

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e caracterização de um novo sistema microparticulado contendo polímero catiônico para a administração pulmonar da dapsona e avaliação toxicológica em modelos animais *in vivo*.

MANOEL ORTIZ DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e caracterização de um novo sistema microparticulado para a administração pulmonar de dapsona, contendo polímero catiônico, e avaliação toxicológica em modelos animais *in vivo*.

Dissertação apresentada por **Manoel Ortiz de Oliveira** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado em 17 de setembro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Cristiane da Silva De Bona
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ortiz, Manoel

Desenvolvimento e caracterização de um novo sistema microparticulado contendo polímero catiônico para a administração pulmonar da dapsona e avaliação toxicológica em modelos animais in vivo / Manoel Ortiz. -- 2012.

116 f.

Orientadora: Silvia Guterres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Dapsona. 2. Via Pulmonar. 3. Spray Dryer. 4. Micropartículas. I. Guterres, Silvia, orient. II. Título.

Bibliotecária Responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 405 e 103 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

À professora Sílvia S. Guterres pela orientação qualificada e oportunidade única concedida de participar de um grupo de pesquisa de ponta. Por não desistir nunca de mim e pela confiança depositada.

À professora Adriana R. Pohlmann pelas contribuições prestadas ao trabalho e as discussões dos resultados. Além da orientação na iniciação científica crucial para o meu crescimento e interesse pela pesquisa.

Aos colegas do laboratório 405 e K204 pelos momentos bons e ruins compartilhados, conhecimento agregado, dentro e fora do ambiente de trabalho. Em especial à Evelise, Taís, Gabriela e à Kelly B. Condotta pela ajuda nas fotos de microscopia dos tecidos.

Às amigas Rossana Friederich e Karine Coradini pelos momentos sempre alegres proporcionados.

Ao amigo Frantiescoli Dimer pela companhia e parceria nos trabalhos desenvolvidos, além do conhecimento e discussão e pelos momentos fora do laboratório.

Ao amigo Lucas Rigo por todos os momentos no laboratório de discussão e conhecimento compartilhado, além das inúmeras jantãs e pelo fato de sempre estar disponível para uma conversa sobre qualquer assunto.

À minha colaboradora e grande amiga Denise Jornada, por sempre estar disponível para qualquer ajuda, pela companhia na idealização deste trabalho, idas ao centro de microscopia, discussão dos resultados, além dos momentos fora do laboratório, que com certeza, foram únicos.

À minha família pelo apoio incondicional costumeiro, principalmente à minha mãe Liliana, pelo amor, por acreditar sempre em mim, pela educação, pela formação digna e correta e pelas oportunidades concedidas.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida, CNPq, FAPERGS pelo apoio financeiro proporcionado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Pneumonia causada por <i>Pneumocystis (jiroveci) carinii</i> (PCP)	23
3.2	Dapsona	28
3.3	Micropartículas	30
3.4	Quitosana	31
3.5	Via pulmonar	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Materiais	41
4.1.1	Matérias-primas	41
4.1.2	Aparelhos e equipamentos	41
4.1.3	Solventes, reagentes e outros materiais	42
4.2	Métodos	43
4.2.1	Preparação das micropartículas de quitosana por <i>spray-drying</i>	43
4.2.2	Caracterização físico-química das micropartículas	45
4.2.2.1	Rendimento	45
4.2.2.2	Análises de tamanho de partícula	46
4.2.2.3	Densidade de compactação e diâmetro aerodinâmico	47
4.2.2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
4.2.2.5	Deposição das partículas <i>in vitro</i> em impactador em cascata de Andersen	48
4.2.2.6	Quantificação da dapsona nas micropartículas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	50
4.2.2.7	Perfis de dissolução <i>in vitro</i>	50
4.2.2.8	Modelagem matemática dos perfis de dissolução	51
4.2.2.9	Análise da toxicidade pulmonar das partículas <i>in vivo</i>	53
4.2.2.10	Microscopia eletrônica de varredura dos pulmões	54

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Preparação das micropartículas de quitosana por <i>spray-drying</i>	59
5.2	Caracterização físico-química das micropartículas	59
5.2.1	Rendimento	59
5.2.2	Análises de tamanho de partícula	60
5.2.3	Densidade de compactação e diâmetro aerodinâmico	63
5.2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
5.2.5	Deposição das partículas <i>in vitro</i> em impactador em cascata de Andersen	68
5.2.6	Quantificação da dapsona nas micropartículas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	70
5.2.7	Perfis de dissolução <i>in vitro</i>	71
5.2.8	Modelagem matemática dos perfis de dissolução	72
5.2.9	Análise da toxicidade pulmonar das partículas <i>in vivo</i>	76
5.2.10	Microscopia eletrônica de varredura dos pulmões (MEV)	80
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8	ANEXOS	101

RESUMO

A pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (PCP) é uma das principais doenças oportunistas que acomete pacientes portadores do vírus HIV. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 80 - 85% das pessoas portadoras do vírus sofrem de PCP. Essa infecção é pulmonar e o agente patológico permanece apenas nos pulmões. O tratamento convencional desta doença (sulfametoxazol e trimetoprima) apresenta efeitos colaterais severos (febre, neutropenia, nefrotoxicidade). Neste contexto, a dapsona (DDS) surge como um tratamento alternativo eficaz contra a PCP. A dapsona é um fármaco da classe das sulfonas, com atividade bacteriostática e que quando administrada pela via oral, apesar de apresentar menos efeitos adversos que a terapia convencional, pode causar efeitos adversos nas células do sangue. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é desenvolver micropartículas de quitosana pela técnica de *spray-drying*, visando à administração pulmonar com efeito local da dapsona, para o tratamento da PCP. O racional da proposta baseia-se na administração localizada do fármaco, a qual pode contribuir para a redução da dose administrada e, conseqüentemente, dos efeitos adversos. As análises através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que o tamanho das partículas obtidas foi reduzido e adequado para administração pulmonar (1 – 5 µm). O perfil de dissolução *in vitro* demonstrou uma liberação biexponencial da dapsona a partir das micropartículas, sendo essa caracterizada por uma fase de liberação rápida e outra lenta, o que indica a sustentação da liberação do fármaco. Os resultados de deposição das partículas *in vitro* mostraram uma distribuição adequada e uma elevada fração de partículas finas respiráveis (FPF = 50%). O experimento de toxicidade *in vivo* mostrou uma baixa toxicidade das micropartículas em relação ao fármaco livre, mostrando um potencial efeito protetor para a administração da dapsona.

Palavras-chave: Pneumonia *Pneumocystis carinii* (PCP), micropartículas, *spray-drying*, liberação pulmonar, dapsona, impactador em cascata de Andersen.

ABSTRACT

Pneumonia caused by *Pneumocystis (jiroveci) carinii* (PCP) is a major opportunistic infection that affects patients with HIV. According to the World Health Organization, between 80 - 85% of patients with the HIV virus suffers from PCP. This infection is pulmonary disease and the pathologic agent remains in the lungs. The conventional treatment of this disease leads to severe side effects (fever, neutropenia, nephrotoxicity). In this context, dapson appears as an effective alternative for the treatment against PCP. Dapsone is a drug of sulfones class and its mechanism of action is based on the bacteriostatic activity. When dapson is administered orally, although it has fewer side effects than the conventional therapy, this drug can cause adverse effects on blood cells. In this way, the aim of this work was to develop chitosan microparticles by spray-drying technique, aiming to pulmonary administration with local effect of dapson for the treatment of PCP. The propose of this work is based on the localized administration of the drug, which may contribute to the reduction of the dose and therefore adverse effects. Analyses by scanning electron microscopy (SEM) showed that the particle size obtained was reduced and appropriate for pulmonary delivery (1 – 5 μm). The *in vitro* dissolution profile showed a biexponential release of dapson from the microparticles, characterized by a burst phase release and a subsequent slow release, which indicates the sustaining delivery of dapson. The *in vitro* deposition of microparticles measured in a Andersen cascade impactor showed an adequate distribution and high fine particles fraction (FPF = 50%). The *in vivo* toxicity experiment showed low toxicity of microparticles compared to free drug, indicating a potential protective effect of dapson administration when microencapsulated.

