reportada anteriormente.⁶¹ Verificou-se no entanto que a atomização das formulações com Tween[®] 80 não conduziu a pós com boas propriedades de fluxo. O Tween[®] 20, pelo contrário, conduziu à preparação de micropartículas com propriedades de fluxo adequadas e foi portanto o excipiente selecionado para a produção de micropartículas com associação de prednisolona. É de referir que a adição de Tween[®] 80 nas formulações (em ambos os polímeros) fazia com que ocorresse a formação de agregados brancos compactos no pó e, para além disso, este agente ficava maioritariamente depositado no ciclone, não permitindo a recolha das micropartículas.

Nos vários ciclos de atomização realizados com a prednisolona em ambas as formulações, foi necessária a utilização de temperaturas mais baixas, uma vez que a temperaturas elevadas o pó apresentava uma formação aparente de flocos e ao baixar a temperatura havia uma melhoria substancial das suas propriedades, já não ocorrendo a formação de flocos.

Os parâmetros otimizados para a produção das micropartículas de CS-Tween20:Prednisolona foram: temperatura de entrada 130 ± 1 °C, temperatura de saída 70 ± 4 °C, velocidade de fluxo 1.2 ± 0.5 mL/min, aspirador 80%. Na formulação de PHGG-Tween20:Prednisolona os parâmetros foram: temperatura de entrada 150 ± 1 °C, temperatura de saída 87 ± 4 °C, velocidade de fluxo 0.9 ± 0.5 mL/min, aspirador 80%.

Não obstante a obtenção de parâmetros adequados para a formulação das micropartículas contendo prednisolona, a produção de amostras em quantidade suficiente para prosseguir os ensaios não foi possível devido a uma impossibilidade técnica (avaria no atomizador). Assim sendo, fez-se apenas a possível análise do diâmetro de Feret das micropartículas produzidas.

4.2- Caracterização das micropartículas

Na bibliografia encontra-se descrito que as micropartículas produzidas por atomização dependem de inúmeros fatores, incluindo o tipo de composto a ser encapsulado e o fluxo da solução no atomizador.⁶¹⁻⁶²

No decurso deste trabalho prepararam-se as formulações de micropartículas de CS, PHGG e PHGG-Man, obtendo-se rendimentos de produção das micropartículas considerados muito satisfatórios, na ordem dos 75-85%. Após a inclusão dos fármacos nas formulações, e como se observa na tabela 4.2, o rendimento baixou ligeiramente na formulação CS:INH (75% para 64%, aproximadamente) e PHGG:Teo (85% para 75%). Este facto não foi observado nas restantes formulações, em que se obtiveram rendimentos de produção entre 80% e 84%. Não obstante as diminuições observadas em alguns casos, os rendimentos obtidos são de forma geral considerados bastante satisfatórios. As diferenças observadas no rendimento de produção de micropartículas podem ser explicadas pela perda de material durante o processo de atomização, o que ocorre não só porque as micropartículas aderem às paredes do ciclone⁶³, mas também porque as micropartículas de tamanho mais reduzido (bem abaixo de 1 μm) não chegam a depositar-se, sendo eliminadas.

Outro factor que pode ter influenciado a redução do rendimento foi que no caso da formulação de CS:INH se aumentou a velocidade de fluxo a fim de melhorar as propriedades do pó. Na literatura encontra-se descrito que a velocidade de fluxo mais elevada pode diminuir o rendimento de produção de micropartículas pois há uma maior agregação das partículas no ciclone, o que dificulta a sua recolha.⁶⁴ No entanto, este efeito não foi observado na formulação PHGG:Teo. Com a diminuição da velocidade de fluxo, esperava-se um aumento do rendimento, mas o que se observou foi uma ligeira diminuição deste. O que também pode influenciar a obtenção de um rendimento de produção de micropartículas mais elevado é a utilização do ciclone de alta performance.⁶⁵ Este acessório foi desenvolvido pela Buchi justamente com esse intuito. Neste trabalho foi utilizado o ciclone de alta performance em todos os ciclos de atomização, com excepção das formulações com CS, CS:INH e PHGG:Teo que correspondem aos valores mais baixos dos rendimentos de produção. Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo já tinha sido verificado o aumento de rendimento quando se utiliza este acessório em vez do separador ciclónico convencional.

Tabela 4.2: Rendimento de produção de micropartículas (n = 3, média ± desvio padrão).

Formulação	Rendimento de produção das micropartículas (%)
CS	75.6 ± 2.1
CS:INH	64.5 ± 2.4
PHGG	85.2 ± 3.7
PHGG-Man	84.7 ± 3.7
PHGG-Man:INH	84.3 ± 6.0
CS:Teo	80.1 ± 2.3
PHGG:Teo	75.2 ± 4.1

CS: quitosano; INH: isoniazida; Man:manitol; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada; Teo: teofilina.

Em termos de morfologia é possível verificar, pela análise das imagens obtidas por SEM, que as micropartículas de CS sem fármaco (Figura 4.1A) apresentam uma morfologia esférica e com uma superfície bastante rugosa, o que concorda com outros estudos reportados.⁶⁶⁻⁶⁸ A associação dos fármacos introduz algumas alterações morfológicas, já que para ambos os fármacos (isoniazida e teofilina), se observa que as micropartículas mantêm a sua forma esférica mas diminuem a rugosidade da superfície, a qual se apresenta mais lisa (Figuras 4.1B e 4.1C). A alteração morfológica ocorrida após a associação do fármaco já foi reportada no estudo de Kundawalaa e colaboradores.⁶⁹