Key-words: *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP), microparticles, *spray-drying*, pulmonary release, dapson, Andersen cascade impactor.

As doenças oportunistas são muito frequentes em pacientes com o sistema imunológico comprometido, como pacientes transplantados, imunossuprimidos e portadores do vírus HIV. Uma enorme gama de doenças oportunistas é descrita, entre elas destaca-se a pneumocitose (Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Bennett, 2010).

A pneumocitose causada por *Pneumocystis (jiroveci) carinii* (PCP) é uma das doenças oportunistas de maior incidência em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Esta patologia é caracterizada por ser uma infecção pulmonar local, onde o microorganismo permanece no local. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 75% dos pacientes que estão infectados com o vírus HIV são acometidos deste microorganismo. Deste número de pacientes infectados, em torno de 80% dos pacientes com SIDA desenvolvem a pneumocitose. A taxa de mortalidade desta pneumocitose já esteve na faixa de 20 – 40%, dependendo da severidade da doença, no entanto, recentemente, esta taxa situa-se entre 10 – 20% (Hughes, 2001; Gutierrez, Morilla *et al.*, 2011).

O tratamento desta patologia (trimetoprima + sulfametoxazol) pode não ser efetivo e apresentar efeitos adversos graves. Em paralelo, trabalhos na literatura destacam que o uso da dapsona pode ser eficaz para o tratamento e prevenção da pneumocitose (Cushion, Stanforth *et al.*, 1985; Fishman, 1998; Kovacs, Gill *et al.*, 2001).

A dapsona é um fármaco da classe das sulfonas, tem atividade bacteriostática e é efetivo contra diversos microorganismos. Por outro lado, a administração da dapsona pela via oral, causa alguns efeitos adversos, principalmente problemas relacionados ao sangue. Além disso, esta sofre grande metabolização hepática, o que leva a uma baixa concentração de ativo no sítio de ação (Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Ramesh e Chandrasekar, 2008).

A microencapsulação é uma ferramenta importante na área farmacêutica e com marcado crescimento nas pesquisas científicas nos últimos anos. As micropartículas são sistemas com tamanho na faixa de 1 – 1000 µm e, geralmente, são constituídas por material polimérico. Podem ser microesferas, compostas por polímero, constituindo um sistema matricial, ou pode ser um sistema reservatório-microcápsulas, onde um núcleo é recoberto por uma parede polimérica (Andrianov e Payne, 1998; Ravi Kumar, 2000; Jyothi, Prasanna *et al.*, 2010). Estes sistemas

microparticulados apresentam vantagens e características importantes frente sistemas convencionais para administração de fármacos, como a possibilidade de modular o perfil de liberação de fármacos, aumento na biodisponibilidade e promoção de um efeito protetor (Ravi Kumar, 2000; Esposito, Cervellati *et al.*, 2002; Yang, Qiu *et al.*, 2005; Jyothi, Prasanna *et al.*, 2010). As micropartículas podem ser obtidas por vários métodos de preparação, destacando-se a secagem por aspersão (*spray-drying*), por ser uma técnica rápida, realizada em uma única etapa e passível de transposição de escala (Oneda e Re, 2003).

A quitosana é um polímero catiônico encontrado no exoesqueleto de crustáceos e é obtido a partir da desacetilação da quitina. Possui propriedades e características importantes, como ser bioadesiva e biocompatível, além da capacidade de formar filmes, géis e micropartículas (Costa Jr. e Mansur, 2008; Vargas, Albors *et al.*, 2009).

A via pulmonar é uma via alternativa às vias convencionais de administração de fármacos e aparece, nos últimos anos, como foco de inúmeras pesquisas científicas (Amaro, Tajber *et al.*, 2011). Esta via apresenta importantes vantagens e características no uso para a administração de fármacos, como uma elevada área superficial alveolar, extensiva vascularização, ausência de metabolismo de primeira passagem, aumento da biodisponibilidade e possibilidade de diminuição na frequência de dose (Frijlink e De Boer, 2004; Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Vehring, 2008; Pilcer e Amighi, 2010; Donovan, Kim *et al.*, 2012).

Neste contexto, a proposta do trabalho está baseada na produção inédita de micropartículas de quitosana, contendo dapsona para administração pulmonar. A hipótese do presente trabalho considera que a dapsona encapsulada poderia chegar ao sítio de ação (pulmões) em concentrações terapêuticas, pois o uso da microencapsulação, aliado à via pulmonar, proporcionaria ausência do metabolismo de primeira passagem, o que aumentaria a biodisponibilidade do fármaco no pulmão.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um novo sistema microparticulado para veiculação da dapsona pela via pulmonar como alternativa à oral.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparação de micropartículas de quitosana contendo dapsona, pela técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*);
- Caracterização físico-química das micropartículas;
 - Rendimento do processo;
 - Determinação do diâmetro de partícula por difração de laser;
 - Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
 - Densidade e diâmetro aerodinâmico das partículas;
 - Deposição das partículas *in vitro* em impactador em cascata de Andersen;
 - Quantificação do fármaco por CLAE.
- Avaliação dos perfis de dissolução *in vitro* em dissolutor e modelagem matemática dos perfis para identificação dos mecanismos de liberação da dapsona a partir das partículas;
- Avaliação *in vivo* em ratos da toxicidade pulmonar das micropartículas, através da análise do fluido de lavagem bronco alveolar;
- Análise dos tecidos pulmonares por microscopia eletrônica de varredura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*

As doenças de ocasião (oportunistas) são muito frequentes em pessoas imunodeficientes e imunossuprimidas, como as acometidas com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA); pacientes com câncer que passam por tratamento quimioterápico severo e pessoas submetidas a algum tipo de processo de transplante de órgãos. Uma nutrição deficiente associada à resistência diminuída para uma variedade de desordens são fatores determinantes para o desenvolvimento da pneumonia causada por *Pneumocystis (jiroveci) carinii* - PCP (Cushion, Stanforth *et al.*, 1985; Blum, Miller *et al.*, 1992; Fishman, 1998; Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Bennett, 2010).

As doenças oportunistas são, principalmente, produtos de dois fatores: a redução nas defesas imunológicas da pessoa infectada, causada pelo vírus HIV, e a exposição diária a microorganismos e outros agentes patogênicos. A vasta lista de doenças oportunistas é de origem diversificada, entre elas podemos citar: as doenças bacterianas como a tuberculose (causada por *Mycobacterium tuberculosis*), doença do complexo de *Mycobacterium avium* e pneumonia bacteriana; doenças de origem fúngica (candidíase, meningite, peniciliose e criptococose); doenças virais (citomegalovírus e herpes); malignidades associadas ao HIV (sarcoma de Kaposi, linfoma e carcinoma de células escamosas); doenças protozoárias (toxoplasmose, leishmaniose, microsporidose, criptosporidose, isosporíase e pneumonia causada por *Pneumocystis (jiroveci) carinii* – PCP) (Hughes, 2001).

A PCP destaca-se entre estas patologias supracitadas como sendo a doença oportunista mais frequentemente relatada em pacientes portadores do vírus HIV. O *P. carinii* é comumente encontrado nos pulmões de pessoas saudáveis e esta infecção é assintomática nestes pacientes, pois cerca de 90% dos adultos apresentam anticorpos para esse tipo de microorganismo. Por sua vez, cerca de 75% do adultos HIV positivo são afetados e também crianças (Hughes, 2001; Bennett, 2010). Um ponto importante a ser destacado é que a PCP infecta crianças (com idade inferior a 6 anos) portadoras do vírus HIV, com uma maior facilidade em relação a adultos. Estima-se que um número superior a 80% das pessoas com SIDA

adquirem PCP (Cushion, Stanforth *et al.*, 1985; Blum, Miller *et al.*, 1992; Fishman, 1998; Hughes, 2001; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; De Souza e Benchimol, 2005; Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Bennett, 2010; Gutierrez, Morilla *et al.*, 2011).

Os grupos de risco para infecção por *P. carinii* são: pessoas infectadas com o vírus HIV em que a contagem de células CD4+ é inferior a 200 μ L e que não estão recebendo qualquer tipo de profilaxia contra PCP; pessoas com deficiência imune primária, incluindo hipogammaglobulinemia e imunodeficiência severa combinada; pacientes que recebem tratamento crônico com imunossupressores, principalmente, transplantados de pessoas que sofrem com severa má nutrição (Blum, Miller *et al.*, 1992; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; Bennett, 2010).

Entre as pessoas infectadas com o vírus, a infecção por PCP leva a uma taxa de mortalidade de 20 – 40%, dependendo da severidade da doença. Atualmente, a mortalidade está na faixa de 10 – 20%. Além disso, a PCP é relatada como a maior causa de morte em pacientes com SIDA nos Estados Unidos. Antes da difusão da profilaxia da PCP, a infecção por *Pneumocystis* era superior a 88% em pacientes que realizaram transplante de pulmão. Nos dias de hoje, com a profilaxia estabelecida, diagnosticar PCP em pacientes que sofreram transplante de pulmão é raro (Kovacs, Gill *et al.*, 2001; Bennett, 2010).

Por muitos anos, o *Pneumocystis (jiroveci) carinii*, foi classificado como protozoário, mas após estudos específicos, passou a ser classificado como um fungo da classe dos ascomicetos. Vários estudos bioquímicos do material genético, principalmente ribossômico e a sequência genética (RNA ribossômico e DNA mitocondrial) do microorganismo, comprovaram a taxonomia correta do microorganismo por apresentar genes para expressão de diidrofolato redutase, tubulina, actina e fator III do crescimento e ausência de ergosterol na forma cística, uma característica importante dos fungos (Kovacs, Gill *et al.*, 2001; De Souza e Benchimol, 2005; Bennett, 2010).

Além disso, vários fármacos antifúngicos não apresentaram eficácia contra este microorganismo. A estrutura é formada por uma superfície celular que é composta por glicose/manose, N-acetilglicosamina, galactose/N-

acetilgalactosamina; e também por uma parede celular composta por β -1,3 glucanas e colesterol (Mandell, 2005). No entanto, o mais importante a se elucidar são as características biológicas para, dessa forma, achar uma terapia segura e eficaz (Hughes, 2001; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; De Souza e Benchimol, 2005).

Através de estudos de microscopia eletrônica foram evidenciadas três formas principais de ocorrência do *P. carinii*: cistos maduros, esporozoítos (forma pré-cística) e trofozoítos. Os cistos ocorrem na forma esférica, com um diâmetro aproximado de 5 μ m, e são encontrados no tecido pulmonar ou secreções pulmonares. Cada cisto pode originar 8 trofozoítos, pois possui no interior da célula 8 corpos intracísticos ou esporozoítos (forma pré-cística) com diâmetro na faixa de 1 a 2 μ m, que são precursores dos trofozoítos. O trofozoíto é a forma trópica, possui uma morfologia variada e com tamanho médio na faixa de 2 a 5 μ m de diâmetro e geralmente as células estão formando aglomerados com os cistos. Contudo, nem o modo de transmissão em seres humanos, nem o habitat natural do *P. carinii* foram determinados. O microorganismo já foi encontrado em diversos animais selvagens e de laboratório, no entanto, não foi constatada associação entre esses animais reservatórios e a contaminação de humanos. Na literatura é abordado que o modo de transmissão ocorre pelas vias aéreas a partir de cistos dispersos no ambiente (Hughes, 2001; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; De Souza e Benchimol, 2005; Bennett, 2010).

A infecção e o alojamento do agente patógeno ocorrem exclusivamente nos pulmões. Dessa forma, é necessário que o agente terapêutico atinja os pulmões para a efetividade do tratamento. As formas viáveis do microorganismo encontram-se nas partes mais profundas dos pulmões: brônquios e bronquíolos e, majoritariamente, no tecido alveolar. Relatos na literatura indicam que a parede celular alveolar, quando infectada com o *P. carinii*, dilata de 5 a 20 vezes a espessura normal, além do aparecimento de infiltrados de células plasmáticas no interstício e a presença de exsudato intracelular alveolar (Hughes, 2001).

A manifestação da PCP é dividida em 3 etapas principais: estágio inicial, segundo estágio e estágio final. O estágio inicial caracteriza-se pela presença de cistos e trofozoítos ligados à parede alveolar por fibronectina, não há indícios de

inflamação ou resposta celular ou qualquer doença clínica associada. No segundo estágio ocorre descamação das células alveolares, aumento do número de cistos dentro dos macrófagos alveolares, TNF's (fator de necrose tumoral) proporcionam a morte do *P. carinii* por ativação dos macrófagos alveolares e induzem o estresse oxidativo no alvéolo. Por sua vez, o estágio final é caracterizado por uma reatividade elevada e descamação causadas por: vacuolização citoplasmática de macrófagos mononucleares e infiltração de células plasmáticas, presença de aglomerados de microorganismos associados aos macrófagos e no lúmen do alvéolo e aparecimento definitivo das manifestações clínicas da pneumonia (Hughes, 2001).

Os principais sintomas da doença em crianças são, frequentemente, diarreia crônica e perda de peso, antes do aparecimento dos sintomas respiratórios. No início ocorre uma progressão da tosse, taquipneia e dificuldade respiratória. Em crianças ou adultos com HIV e PCP os principais sintomas são: febre, problemas respiratórios, tosse seca, dor no peito, taquipneia, dispneia, retrações intercostal, subcostal ou supracostal, respirações de baixa intensidade (Hughes, 2001; Bennett, 2010).

O diagnóstico da doença é difícil, pois as manifestações clínicas não são específicas para diferenciar a PCP e outras doenças respiratórias comuns. Amostras foram retiradas por métodos não invasivos a partir de saliva ou secreções faríngeas, traqueais e gástricas, no entanto, essas análises não são fidedignas para excluir o diagnóstico se a presença do *P. carinii* não for comprovada. Geralmente, métodos invasivos como: biópsia de pulmão, aspiração percutânea são mais confiáveis para o diagnóstico da PCP. São necessárias análises mais específicas, como raios-x dos pulmões e análise histológica do tecido ou de secreções pulmonares para avaliar a presença do *P. carinii*. Um dos métodos invasivos mais comuns de diagnóstico da PCP é a análise da lavagem bronco-alveolar – BAL (Hughes, 2001; Kovacs, Gill *et al.*, 2001).

Para a prevenção da PCP, estudos iniciais recomendavam o uso da pentamidina. Cerca de metade dos pacientes tratados com este fármaco apresentavam melhoras; no entanto, um número elevado de pacientes tratados com suspeita de infecção por *P. carinii* apresentaram manifestações tóxicas no local das

aplicações injetáveis até efeitos sistêmicos graves, como: função renal comprometida, toxicidade hepática, hipoglicemia, anormalidades hematológicas, hipotensão e hipocalcemia. Todos esses aspectos toxicológicos levaram à procura de tratamentos preventivos alternativos (Hughes, 2001).

A administração de dapsona 4 mg/Kg/dia, principalmente em crianças e lactentes portadores de SIDA é sugerida e descrita na literatura. Devido ao elevado risco de aquisição de PCP nos primeiros anos de vida, a prevenção deve começar logo aos 4 – 6 semanas de vida. Estudos em adultos evidenciaram que essa dosagem é efetiva na profilaxia da doença (Hughes, 2001).

Mesmo sendo classificada como uma pneumonia causada por fungos, a PCP não responde a tratamentos com antifúngicos convencionalmente utilizados. A duração do tratamento recomendado contra a PCP, em pacientes com HIV é de 21 dias; já para os demais pacientes, este período é de 14 dias (Fishman, 1998; Bennett, 2010). Além disso, os pacientes infectados com o vírus possuem uma carga maior de microorganismos e respondem mais lentamente ao tratamento em relação à pacientes sem infecção por HIV, necessitando um tempo maior de tratamento (Bennett, 2010).