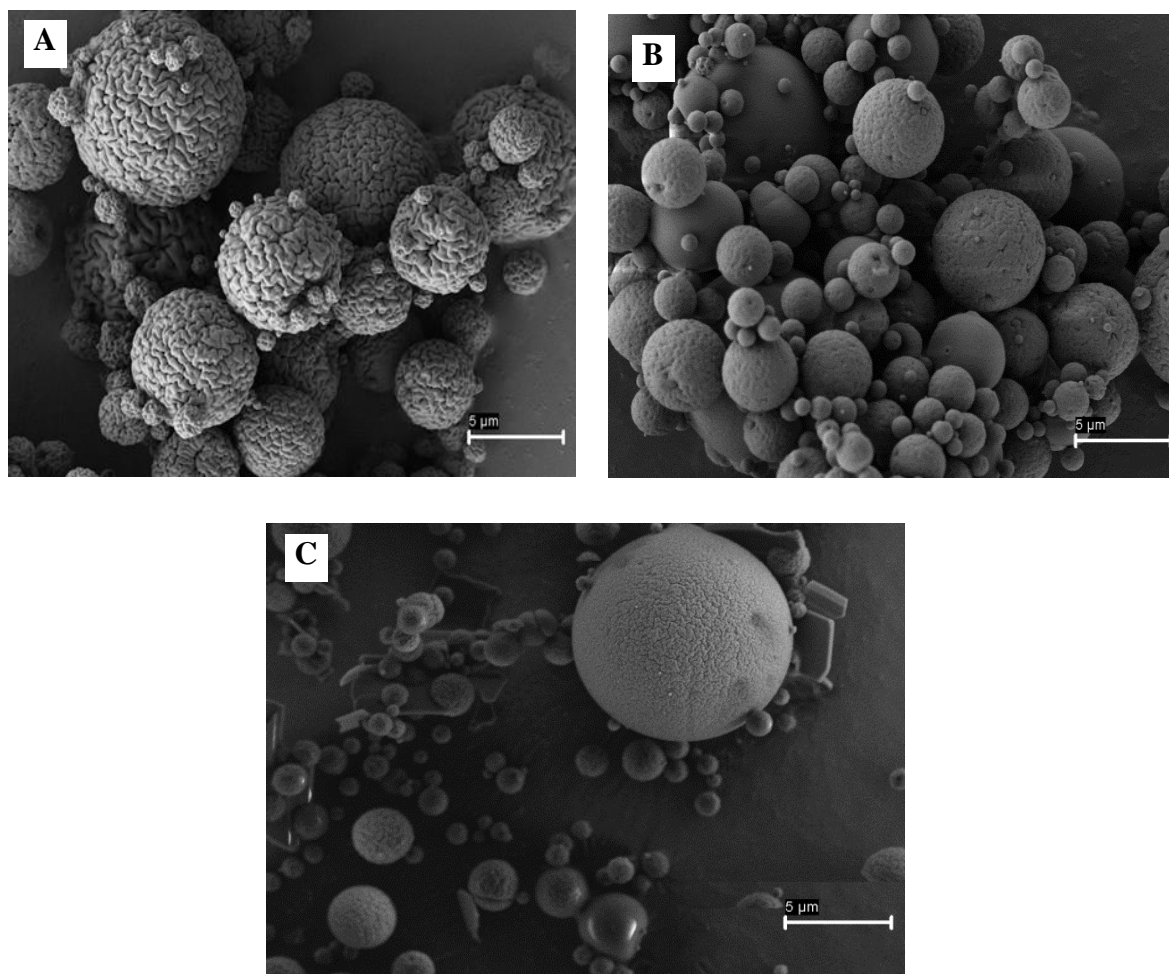


Figura 4.1: Microfotografia obtida por microscopia eletrônica de varrimento (SEM, ampliação 2500x) de micropartículas de quitosano com e sem fármaco: **A)** CS; **B)** CS:INH; **C)** CS:Teo.

As micropartículas produzidas com o polímero PHGG apresentaram uma morfologia muito heterogênea. A superfície é tendencialmente mais lisa do que a das micropartículas de CS, mas na sua maioria apresentam uma forma irregular (Figura 4.2A). Resultados semelhantes foram reportados por Sharma e seus colaboradores num trabalho com micropartículas de goma guar.⁷⁰

A adição de manitol às formulações, por seu lado, traduz-se na apresentação de uma superfície bastante irregular, como se vê nas Figuras 4.2 B e 4.2 C. Pelo contrário as micropartículas de PHGG:Teo apresentam uma morfologia mais homogênea, mais esférica e com uma superfície lisa.

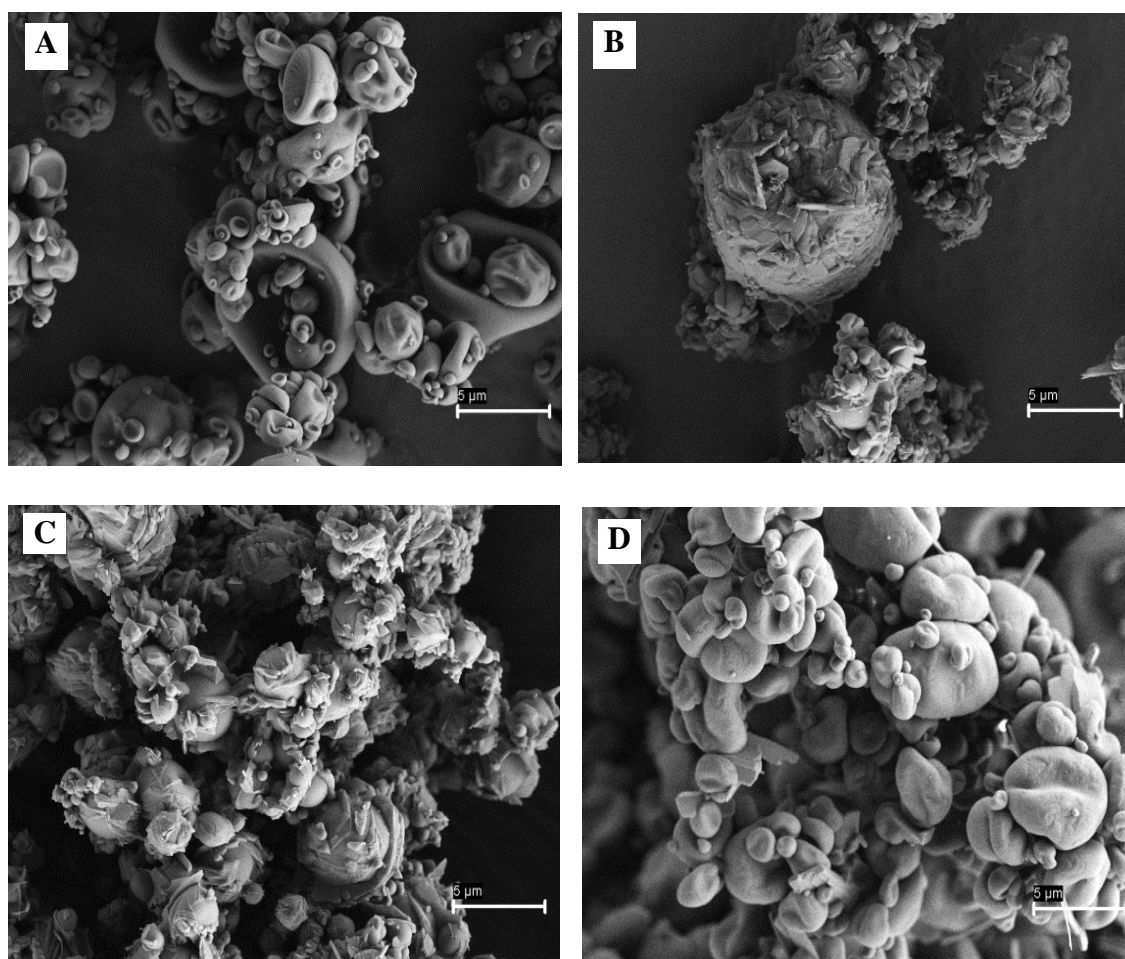


Figura 4.2: Microfotografia obtida por microscopia eletrônica de varrimento (SEM, ampliação 2500x) de micropartículas de quitosano com e sem fármaco: **A)** PHGG; **B)** PHGG-Man; **C)** PHGG-Man:INH; **D)** PHGG-Man:Teo.