Antibióticos são primeiramente utilizados para o tratamento da PCP leve, moderada e severa. O tratamento de escolha desta doença é o uso da associação de trimetoprima e sulfametoxazol (TMP – SMX), pela via intravenosa. Este tratamento se mostra efetivo em relação a outras terapias, como por exemplo, a pentamidina. No entanto, esse tratamento é invasivo, pode não ser efetivo e é o que apresenta maior número de efeitos adversos em relação às outras terapias. Entre esses efeitos adversos estão: erupção cutânea, febre, neutropenia, trombocitopenia, eritema multiforme e nefrotoxicidade. Casos de resistência do microorganismo ao tratamento convencional com TMP – SMX são relatados, sendo interessante a busca por novos medicamentos (Cushion, Stanforth *et al.*, 1985; Fishman, 1998; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; Ramesh e Chandrasekar, 2008; Bennett, 2010). Dessa forma, a opção passa a ser por tratamentos alternativos, que apresentam uma relação risco-benefício mais favoráveis.

As principais terapias alternativas relatadas na literatura são: o uso da associação da clindamicina e primaquina, trimetrexato e leucovorina, pentamidina, atovaquone. O uso da prednisona, um corticosteróide, no início do tratamento, também é relatado. Entre as terapias alternativas está o uso de dapsona, relatado como um dos fármacos mais efetivos para essa patologia (Hughes, 2001; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; Ramesh e Chandrasekar, 2008).

As terapias convencionais são pela via oral ou intravenosa. Como a biodisponibilidade do fármaco nos pulmões por essas vias é baixa, torna-se necessário a administração de altas doses. Contudo, estudos da literatura sugerem que uma administração local aumentaria a eficácia do tratamento, por aumentar a biodisponibilidade do fármaco em seu sítio de ação, além de diminuir os efeitos adversos por requerer doses menores (Fishman, 1998; Hughes, 2001; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; Chougule, Padhi *et al.*, 2008).

3.2 Dapsona

A dapsona (Figura 1) pertence à classe das sulfonas e é considerada um fármaco efetivo contra diversas patologias. Entre as principais indicações terapêuticas estão: hanseníase (Revez, Buendia *et al.*, 2009; Sousa, Costa *et al.*, 2010), lúpus eritematoso; Pneumonia por *Pneumocystis carinii* e *Toxoplasma gondii*– em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), malária resistente aos tratamentos convencionais e no sarcoma de Kaposi (Lee, Medina *et al.*, 1989; Wolf, Tuzun *et al.*, 2000; Kovacs, Gill *et al.*, 2001; Zhu e Stiller, 2001; Sago e Hall, 2002; Vuković, Tomić *et al.*, 2010).

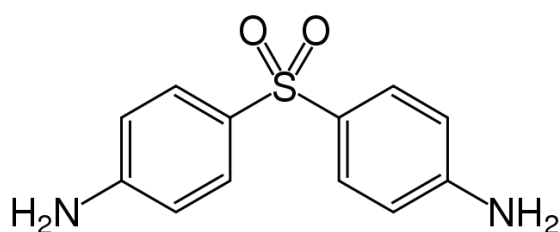


Figura 1. Fórmula estrutural da dapsona.

De acordo com a nomenclatura química oficial, este fármaco é a 4,4'-Sulfonil bis benzeno amina, sendo também conhecida por 4,4' – diamino difenil sulfona, DDS (Vuković, Tomić *et al.*, 2010).

Sua atividade bacteriostática está ligada à via de síntese de folato. Sua ação é através da inibição da síntese do ácido diidrofólico por competição com o ácido p-amino benzóico pelo sítio ativo da enzima diidropteroato sintetase no interior do microorganismo. Também possui atividade antiinflamatória, porém esse mecanismo ainda não foi completamente elucidado (Wolf, Tuzun *et al.*, 2000; Coleman, 2001; Vuković, Tomić *et al.*, 2010).

É um composto lipofílico com uma adequada absorção intestinal (80%) e um tempo de meia-vida de 24 a 36 horas, podendo ser detectada no sangue por até 35 dias, devido à reabsorção intestinal através da bile. Quando é absorvida, a dapsona sofre metabolismo de primeira passagem, N-hidroxilação e N-acetilação, mediado por enzimas do citocromo P-450 no fígado (Wolf, Tuzun *et al.*, 2000; Coleman, 2001).

Esses compostos resultantes da metabolização da dapsona no fígado são os responsáveis pelos principais efeitos adversos descritos para o seu uso. Entre os principais efeitos adversos causados por esse fármaco está a anemia hemolítica, metahemoglobinemia e a agranulocitose (Coleman, 2001; Reddy, Kannan *et al.*, 2009; Vuković, Tomić *et al.*, 2010). Mesmo assim, esse fármaco é considerado benéfico, seguro e barato nas diversas terapias para as quais é prescrito (Reddy, Kannan *et al.*, 2009).

Em 2008, Chougule e colaboradores obtiveram uma formulação pulverulenta a partir de lipossomas contendo dapsona e diferentes adjuvantes de secagem (lactose, gelatina hidrolisada) para a vetorização pulmonar, visando uma prevenção efetiva e alternativa contra pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, em pacientes imunodeprimidos. Os resultados demonstraram que o sistema obtido por *spray-drying* foi capaz de prolongar a liberação da dapsona por até 16 horas. Além disso, os autores observaram, a partir dos resultados obtidos, que essas formulações podem desempenhar um papel promissor na manutenção e prevenção desse tipo de pneumonia. Adicionalmente, foi possível constatar que por apresentar

uma liberação prolongada no local de ação, era possível um intervalo entre doses maior, o que leva a redução dos efeitos colaterais sistêmicos.

A administração oral de dapsona, no tratamento de PCP, leva a uma baixa concentração no sítio de ação, manutenção ineficiente dos sintomas, baixo índice terapêutico e efeitos adversos críticos (Ramesh e Chandrasekar, 2008). O uso da administração pulmonar sítio-específica pode promover uma maior ação farmacológica, melhora da eficácia terapêutica, diminuição os efeitos adversos extra pulmonares e, portanto, pode ser promissora prevenção e tratamento da PCP (Chougule, Padhi *et al.*, 2008).

3.3 Micropartículas

Entre os sistemas multiparticulados para o carreamento de fármacos destacam-se as micropartículas, as quais são definidas como partículas de formato esférico, inorgânicas, orgânicas ou mistas, com tamanhos que variam de 1 a 1000 µm. As principais características desse tipo de sistema são: grande área superficial, uniformidade de conteúdo, tamanho e volume pequeno (Ravi Kumar, 2000).

As micropartículas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas são sistemas que possuem um núcleo como reservatório de fármaco envolto por uma parede, geralmente, polimérica. Por sua vez, as microesferas são compostas por uma matriz polimérica onde a substância carregada pode estar uniformemente distribuída (Andrianov e Payne, 1998; Kawaguchi, 2000; Ravi Kumar, 2000; Jyothi, Prasanna *et al.*, 2010).

Esses sistemas são amplamente estudados como uma alternativa às terapias convencionais. Apresentam várias vantagens em relação aos sistemas unitários convencionais, como a possibilidade de modular o perfil de liberação de fármacos. O controle da liberação de fármacos se dá pelo tempo que este precisa para se difundir através do carreador e só então ficar em contato com o meio externo (Ravi Kumar, 2000). A microencapsulação ainda pode promover o aumento da biodisponibilidade de fármacos insolúveis administrados pela via oral (Yang, Qiu *et al.*, 2005). É possível, ainda, obter um efeito protetor do fármaco, aumentando a

estabilidade, melhorando a eficiência dos tratamentos, o que permite, muitas vezes, a administração de doses menores (Ravi Kumar, 2000; Esposito, Cervellati *et al.*, 2002).

Quanto aos métodos de preparação das micropartículas, vários são descritos na literatura, podendo-se citar a coacervação complexa, separação de fases poliméricas, polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação de solvente, aspersão, entre outros. Dentre estes, destaca-se a secagem por aspersão (*spray-drying*) por ser um processo rápido, realizado em única etapa, de baixo custo, que não utiliza solvente orgânico, sendo ainda passível de transposição de escala (Oneda e Re, 2003).

A técnica de *spray-drying* baseia-se na aspersão, através de uma torre de secagem, de uma solução ou suspensão contendo a substância ativa. Devido à circulação de ar aquecido no equipamento, o solvente é evaporado instantaneamente, resultando na transformação das pequenas gotículas finamente divididas (*spray formado*) em partículas sólidas (Esposito, Cervellati *et al.*, 2002).

Após a obtenção de sistemas microparticulados, estes podem ser caracterizados físico-quimicamente de acordo com o rendimento do processo, taxa de encapsulamento, tamanho de partícula e distribuição granulométrica, avaliação morfológica por microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV), avaliação do perfil de liberação do fármaco encapsulado, estudo farmacocinético, entre outros (Oneda e Re, 2003; Vehring, 2008).

3.4 Quitosana

A quitosana é um polímero policatiônico obtido, principalmente, a partir da desacetilação da quitina, que é um dos polímeros naturais mais abundantes na natureza, depois da celulose, e é encontrado nos exoesqueletos de crustáceos, artrópodes e alguns fungos (Costa Jr. e Mansur, 2008). A quitosana tem propriedades e características interessantes para a aplicação farmacêutica, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, redução do nível do colesterol sanguíneo, estimulação dos efeitos do sistema imunológico, poder de encapsular fármacos para veiculação a alvos específicos, formação de

micropartículas (microesferas e microcápsulas), como material de revestimento, além da formação de filmes e géis (Vargas, Albors *et al.*, 2009).

Possui estrutura (Figura 2) semelhante à celulose, composta por ligações do tipo β (1 – 4) e formada por duas unidades de 2-amino-2-deoxi- β -D-glucano unidas por ligações glicosídicas. A mucoadesividade e o caráter catiônico da quitosana são decorrentes à presença dos grupos amino primário presentes na estrutura (Agnihotri, Mallikarjuna *et al.*, 2004).

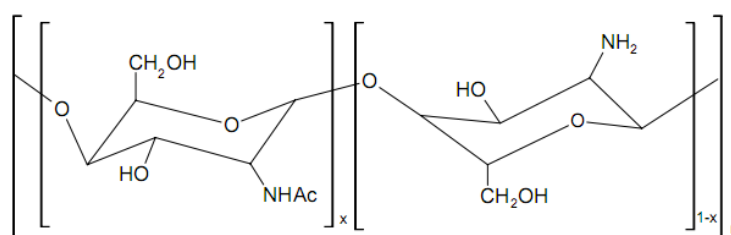


Figura 2. Estrutura molecular da quitosana

De acordo com Agnithori e colaboradores (2004), micropartículas compostas por quitosana podem oferecer vantagens interessantes frente a sistemas não revestidos, como uma melhora na capacidade de encapsulação de fármacos, prolongação/sustentação da liberação de fármacos.

A quitosana foi utilizada na preparação de partículas secas por *spray-drying* visando à administração pulmonar. Nanopartículas contendo quitosana e ácido hialurônico e manitol como adjuvantes de secagem foram produzidas demonstraram características aerodinâmicas adequadas, com grande capacidade de encapsulação e adequada distribuição nos pulmões (Al-Qadi, Grenha *et al.*, 2011).

3.5 Via pulmonar

O uso da via pulmonar para administração de fármacos tem sido foco de inúmeras pesquisas nas últimas duas décadas. Esta via se apresenta como sendo uma via de primeira escolha para o tratamento de doenças das vias aéreas e infecções locais e, ainda, para tratamentos sistêmicos (Grenha, Seijo *et al.*, 2005;

Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Hamishehkar, Emami *et al.*, 2010; Amaro, Tajber *et al.*, 2011). A via pulmonar aparece como uma das principais vias de administração alternativas às vias convencionais, como a oral e intravenosa, pois apresenta diversas vantagens, como a extensiva vascularização tecidual (5 L/min), grande potencial para produzir um máximo benefício terapêutico, fina barreira epitelial (0,1 – 0,2 μm), grande área superficial alveolar para a absorção de fármacos (100 m^2), baixa atividade metabólica, ausência de metabolismo de primeira passagem, aumento da biodisponibilidade de fármacos, possibilidade de diminuição dos efeitos adversos de certos fármacos e possibilidade de diminuição de frequência de dose (Frijlink e De Boer, 2004; Grenha, Seijo *et al.*, 2005; Rouse, Whateley *et al.*, 2007; Chougule, Padhi *et al.*, 2008; Learoyd, Burrows *et al.*, 2009; El-Sherbiny, McGill *et al.*, 2010; El-Sherbiny e Smyth, 2010; Hamishehkar, Emami *et al.*, 2010; Pilcer e Amighi, 2010; Thomas, Gupta *et al.*, 2010; Amaro, Tajber *et al.*, 2011; Sou, Orlando *et al.*, 2011; Aoki, Kojo *et al.*, 2012; D'addio, Chan *et al.*, 2012; Islam e Cleary, 2012; Mueannoorn, Srisongphan *et al.*, 2012; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012; Tsagogiorgas, Jung *et al.*, 2012; Zhang, Ma *et al.*, 2012).

As principais vantagens do tratamento pulmonar local são: a diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos e as altas doses de fármaco no sítio de ação. Por outro lado, mesmo sendo uma das vias mais utilizadas para o tratamento de doenças respiratórias, apresenta algumas desvantagens como a rápida depuração mucociliar e a necessidade de aplicação de 3 ou 4 doses diárias de fármaco (Frijlink e De Boer, 2004; Rouse, Whateley *et al.*, 2007; Aoki, Kojo *et al.*, 2012; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012). As principais doenças pulmonares, que são alvo da administração de fármacos pela via pulmonar, visando o tratamento local, são: a asma, a doença de obstrução pulmonar crônica, a hipertensão arterial pulmonar e a fibrose cística (De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Pilcer e Amighi, 2010; Amaro, Tajber *et al.*, 2011; D'addio, Chan *et al.*, 2012; Hira, Okuda *et al.*, 2012; Willis, Hayes *et al.*, 2012; Zhang, Ma *et al.*, 2012).

Dispositivos para administração de fármacos pela via pulmonar podem ser divididos em 3 categorias: nebulizadores, inaladores de dose-medida pressurizados (MDI) e inaladores de pó seco (DPI). Um bom dispositivo deve gerar um aerossol adequado, com partículas de tamanho controlado (0,5 – 5 μm), além de promover a

estabilidade química e física do fármaco na formulação, ser simples, conveniente, ter baixo custo e ser portátil (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Pilcer e Amighi, 2010; Aoki, Kojo *et al.*, 2012; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012; Willis, Hayes *et al.*, 2012; Zhang, Ma *et al.*, 2012).

Os nebulizadores foram os primeiros dispositivos desenvolvidos disponíveis no mercado. No entanto, esses dispositivos apresentam desvantagens importantes, como a baixa eficiência, baixa reprodutibilidade e alta variabilidade de dose. Além disso, o tempo elevado para a obtenção do efeito (cerca de 30 min), a ausência de portabilidade e a limpeza do dispositivo são desvantagens inerentes da técnica (Pilcer e Amighi, 2010).

Inaladores do tipo MDI (inaladores de dose-medida pressurizados) foram desenvolvidos, principalmente, para o uso no tratamento da asma na década de 50. Todavia, estes dispositivos são, reconhecidamente, agressores do meio ambiente, pois são produzidos com gases do tipo cloro flúor carbono (CFC) e apenas uma pequena parte do fármaco que sai do dispositivo chega às partes mais profundas do pulmão, devido à combinação da alta velocidade que o fármaco sai do atuador e a má coordenação entre o dispositivo e a inalação. A quantidade de fármaco que fica na boca e na região orofaríngea é variável a partir deste tipo de dispositivo. Trabalhos na literatura mostram que a perda, usando dispositivo do tipo MDI, é superior a 70%, podendo chegar até 90% (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Pilcer e Amighi, 2010).