Já foi reportado na bibliografia que a morfologia é influenciada pela capacidade de hidratação das gomas, o que caracteriza a sua propriedade potencial de formar hidrogel.⁷¹ A irregularidade na superfície das micropartículas observada após a adição do manitol pode ser explicada pela sua propriedade higroscópica baixa, ou seja, a presença do manitol pode interferir na interação que existe entre as moléculas de água e o polímero, diminuindo a sua capacidade de formação de superfície esférica.

Para que as formulações inaláveis tenham sucesso terapêutico, as suas propriedades aerodinâmicas têm de ser adequadas, pois influenciam o seu padrão de dispersão e de sedimentação.^{64,70} Deve haver uma combinação entre vários fatores, nomeadamente a

densidade e o diâmetro geométrico das formulações, de tal forma que o diâmetro aerodinâmico resultante esteja compreendido entre 1-5 μm , intervalo considerado ótimo para a administração pulmonar com alcance da zona alveolar.⁷¹⁻⁷²

Como se pode observar na tabela 4.3, todas as formulações foram produzidas com um diâmetro de Feret entre 1 e 2 μm , apresentando as micropartículas uma densidade real aproximada de 1.5 g/cm^3 e uma densidade aparente de compactação aproximada de 0.45 g/cm^3 . Estas características atribuem às micropartículas um diâmetro aerodinâmico entre 1.3 e 2.3 μm , o qual resulta diretamente da conjugação da densidade real e o diâmetro Feret. Por conseguinte, os pós produzidos foram considerados teoricamente adequados para a administração pulmonar local de fármacos.

A análise dos resultados permite constatar que a incorporação dos fármacos nas formulações não conduz a alterações significativas de tamanho no caso do CS, enquanto que para as formulações com o polímero PHGG se verifica um ligeiro aumento de tamanho, ainda que não significativo dados os elevados valores de desvio padrão. O efeito (ou sua ausência) da incorporação de fármacos no tamanho das micropartículas está relacionado com as interações existentes entre o fármaco e o polímero, pelo que não é um efeito constante que possa ser generalizado.

Tabela 4.3: Diâmetro de Feret, densidade real, densidade aparente e densidade aparente de compactação das micropartículas produzidas (n = 3, média ± desvio padrão).

Formulação	Diâmetro de Feret (µm)	Densidade real (g/cm³)	Densidade aparente de compactação (g/cm³)	Diâmetro aerodinâmico teórico (µm)
CS	1.9 ± 1.04	1.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.3 ± 1.1
CS:INH	1.9 ± 1.1	1.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	2.3 ± 0.6
CS:Teo	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.2 ± 0.1
CS: Tween20: Prednisolona	1.9 ± 0.1	n.d	n.d	n.d
PHGG	1.1 ± 0.8	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	1.3 ± 0.5
PHGG-Man	1.8 ± 0.95	1.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.2 ± 0.5
PHGG-Man:INH	1.6 ± 0.92	1.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.9 ± 0.5
PHGG:Teo	1.5 ± 2.91	1.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	2.0 ± 1.5
PHGG: Tween20: Prednisolona	1.6 ± 2.55	n.d	n.d	n.d

CS: quitosano; INH: isoniazida; Man: manitol; n.d: não determinado; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada; Teo: teofilina.

4.3- Determinação da eficácia de encapsulação dos fármacos

A eficácia de encapsulação de um fármaco no interior das micropartículas poliméricas depende de vários fatores, como as propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero, as suas interações, o rácio fármaco/polímero, as condições utilizadas durante o processo de produção das micropartículas, bem como o tamanho das mesmas.⁷³⁻⁷⁴

Na tabela 4.4 estão descritas as eficácias de encapsulação para as diferentes formulações de micropartículas produzidas, as quais variam entre 69% e 89%. Estes valores de eficácias de encapsulação indicam que alguma quantidade de fármaco foi perdida durante o processo de produção das micropartículas.

Tabela 4.4: Eficácia de encapsulação obtida nas diferentes formulações de micropartículas (n = 3, média \pm desvio padrão).

Formulação	Eficácia de encapsulação (%)
CS:INH	81.0 \pm 1.4
PHGG-Man:INH	68.8 \pm 4.6
CS:Teo	71.4 \pm 4.4
PHGG:Teo	88.8 \pm 4.6

CS: quitosano; PHGG: goma guar parcialmente hidrolisada; INH: isoniazida; Man:manitol; Teo: teofilina

A eficácia de encapsulação é a percentagem de fármaco quantificado nas micropartículas em relação ao total de fármaco adicionado inicialmente para preparação da formulação. Este é um parâmetro crítico que deve ser otimizado no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos. É importante referir que a determinação que é feita não permite, por exemplo, distinguir entre as moléculas verdadeiramente encapsuladas no interior da matriz das micropartículas daquelas que se aderem, eventualmente, à superfície das mesmas.⁷⁵⁻⁷⁶

Muitos estudos assumem que as micropartículas produzidas por atomização, conduzem a uma eficácia de encapsulação de 100%, dado que na atomização ocorre apenas um processo de secagem dos materiais que compõem gotas de um spray. No entanto, como se comprova nos resultados apresentados, é muito importante fazer uma determinação exata da quantidade de fármaco encapsulada, já que ocorrem algumas perdas.

4.4- Determinação do perfil de libertação

O estudo do perfil de libertação foi realizado em PBS pH 7.4, o que simula o pH fisiológico do ambiente pulmonar,⁷⁶ e a uma temperatura de 37 °C, que é a temperatura do organismo. De uma forma geral, a libertação foi bastante rápida em todas as formulações. Pode-se observar na figura 4.3 que para as micropartículas de CS aos 45 minutos a isoniazida já havia atingido o seu máximo de libertação. A teofilina atinge a sua libertação máxima aos 90 minutos. No entanto, cerca de 80% dos fármacos libertam em aproximadamente 15-20 minutos.