Devido aos problemas apresentados pelos dispositivos supracitados, foi desenvolvido um sistema inalatório simples, pequeno, sem uso de propelentes e ambientalmente correto, utilizando pós secos para inalação (DPI). Dispositivos do tipo DPI combinam a tecnologia da forma farmacêutica pó com o desenvolvimento de dispositivos para dispersar os pós secos como um aerossol no fluxo de ar respiratório dos pacientes. Portanto, requer pouco ou nenhuma coordenação entre o atuador e a inalação e resultam, na maioria das vezes, em uma melhor administração e distribuição pulmonar de fármacos, quando comparados com dispositivos do tipo MDI (Pilcer e Amighi, 2010; Aoki, Kojo *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de DPI's é preferido por apresentar melhor estabilidade, processamento, fácil manuseio e, geralmente, são produzidos em uma única fase e

em estado sólido. É o preferido para o uso no tratamento da asma e da doença de obstrução pulmonar crônica. Atualmente, existem três tipos principais de DPI's: dose unitária única (cápsulas em dose única), dose unitária múltipla e dose múltipla acomodadas em blíster ou em reservatório de fármaco de onde as doses serão administradas (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Pilcer e Amighi, 2010; Hira, Okuda *et al.*, 2012; Zhang, Ma *et al.*, 2012)

A produção de DPI's depende de quatro fatores principais, complexos e interligados: 1) das propriedades do fármaco ou do material particulado que carrega o fármaco, como o fluxo do pó, o tamanho de partícula, distribuição de tamanho, densidade, forças de coesão/adesão, forma e propriedade de superfície; 2) do desempenho e do desenvolvimento do atuador (geometria e tamanho) – desempenho, capacidade de desaglomeração do pó e a formação do aerossol no momento da liberação da forma farmacêutica a partir do atuador; 3) da correta inalação que proporcione deposição correta nos pulmões, da forma, tamanho e o correto posicionamento da capsula no dispositivo e 4) do perfil inalatório e da taxa de fluxo respiratório do paciente através do inalador que vai gerar o fluxo de ar para o trato respiratório. Evidentemente, essas características não podem ser observadas de forma separada e sim de forma concomitante (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Dandekar, Venkataraman *et al.*, 2010; Pilcer e Amighi, 2010; Amaro, Tajber *et al.*, 2011; Kaiyaly, Alhalaweh *et al.*, 2011; Sou, Orlando *et al.*, 2011; Donovan, Kim *et al.*, 2012; Hira, Okuda *et al.*, 2012; Islam e Cleary, 2012; Mueannoorn, Srisongphan *et al.*, 2012; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012).

O tamanho de partícula é um dos mais importantes parâmetros a ser levado em consideração no desenvolvimento de novos pós para administração pulmonar, juntamente com a distribuição de tamanho, forma, carga, densidade e higroscopicidade, sendo o diâmetro de partícula o fator mais determinante para a deposição (Pilcer e Amighi, 2010; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012).

Os mecanismos de impactação e distribuição das partículas no trato respiratório estão relacionados com o tamanho de partícula. A tendência de impactação aumenta com o aumento da velocidade do ar inspirado, taxa de respiração, tamanho de partícula (> 5 µm) e densidade. Partículas com tamanhos inferiores a 5 µm podem ser transportadas para dentro da traqueia. Para alcançar as

partes mais profundas dos pulmões e aperfeiçoar a deposição pulmonar de ativos, esses sistemas desenvolvidos devem apresentar um diâmetro aerodinâmico entre 0,5 e 5 μm . Essa faixa de tamanho é relatada na literatura como a faixa ideal para sistemas candidatos à administração pulmonar, pois partículas com tamanhos superiores a 5 μm usualmente ficam depositadas na região orofaríngea e são ingeridas e/ou expelidas. Por outro lado, partículas com diâmetro inferiores a 0,5 μm não chegam nas partes mais profundas dos pulmões devido ao movimento Browniano que adquirem no fluxo de ar respiratório e podem ser exaladas na expiração (De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Dandekar, Venkataraman *et al.*, 2010; Pilcer e Amighi, 2010; Amaro, Tajber *et al.*, 2011; Carvalho, Peters *et al.*, 2011; Sou, Orlando *et al.*, 2011; D'addio, Chan *et al.*, 2012; Islam e Cleary, 2012; Mueannoorn, Srisongphan *et al.*, 2012; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012; Wang, Kho *et al.*, 2012).

No entanto, é difícil prever se uma partícula com velocidade e massa conhecidas vai realmente se distribuir de forma adequada nas vias aéreas, em certas bifurcações dos pulmões, porque o fluxo de ar, já no interior do trato respiratório, não pode ser mensurado adequadamente e as partículas podem ter posições de partida diferentes nas vias aéreas. Além disso, após a passagem pelas vias aéreas superiores, boca e traqueia, e com a diminuição do fluxo do ar devido ao aumento do número de bifurcações nos pulmões, a força de sedimentação das partículas se torna muito importante para a chegada às partes mais profundas dos pulmões (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008).

O local de deposição das partículas é um dos fatores levados em consideração no planejamento de sistemas particulados para definir o tamanho preferido. Alguns parâmetros considerados no desenvolvimento de partículas são: 1) o local de ação das partículas nos pulmões (local e/ou sistêmico), levando em consideração a morfologia, fisiologia e anatomia do pulmão dos pacientes; 2) a ocorrência e a severidade de efeitos adversos e 3) a eficiência de desaglomeração do pó durante a inalação (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008).

A determinação da faixa de diâmetro aerodinâmico (d_{aero}) ideal para administração pulmonar de fármacos ou sistemas carreadores de fármacos pode ser estimada por modelos matemáticos de deposição nos pulmões, estudos de deposição *in vivo* ou a partir de estudos clínicos combinado com métodos

farmacocinéticos (Frijlink e De Boer, 2004; D'addio, Chan *et al.*, 2012). O diâmetro aerodinâmico pode ser definido como o diâmetro de uma esfera com densidade unitária que, ao ser submetida a um jato de ar, alcança a mesma velocidade que uma partícula não esférica de densidade arbitrária (Chow, Tong *et al.*, 2007).

A aerolização de um pó para inalação pode ser aumentada através da redução do d_{aero} . Isto pode ser feito de várias formas: a mais óbvia e utilizada é a redução do diâmetro geométrico das partículas, desde que a densidade seja mantida; no entanto, isso pode aumentar a compactação das partículas por aumentar as forças de coesão e, conseqüentemente, uma maior aglomeração e possibilidade de redução da aerolização da formulação pulverulenta. Outra forma de reduzir o d_{aero} é mantendo o d_{geo} e modificando a densidade da partícula, por exemplo: aumentando a porosidade ou aumentando o fator forma aerodinâmica, por exemplo: modificando as partículas para o formato de agulha (Islam e Cleary, 2012).

O uso de adjuvantes carreadores de partículas para a administração pulmonar visa evitar a formação de aglomerados devido à coesão destas partículas e aumentar o fluxo dos pós melhorando a aerolização (Islam e Cleary, 2012). A procura por adjuvantes que melhorem as características de aerosol de um fármaco candidato para a administração pulmonar é limitada. Neste contexto, desenvolve-se a busca por estratégias alternativas como a engenharia de partículas que apresentem propriedades adequadas e dispersibilidade (Pilcer e Amighi, 2010; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012).

Tendo em vista que, a escolha e o uso de adjuvantes que podem melhorar o comportamento aerosol de formulações pulverulentas para a administração pulmonar é restrito, o desenvolvimento de novos sistemas particulados carreadores de fármacos têm recebido uma atenção diferenciada nas pesquisas científicas. Esse desenvolvimento de partículas planejadas melhora parâmetros importantes, como o tamanho, a morfologia e a estrutura das partículas. Os principais objetivos deste desenvolvimento é a obtenção de partículas com estreita faixa de distribuição de tamanho de partícula, melhor dispersibilidade, aumento na estabilidade e biodisponibilidade de fármacos, obtenção de perfis de liberação controlados/sustentados e vetorização precisa (Pilcer e Amighi, 2010; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012).

Existem várias opções para redução de tamanho de partículas sólidas pulverulentas e a primeira escolha, geralmente, é a micronização. Porém, poucas técnicas de micronização conseguem produzir partículas com tamanho controlado na faixa de 1 – 5 μm . Por outro lado, podem ser obtidos pós secos a partir de soluções ou dispersões por *spray-dryer*, *spray-freeze-drying* ou *nanospray-dryer*, técnicas que permitem a obtenção de partículas de tamanho reduzido e com faixa de distribuição controlada, além de apresentar uma desaglomeração e formação de aerossol mais adequada para a administração pulmonar (Frijlink e De Boer, 2004; De Boer, Wissink *et al.*, 2008; Pilcer e Amighi, 2010; Mueannoorn, Srisongphan *et al.*, 2012; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas:

- Dapsona (Deg, São Paulo, Brasil);
- Quitosana de baixo peso molecular com 75 – 85 % de grau de desacetilação (Sigma Aldrich);
- Óleo de semente de framboesa (Embacaps);
- Monooleato de sorbitano - Span 80[®] - (Sigma Aldrich);
- Polissorbato 80 - Tween 80[®] - (Deg, São Paulo, Brasil);
- Pentobarbital sódico (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS).

4.1.2 Aparelhos e equipamentos:

- Mini Spray Dryer MSD 1.0 Lab Maq (Ribeirão Preto, Brasil);
- Homogeneizador a alta pressão Panda 2K Niro Soavi 1001L;
- Metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN (Tóquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol Scanning Microscope JSM-6060 (Tóquio, Japão);
- Master Sizer, Scirocco 2000 e Hidro 2000 – Malvern Instruments (Reino Unido);
- Ultrasson (Ultra Cleaner 1400A – Unique);
- Ultraturrax (T25 basic IKA[®] - WERK);
- Cromatógrafo: Perkin Elmer Series 2000;
 - Coluna: Lichrospher 100 RP – 18, 250 mm, 4,0 mm, 5 µm – Merck
- Dissolutor Vankel – VK7010;
- Volúmetro de compactação (*Tapped Density Assessor*: J. Engelsmann AG, Ludwigshafen, Alemanha);
- Impactador em cascata de Andersen tipo multi estágio ACI-MDI 1000 (Erweka, Heusenstamm – Alemanha);
- Micro seringa Model DP-4 Dry Powder Insufflator[™] (PennCentury);

- Potenciômetro Digimed

4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais:

- Acetonitrila HPLC – (Tedia);
- Ácido acético glacial – Nuclear (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico – Nuclear (São Paulo, Brasil);
- Hidróxido de sódio – Nuclear (São Paulo, Brasil);
- Etanol P.A. (Synth, Diadema, São Paulo);
- Água Milli-Q;
- Solução fisiológica.

Métodos

4.2.1 Preparação das micropartículas de quitosana contendo dapsona por *spray-drying*

Foram preparadas duas fases distintas: uma fase contendo uma solução aquosa ácida (ácido acético 1%) de quitosana de baixo peso molecular (1% m/v – 250 mL), juntamente com tensoativo de elevado equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) polissorbato 80 (0,0875 g) e uma fase oleosa contendo o fármaco dapsona (0,25 g), óleo de semente de framboesa (0,5 g), tensoativo de baixo EHL monooleato de sorbitano (0,0875 g) e etanol (12,5 mL). Essas duas fases foram emulsionadas sob agitação magnética constante e homogeneizadas em homogeneizador de alto cisalhamento ultra-turrax por 5 minutos a 19000 rpm, obtendo-se uma emulsão primária.

A escolha do óleo de semente de framboesa foi realizada a partir de estudos preliminares da solubilidade da dapsona em diferentes óleos, sendo que a maior concentração de dapsona solubilizada foi no óleo de framboesa (Figura 3). Este óleo apresenta características antioxidantes e atividade anti-inflamatória acentuada. Grande fonte de tocoferóis e ácidos graxos insaturados, sendo que o componente majoritário é o ácido linoleico, entre 50 – 60% (Oomah, Ladet *et al.*, 2000).

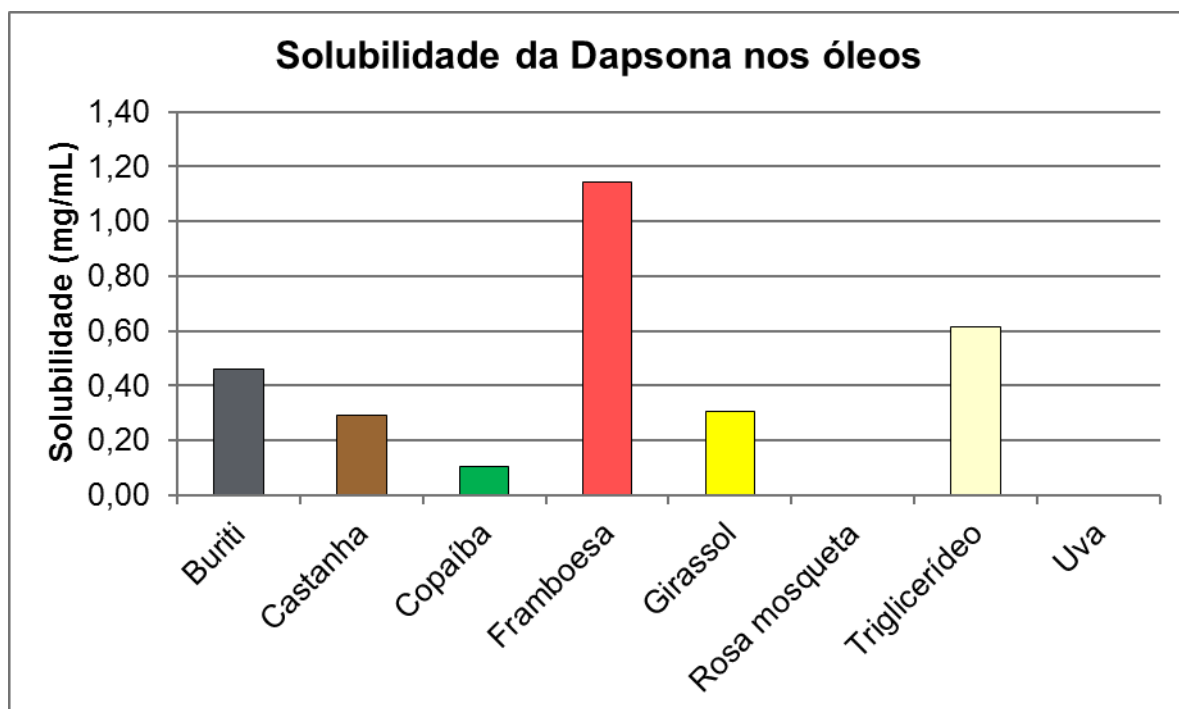


Figura 3 Análise da solubilidade da dapsona em diferentes óleos

Essa formulação foi submetida ao processo de homogeneização à alta pressão (3 ciclos, 500 bar), utilizando um homogeneizador à alta pressão Panda 2K Niro Soavi 1001L, visando a redução do tamanho de partícula e melhor homogeneização do sistema, e logo após, nebulizada em *spray-dryer* sob as seguintes condições de secagem apresentadas na Tabela 1. Essa formulação foi chamada de MPDap.

Tabela 1. Parâmetros utilizados no processo de secagem.

Parâmetros	Descrição
Temperatura de entrada	120 °C
Temperatura de saída	75 – 85 °C
Pressão	50 Kpa
Fluxo de alimentação	0,3 L/h
Bico atomizador	0,7 mm

4.2.2 Caracterização físico-química das micropartículas

4.2.2.1 Rendimento

O rendimento do processo de secagem foi calculado dividindo-se a massa de partículas sólidas pesada, obtidas após a secagem, pela soma de todas as massas das matérias-primas da formulação, excluindo-se a água e o etanol, conforme descrito na Equação 1.

$$R = \frac{\textit{massa pesada}}{\textit{massa das matérias – primas}} \times 100$$

Equação 1

4.2.2.2 Análises de tamanho de partícula

Foi realizado um estudo de desaglomeração das partículas em meio aquoso. Para isso, uma quantidade de pó foi adicionada em água destilada, no acessório de dispersão do equipamento de difração de laser, por via úmida (Hidro 2000 – Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments, UK) até atingir uma obscuração entre 2 e 8%. Foram realizadas 5 leituras durante 30 minutos, com intervalos de 6 minutos entre cada leitura. Antes de iniciar a primeira leitura de cada análise foi procedida a medida de leitura de fundo (*background*) apenas com água pura.