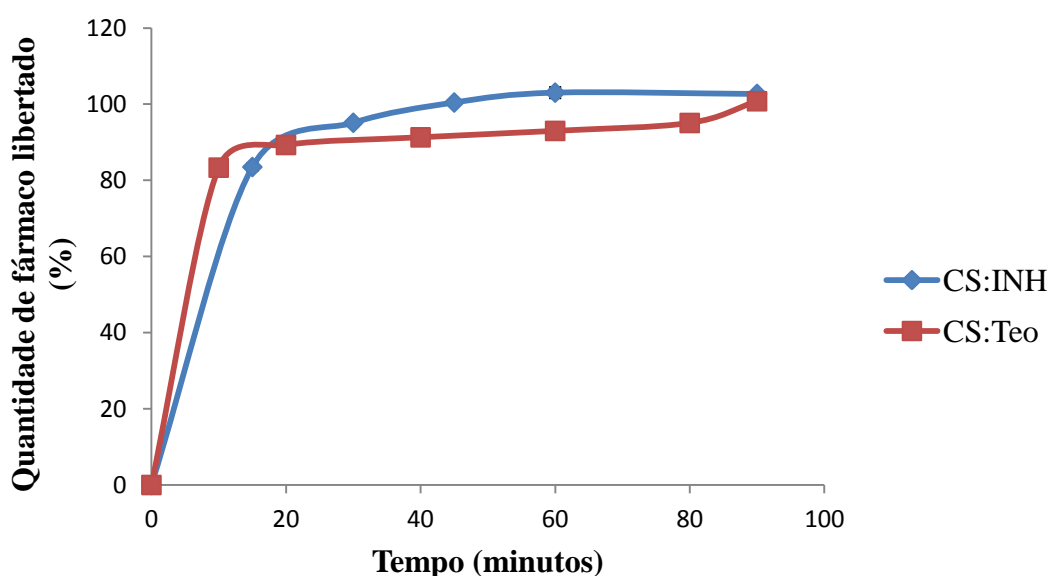


Figura 4.3: Perfil de libertação das micropartículas de CS (n = 3, média ± desvio padrão).

Nas formulações de PHGG (Figura 4.4) ocorreu uma rápida libertação da isoniazida uma vez que aos 10 minutos aproximadamente é possível observar que 80% do fármaco já havia sido libertado, atingindo o seu máximo de libertação aos 30 minutos. Um comportamento semelhante foi observado no perfil de libertação da teofilina, em que no mesmo espaço de tempo (10 minutos) aproximadamente 90% do fármaco já havia sido libertado. Após 30 minutos ele atinge o seu máximo de libertação.

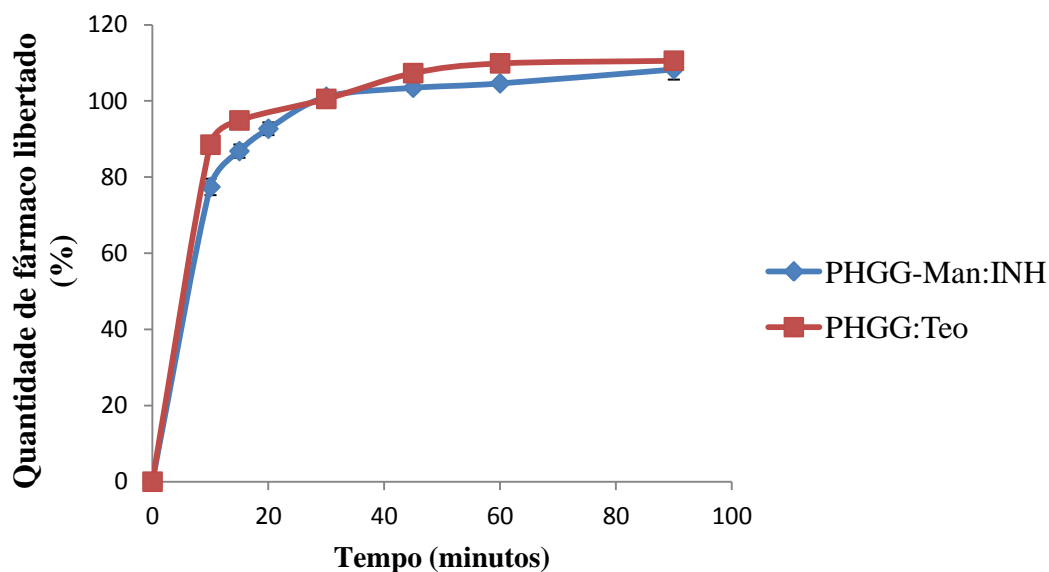


Figura 4.4: Perfil de libertação das micropartículas de PHGG (n = 3, média ± desvio padrão).

O tamanho das micropartículas, as propriedades da matriz e a solubilidade do fármaco no meio de dissolução podem influenciar a velocidade de libertação do fármaco a partir das micropartículas poliméricas.^{65,68} A libertação de fármacos hidrofílicos a partir de micropartículas compostas por polímeros também hidrófilicos ocorre de forma mais rápida, havendo geralmente uma libertação inicial muito rápida (efeito de *burst*). Esta característica de libertação rápida do fármaco ocorre em fármacos solúveis em água, mas também em alguns fármacos menos solúveis em água como é o caso da dexametasona.⁷⁹

Assim, a libertação rápida da isoniazida e teofilina a partir das micropartículas de CS e PHGG preparadas pelo método de atomização pode ter sido provocada por vários factores, nomeadamente a natureza hidrofílica dos polímeros e fármacos, e por as micropartículas apresentarem tamanhos reduzidos.

4.5- Avaliação da citotoxicidade das micropartículas

O ensaio de MTT avalia a atividade metabólica das células após exposição às amostras e tem sido muito utilizado para avaliação dos transportadores de fármacos.⁸⁰ Este ensaio avalia a capacidade das células para reduzir o reagente MTT, uma ação que é dependente do

metabolismo mitocondrial. A verificação da redução da atividade metabólica das células é uma indicação de que ocorreram danos nas células.⁸¹

As células A549 foram cultivadas e expostas a diferentes concentrações (0.1, 0.5 e 1 mg/mL) das várias formulações de micropartículas, com e sem fármaco (CS, CS:INH, CS:Teo, PHGG, PHGG-Man, PHGG-Man:INH, PHGG:Teo). A exposição durante 3 horas às micropartículas de CS com e sem fármaco não levou a uma diminuição da viabilidade celular (Figura 4.5), com valores permanecendo nos 90-100%. É importante salientar que no caso das formulações de CS e CS-Teo, mas de forma mais acentuada na primeira, à concentração de 0.1 mg/mL se obtiveram valores de viabilidade superiores a 100%, como se pode verificar na figura 4.5. Uma possível explicação para este facto é a ocorrência de um fenómeno de hormése, que tem sido definida como uma relação da concentração-resposta, em que uma resposta estimulatória ocorre em baixas concentrações e uma resposta inibitória ocorre em concentrações elevadas, o que resulta em um resultado inverso ao que seria de esperar.⁸²⁻⁸³ Outra possível explicação para este facto é o quitosano ser um polissacarídeo natural, podendo promover a proliferação celular, embora isso devesse ocorrer igualmente para concentrações superiores.⁸⁰

A inclusão dos fármacos levou à observação de valores de viabilidade celular à volta de 100%, independentemente da concentração testada.

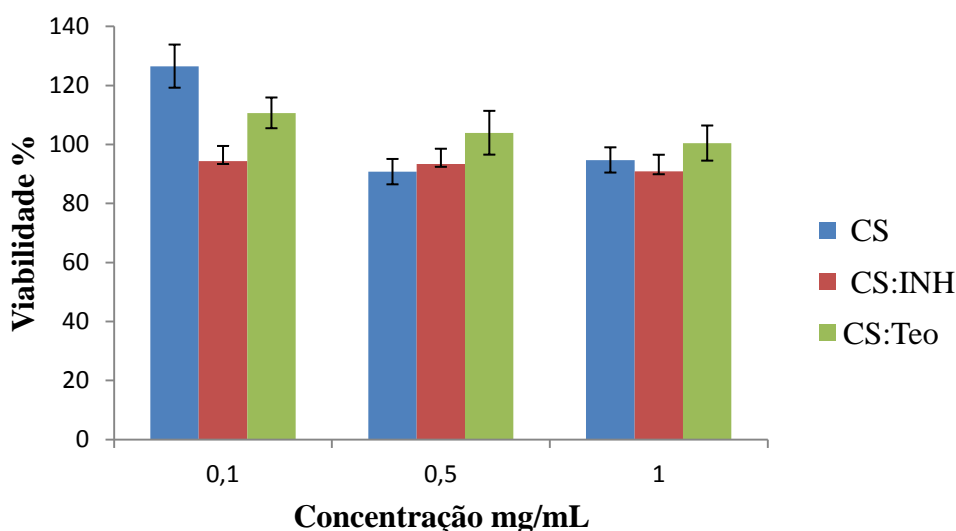


Figura 4.5: Viabilidade celular das células A549 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 3 horas de exposição às diferentes formulações de micropartículas de CS. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).

Neste estudo as células foram também expostas às amostras por um período de tempo prolongado (24 horas), a fim de verificar eventuais diferenças no perfil de citotoxicidade das formulações entre diferentes tempos de exposição (figura 4.6). Conforme o observado às 3 horas, após 24 horas de exposição às formulações a viabilidade celular manteve-se entre os 90-100%, o que significa que as formulações não causam danos nas células após um período mais prolongado de exposição. Ao contrário do que ocorreu após as 3 horas de incubação, não se observaram sinais de proliferação celular aumentada em qualquer das formulações.

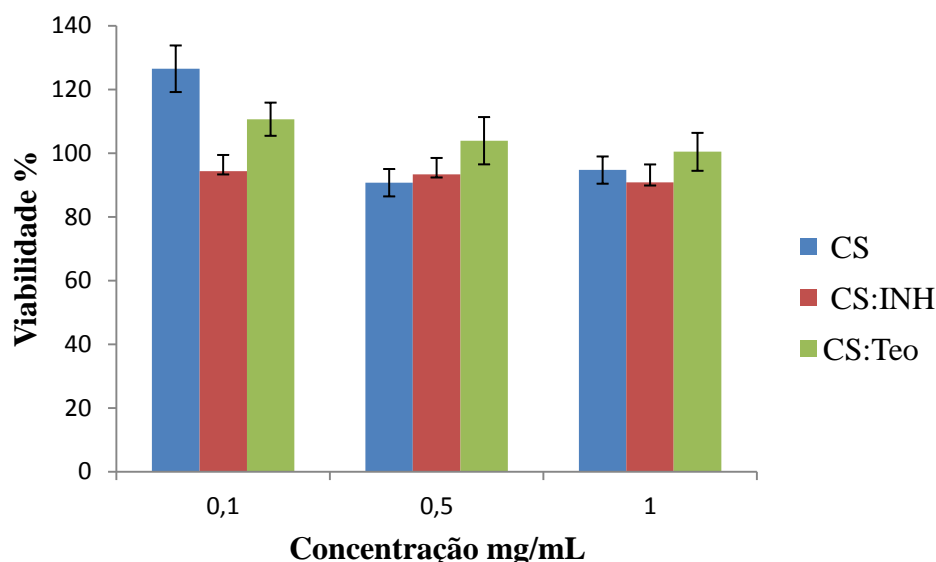


Figura 4.6: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 24 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de CS. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).

O mesmo ensaio foi realizado para as micropartículas com matriz de PHGG, estando os resultados representados na figura 4.7. Na exposição das células às diferentes formulações durante as 3 horas observou-se que não ocorreu perda considerável de viabilidade celular em nenhuma das formulações.

No caso das formulações de PHGG-Man:INH (nas três concentrações) e PHGG:Teo observou-se que a viabilidade celular ultrapassou os 100% para a concentração de 0.1 mg/mL), uma ocorrência possivelmente justificada pelas mesmas razões apontadas anteriormente para o CS. De uma forma geral, todas as amostras resultaram em valores de viabilidade celular de aproximadamente 90-100%, sendo o valor mais baixo registado para a PHGG-Man à concentração mais elevada (82.2%).

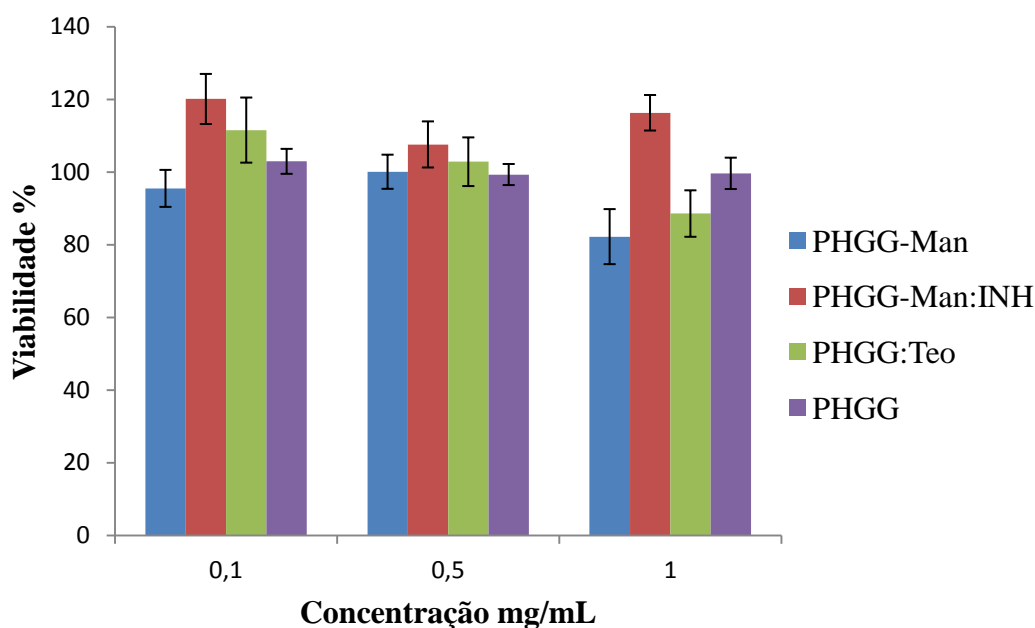


Figura 4.7: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 3 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de PHGG. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).

A exposição por 24 horas (figura 4.8) revela que a viabilidade celular se manteve igualmente entre os 90-100%, denotando uma ausência generalizada de citotoxicidade nas condições testadas. Tal como observado às 3 horas, a formulação de PHGG:INH ultrapassou os 100% de viabilidade celular nas três concentrações, o que parece indicar que de alguma forma induz proliferação celular.

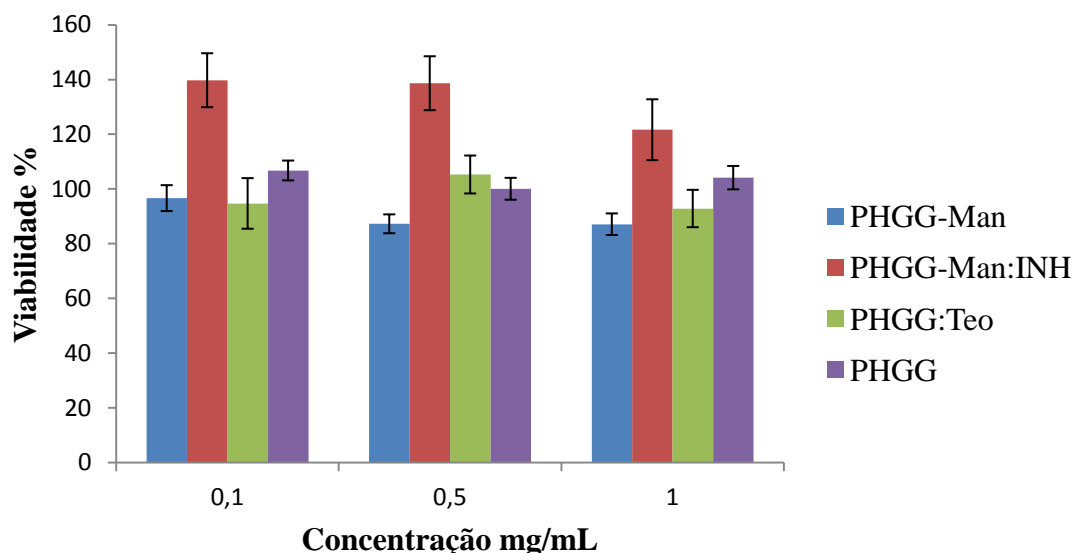


Figura 4.8: Viabilidade celular das células A459 medida pelo ensaio metabólico de MTT depois de 24 horas de exposição das diferentes formulações de micropartículas de CS. Os dados representam a média \pm SEM (n = 3, seis repetições por experiência para cada concentração).

Independentemente de algumas variações observadas nos valores de viabilidade celular registados após a exposição das células às formulações de micropartículas desenvolvidas, de uma forma geral esses valores situaram-se bem acima dos 70%, limite descrito pela ISO 10993 para se considerar um efeito citotóxico.⁸⁴ Assim, os resultados obtidos para todas as formulações são bons indicadores de biocompatibilidade. No entanto, a avaliação de um perfil de biocompatibilidade exige a realização de ensaios complementares para avaliar outros aspetos da resposta celular e estabelecer uma tendência.

V- Conclusão

Este trabalho demonstra que o processo de atomização permite produzir com sucesso micropartículas poliméricas utilizando goma guar parcialmente hidrolisada, um polímero cuja atomização nunca foi reportada, e quitosano, que por contraste é um polímero muito utilizado. A associação de fármacos foi realizada com sucesso, tanto no caso dos fármacos hidrofílicos (isoniazida e teofilina), como hidrofóbicos (prednisolona). Foi ainda verificado que a otimização dos parâmetros de atomização permite modular as propriedades finais das micropartículas, tendo-se conseguido produzir micropartículas com propriedades aerodinâmicas adequadas para administração pulmonar de fármacos por inalação. As propriedades do polímero e do fármaco que constituem as micropartículas afetam a sua morfologia, verificando-se formas mais esféricas nas micropartículas produzidas com quitosano. A adição de manitol às micropartículas de goma guar parcialmente hidrolisada (com e sem fármaco) induz a alteração da sua morfologia, atribuindo uma superfície mais irregular. As micropartículas produzidas apresentam uma densidade real aproximada de 1.5 g/cm^3 , uma densidade aparente de compactação aproximada de 0.45 g/cm^3 e um diâmetro aerodinâmico teórico que varia entre 1.3 e $2.3 \text{ }\mu\text{m}$, sendo considerados teoricamente adequados para a administração pulmonar. Para os fármacos isoniazida e teofilina, verificou-se um perfil de libertação rápido em PBS pH 7.4, que simula o ambiente pulmonar, tendo-se registado que de uma forma geral cerca de 80% dos fármacos se liberta em 15 e 10 minutos (CS e PHGG respetivamente). A libertação de fármaco das micropartículas de quitosano é mais prolongada que nas micropartículas que PHGG, que atingem a sua libertação máxima pelos 15 minutos. As formulações de micropartículas desenvolvidas foram testadas quanto à sua citotoxicidade em células A549, que representam o epitélio alveolar, tendo-se observado que não há qualquer efeito citotóxico em concentrações até 1 mg/mL e para um tempo de exposição de 24 horas.

Este conjunto de resultados demonstra que as micropartículas de quitosano e goma guar com fármacos associados têm potencial de aplicação na entrega local de fármacos por via pulmonar.

VI- Referências Bibliograficas

1. M. Smola, T. Vandamme, A. Sokolowski, Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases, *International journal of Nanomedicine*, 3 (2008) 1-19.
2. J.S. Patil, S. Sarasija, Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review, *Lung India*, 29 (2012) 44-9.
3. P.Chaturvedi, H. Solanki, Pulmonary drug systems: Review, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 5 (2013) 7-10.
4. M. Beck-Broichsitter, T. Schmehl, W. Seeger, Evaluating the Controlled Release Properties of Inhaled Nanoparticles Using Isolated, Perfused, and Ventilated Lung Models, *Journal of Nanomaterials*, 2011 (2010) 1-16.
5. C.M. Evan, J.S. Koo, Airway mucus: the good, the bad, the sticky, *Pharmacology & Therapeutics*, 121 (2009) 332-348.
6. H. Fehrenbach, Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited, *Respiratory Research*, 2 (2001) 33-46.
7. R. Gumbleton, Caveolae as potencial macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49 (2001) 338-344.
8. K.K. Jain, Drug Delivery Systems-an overview, *Methods in Molecular Biology*, 437 (2008) 1-50.
9. J. Georke, Pulmonary surfactant: functions and molecular composition, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Basics of Disiese*, 1408 (1998) 79-98.
10. ND. Shah, VV. Shad, WD. Chivate, Pulmonary Drug Delivery: A Promising Approach, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (2012) 33-37.
11. M.A. Dolovich, Influence of inspiratory flow rate, particle size, and airway caliber on aerolized drug delivery to the lung, *Respiratory Care*, 45 (2000) 597-608.

12. P.R. Phipps , I. Gonda , S.D. Anderson , D.Bailey , G. Bautovich, Regional deposition of saline aerosols of different tonicities in normal and asthmatic subjects, *European Respiratory Journal*, 7 (1994) 1474-1482.
13. C. Ehrardt, M. Laue, K.-J. Kim, In vitro models of the alveolar epithelial barrier, In: *Biothecnology Pharmaceutical Aspects VII*, C. Erhardt, K.-J Kim, Eds . *Drug Absorption Studies*, (2008) 258-282.
14. P. Tangri, Approaches to pulmonary drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2 (2011) 1616-1622.
15. R. Sunitha, Drug delivery and its developments for pulmonary system: review article, *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 1 (2001) 66-82
16. D.J. Burgess, A.J. Hitkey, Microsphere technology and application. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J.Swarbrick , J.C. Boylan , Eds. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 10 (1994) 129.
17. N.R. Laboris, M.B. Dolovich, Pulmonary Drug Delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic efectiveness of aerosolised medications, *Journal Clinical Pharmacology*, 56 (2003) 588-599.
18. M.A. Dolovich, Influence of inspirations flow rate, particle size, and airway caliber on aerolized drug delivery to the lung, 45 (2000) 597-608
19. B.K. Rubin, Air and Soul: The Science and Aplication of aerosol Therapy, *Respiratory Care*, 55 (2010) 912-921.
20. N. R. Labiris, M. B Dolovich, Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56 (2003) 600-612.
21. W. Yang, J.I. Peters, R.O, Williams, Inhaled nanoparticles-a current review, *International Journal Of Pharmaceutics*, 356 (2008) 239-247.
22. N. Singh, K.S.Y. Hemant,[...], H.G. Shivakumar, Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery, *Researchin Pharmaceutical Sciences*, 5 (2010) 66-77.
23. W. Berger, Aerossol devices and asthma therapy, *Current Drug Delivery*, 6 (2009) 38-49.

24. J.B. Fink, Metered-dose inhalers, dry power inhalers, and transitions, *Respiratory Care*, 45 (2000) 623-635.
25. G.P. Oliveira, W.A. Zin, P.R. Rocco, Inhalation systems for asthma: advantages and disadvantages, *Pulmão RJ*, 14 (2005) 251-257.
26. S. Onoue, S. Misaka, Y. Kawabata, S. Yamada, New treatments for chronic obstructive pulmonary disease and viable formulation/device options for inhalation therapy, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6 (2009) 793-811.
27. A.F. Tena, P.C. Clara, Deposition of inhaled particles in the lungs, *Archivos Bronconeumología*, 48 (2012) 240-260.
28. B. Lansley, Mucociliary clearance and drug delivery via the respiratory tract, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11 (1993) 299-327.
29. L.F. Pimentel, A.T. Júnior, V.C. Mosqueira, Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43 (2011) 1413-1428.
30. H.S. Kas, L.Oner, Microencapsulation using coacervation/phase separation: an overview of the technique and applications, In: Wise D.L., Ed. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology*. New York, Marcel-Dekker, (2000) 301-328.
31. R.A. Jain, The manufacturing techniques of variou drug loaded biodregradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices, *Biomaterials*, 2 (2000) 2475-2490.
32. P. Severino, M.H.A. Santana, S.M. Malmonge, E.B. Souto, Polymers for drug delivery systems formulations, *Polímeros*, 21 (2011) 361-368.
33. B.N. Estevinho, F. Rocha, L. Santos, A. Alves, Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review, *Trends in Food Science & Technology* 31 (2013) 138-155.
34. S. Singh, D. Dixit, A Review on spray drying: Emerging technology in food industry, *International Journal of Applied Engineering and Technology*, 4 (2014) 1-8.
35. A.B.D. Nandiyanto, K. Okuyama, Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges, *Advanced Power Technology*, 22 (2011) 1-19.

36. C.J. Aundhia, J.A. Raval, M.M. Patel, N.V. Shah, S.P. Chauhan, G.U. Sailor, A.R. Javia, R.A. Mahashwari, Spray Drying in the pharmaceutical Industry- A Review, *Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (2011) 63-65.
37. R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*, 21 (2000) 2475-2490.
38. Wu. XS, Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part II, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 12 (2001) 21-24.
39. K. Vishakha S, B. Kishor D, R. Sudha S, Natural Polymers – A Comprehensive Review, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3 (2012) 1597-1613.
40. P.Sorlier, A. Denuzière, C.Viton, A.Dormard, Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan, *Biomacromolecules*, 2 (2001) 765-772.
41. M.N.V.R. Kumar, Chitin and Chitosan applications, *Reactive functional polymers*, 46 (2000) 1-27.
42. P.Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, A. Dormard, Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan, *Biomacromolecules*, 2 (2001) 765-772.
43. J. Berger, M. Reis, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 (2004) 19-34.
44. S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M.Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100 (2004) 5-28.
45. G. Crini, M.P. Badot, Applications of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review literature, *Progress in Polymer Science*, 33 (2008) 399-447.

46. H.E. Junginger, J.C.Verhoef, macromolecules as safe penetration enhances for hydrophilic drugs-a fiction, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1 (1998) 370-376.
47. M.N.V. Ravi Kumer, A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Funcional Polymers*, 46 (2000) 01-27
48. R.Veldhuizen, K. Nag, S. Orgeig, F. Possamayer, The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophys Acta (BBA) Molecular Basics of Disease*, 1408 (1998) 90-108.
49. S. Tripathy, M.K, Das, Guar Gum: Present Status and applications, *Journal Pharmaceutical and Scientific innovation*, 2 (2013) 24-28.
50. A. Srichamroen, Influence of Temperature and Salt on Viscosity Property of Guar Gum, *Naresuan University Journal*, 15 (2007) 55-62.
51. K.N. Venugopal, M. Abhilash, Study of Hidration Kinetics and Rheological Behaviour of Guar Gum, *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 1 (2010) 28-39.
52. T. Shaihh, S.S. Kumar, Pharmaceutical and pharmacological profile of guar gum an overview, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2011) 38-40.
53. T.Yamamoto, S.Yamamoto, I. Miyahara , Y. Matsumura , A. Hirata , M. Kim, Isolation or a β -Mannan Hydorlyzing Enzyme and Hydrolysis of Guar Gum by the Enzyme Isolated, *Denpun Kagaku*, 37 (1990) 99-105.
54. N.A. Greenberg, D. Sellman, Partially hydrolyzed guar gum as a source of fiber, *Cereal Foods World*, 43 (1998) 703–707.
55. D.-C. Chu, L.R. Juneja, Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolized Guar Gum as Dietary Fiber, *Journal Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42 (2008) 1-7.
56. I. El-Gibaly, Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparasion with non-floating chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 294 (2002) 7-21.
57. W.C. Hinds, *Aerosol technology : properties, behavior, and measurement of airborne particles*, Wiley, New York, 1999.

58. J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Research*, 47 (1987) 936-942
59. C. Sinsuebpol, J. Chatchawalsaisin, Poj Kulvanich, Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery, *Drug Design, Development and therapy*, 7 (2013) 861- 8.
6. M. G. O'Toole, R. M. Henderson, P. A. Soucy, B. H. Fasciotto, P. J. Hoblitzell, R. S. Keynton, W. D. Ehringer, A. S. Gobin, Curcumin Encapsulation in Submicrometer Spray-Dried Chitosan/Tween 20 Particles, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 2309–2314.
61. P. He, S.S. Davis, Chitosan microspheres prepared by spray drying, *International Journal of Pharmaceutics*, 187 (1999) 53-65.
62. G. Tayler, I. Kellaway, Pulmonary drug delivery. In: A. Hillery, Lloyd. ASwarbrick, J(Eds), *Drug Delivery and Targeting*. Taylor & Francis, New York, 2001 (269-300).
63. P. Johnsen, H.P. Merkel, B. Gander, Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying, *International Journal of Pharmaceutics*, 50 (2000) 413-417.
64. M. Maury, K. Murphy, S. Kuman, L.Shi, G.Lee, Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer, *International Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 (2005) 565-573.
65. A. Ko, S.J. Hwang, H.J. Park, S.J. Lee, Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 249 (2002) 165-174.
66. Y. Tão, H.-L. Zhang, [...], Z.-Q. Su, Preparation of chitosan and Water-soluble chitosan Microspheres via spray-drying method to lower blood lipids in rats fed with high-fat diets, *International Journal of molecular Sciences*, 14 (2013) 4174-4184.
67. P.He, S.S.Davis, L. Illum, Chitosan microspheres prepared by spray-drying, *International Journal of Pharmaceutics*, 187(1999) 53-65.

68. B.F. Oliveira, M.H.A. Santana, M.I. Ré, Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D, L-Glyceraldehyde as a potencial drug delivery system: preparation and characterization, Processing of the 14th international drying symposium, B (2004) 1166-1173.
69. A. J. Kundawalaa, V.A. Patelb, H. V. Patela, Dhaglaram Choudharya Influence of Formulation Components on Aerosolization Properties of Isoniazid Loaded Chitosan Microspheres, Research Article, 3 (2011) 297-302.70.J. Sharma, L. Kaur, N. Kanuja, M. Nagpal, R. Bala, Natural Polymers-Promising Potential In Drug Delivery, International Journal of PharmTech Research, 5 (2013) 684-69.
71. W.Chaisri, W.E. Hennink, [...], S. Okonogi, Cephalexin Microspheres for Dairy Mastitis: Effect of Preparation Method and Surfactant Type on Physicochemical Properties of the Microspheres, An official Journal of the American Association of pharmaceutical scientists, 11 (2010) 945-951.
72. C. Bosquillon, C. Lombry, V. Preat, R.Vanbever. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance, Journal of Controlled Release 70 (2001) 329–339.
73. R.C. Dhakar, S.D. Maurya, V. Saluja, From Formulation To Drug Entrapment Efficiency of Microspheres: A Technical Review, Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 2 (2012) 128-133.
74. R.C.Dhakar, S.D.Maurya, P.P.S. Sagar, S. Bhagat, S.K. Bhagat, S.K. Prajapati, C.P. Jain, Variables Influencing the Drug Entrapment Efficiency of microspheres: A Pharmaceutical Review, Der Pharmacacia Lettre, 2 (2010) 102-116.
75. B. Sun, D.T. Chiu, Determination of the Encapsulation Efficiency of Individual Vesicles Using Single-Vesicle Photolysis and Confocal Single-Molecule Detection, Journal of Physical Chemistry, 77 (2012) 2770-2776.
76. B. Lohse, P. Bolinger, D. Stamou, Encapsulation Efficiency Measured on Single Small Unilamellar Vesicles, Journal of the American chemical society, 130 (2008) 14372-14373
77. A. Grenha, B. Seijo, C. Remunam-Lopez, Microencapsulation chitosan nanoparticles for lung protein delivery, European Journal of Pharmaceutical Sciences 25 (2005) 427-437.

78. G. Vilara, J.Tulla-Puchea, F. Albericio. Polymers and Drug Delivery Systems , Current Drug Delivery, 9 (2012) 000-000.
79. S. Rodrigues, M. Dionísio, C.R. López , A. Grenha, Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery, Journal Functional Biomaterials, 3 (2012) 615-641.
80. R. Scherlie, The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. International journal of pharmaceutics, 411 (2011) 98-105.
81. E.J. Calabrese, L.A. Baldwin, Defining hormesis, Human Experimental Toxicology, 21 (2002) 91-7.
82. E.J. Calabrese, Hormesis: Changing view of the personal account of the history and current status, 511 (2002) 181-9.
83. C-.T. Lee, C-.P. Huang, Y-.D. Lee, Sythesis and characterizations of amphilic poly (L-lactide)-grafted chondroitin sulfate copolymer and its application as drug carrier, Biomolecular Engineering, 24 (2007) 131-139.
84. ISO, Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, in: I.O.f. Standardization (Ed.) 10993-5, 2009.

|