O diâmetro de partícula e a polidispersão dos pós obtidos por secagem foram determinados, a 25 °C, pela técnica de difratometria de laser por via seca, utilizando o dispositivo alimentador de pó seco “*Scirocco 2000*” (Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments, UK), próprio para a determinação do tamanho de partículas de materiais pulverulentos.

As amostras foram adicionadas ao alimentador de pó seco, utilizando uma pressão de ar comprimido de 2 bar e alimentação de amostra por vibração da placa de alimentação de 75%. A quantidade de amostra adicionada foi aquela suficiente para atingir uma obscuração entre 2 e 8%. As leituras foram realizadas utilizando o índice de refração da quitosana (1,54). Antes de cada análise (n = 3) a ser realizada foi procedida a medida de leitura de fundo (*background*) apenas com fluxo de ar.

O *span* é definido como a medida da dispersão granulométrica, a qual relaciona os valores de diâmetro de partícula correspondente a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada para uma amostra. O cálculo da polidispersão do sistema (*span*) foi determinado de acordo com a equação abaixo:

$$Span = [(d_{90}-d_{10}) / d_{50}] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde, d_{90} , d_{50} e d_{10} são as médias de diâmetro de 90%, 50% e 10% da curva de distribuição da população.

4.2.2.3 Densidade de compactação e diâmetro aerodinâmico

Para a determinação da densidade bruta, que é dependente do empacotamento das partículas, foi utilizada uma proveta de 10 mL, previamente calibrada. Para a determinação da densidade de compactação, visando às alterações de empacotamento dos pós que ocorrem à medida que os espaços vazios diminuem e o pó consolida-se (Wells et al., 2005) foi utilizado um volúmetro de compactação (J. Engelshmann, Alemanha).

Os valores de densidade de compactação dos pós obtidos a partir do *spray-dryer*, foram medidos após 10, 500 e 1250 compactações mecânicas com a mesma amostra em uma proveta calibrada, utilizando um volúmetro de compactação (*Tapped Density Assessor*: J. Engelsmann AG, Ludwigshafen, Alemanha) até que a variação de volume na proveta fosse menor ou igual a 0,1 mL (Guyot, C. et al., 1995). Com a massa pesada das partículas que foram colocadas na proveta e o volume de compactação, determinou-se a densidade de compactação, parâmetro utilizado para a determinação do diâmetro aerodinâmico das micropartículas.

A partir dos dados de tamanho de partícula, obtidos por difratometria de laser pela via seca e da densidade de compactação das partículas, foi calculado o diâmetro aerodinâmico teórico dos pós. O diâmetro aerodinâmico teórico (d_{aero}) das partículas pode ser calculado utilizando a fórmula representada na Equação 3:

$$d_{aero} = d_{geo} \sqrt{\left(\frac{\rho}{\rho_0}\right)} \quad \text{Equação 3}$$

Onde, d_{aero} = diâmetro aerodinâmico teórico, d_{geo} = diâmetro geométrico, ρ = densidade de compactação do pó e ρ_0 = densidade da forma esférica (1g/cm^3).

Foi utilizado o diâmetro médio sobre a distribuição do volume das partículas ($d_{4,3}$) como sendo d_{geo} na equação acima.

4.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, em microscópio eletrônico de varredura (MEV, *Jeol Scanning Microscope JSM-6060*, Tóquio, Japão). Uma pequena quantidade dos pós foi colocada sob *stubs* de alumínio com 12,5 mm de diâmetro, com auxílio de fita adesiva dupla face de carbono. O excesso foi retirado com leves batidas na lateral do *stub*. As amostras foram metalizadas em ouro (metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN) e analisadas em diferentes aumentos.

4.2.2.5 Deposição das partículas *in vitro* em impactador em cascata de Andersen

O impactador em cascata de Andersen (Figura 4) é um equipamento utilizado para avaliar a distribuição das partículas a partir do fluxo gerado sobre MDI (medidor de dose individual) e DPI (pós secos inalatórios) quando são aspirados e entram em contato com o trato respiratório. O equipamento é subdividido em 8 estágios que simulam o trato orofaríngeo e respiratório, sendo que cada estágio contém um disco e uma placa que retém partículas com tamanhos específicos. As partículas ficam depositadas nos discos, por impactação, e nas placas do equipamento de acordo com a sua distribuição de tamanho, sendo que cada disco contém um tamanho de poro específico (*cut off*).

No momento que o fluxo de aerossol passa através de cada estágio, partículas maiores terão um impacto sobre o prato de coleta e ficarão depositadas, enquanto as partículas menores seguirão as linhas da corrente de ar e passarão ao estágio seguinte para impactação.



Figura 4. Impactador em cascata de Andersen de 8 estágios.

Os 8 estágios correspondem aproximadamente, às partes do sistema respiratório humano (Kleinstreuer, Zhang *et al.*, 2008) como segue:

- Estágio 0: 9,0 – 10,0 μm
- Estágio 1: 5,8 – 9,0 μm
- Estágio 2: 4,7 – 5,8 μm (faringe)
- Estágio 3: 3,3 – 4,7 μm (traquéia e brônquios primários)
- Estágio 4: 2,1 – 3,3 μm (brônquios secundários)
- Estágio 5: 1,1 – 2,1 μm (bronquíolos terminais)
- Estágio 6: 0,7 – 1,1 μm (alvéolos)
- Estágio 7: 0,4 – 0,7 μm (alvéolos)

Para essa avaliação, foram pesados cerca de 20 mg de micropartículas (200 μg de dapsona) em uma cápsula gelatinosa de tamanho número 3. O fluxo de ar utilizado foi de $28,3 \pm 2$ L/min (que corresponde a uma pressão de 4 KPa) durante um processo que simula a inspiração por 4 s, representando a capacidade inspiratória normal de um homem adulto de 70 kg que é de 4L. O dispositivo dispersor contendo a cápsula foi utilizado para liberar o pó para dentro do equipamento, sendo que a cápsula é perfurada previamente ao processo que simula a inalação.

As análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como o percentual médio de massa depositada em cada estágio, o qual representa a

deposição pulmonar. Após a deposição, procedeu-se à extração e à quantificação do fármaco depositado em cada estágio a partir de metodologia analítica previamente validada (ANEXO 1).

O fármaco depositado nos diferentes níveis foi extraído com fase móvel (acetonitrila:água:ácido acético na proporção 40:59:1), diluído para 10 mL, levado ao ultrassom para processo de extração e analisados por CLAE. O pó depositado no *mouthpiece* e na porta de indução também foi quantificado juntamente com o estágio zero. O pó depositado no estágio 1 corresponde a quantidade depositada na boca e garganta. O somatório das massas de pó depositada a partir do estágio 2 até o filtro do equipamento é chamada de *FPF* (da sigla em inglês, *fine particle fraction*, fração de partículas finas) (Gervelas, Serandour *et al.*, 2007).

4.2.2.6 Quantificação da dapsona nas micropartículas por CLAE

Para a quantificação de fármaco nas micropartículas, cerca de 20 mg de pó (200 µg de dapsona) foram adicionados a um balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila, seguida de extração por 30 minutos em banho de ultrassom. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, diluído (500 µL em um balão de 10 mL com fase móvel), filtrado em membrana de 0,45 µm (Durapore, Millipore®) e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE com método de detecção UV, conforme metodologia previamente validada (ANEXO1).

4.2.2.7 Perfis de dissolução *in vitro*

A liberação da dapsona a partir das micropartículas e a dissolução do fármaco livre foram avaliados em dissolutor (Vankel VK7010). O meio de dissolução utilizado foi tampão fosfato pH 6,8. Para a obtenção do tampão utilizou-se 250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e 195 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 M, sendo o volume final ajustado para 1000 mL em balão volumétrico com água destilada. O pH final foi ajustado para 7,4 utilizando solução ácida de ácido clorídrico (HCl) 0,2 M ou solução básica de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M, quando necessárias.

Os experimentos foram realizados em dissolutor utilizando-se o tampão descrito acima como meio de dissolução (tampão fosfato – pH 7,4) em cubas de 900 mL, respeitando a condição *sink* ($C_s = 400 \mu\text{g/mL}$), metodologia de cestas (USP 1), velocidade de agitação de 100 rpm e temperatura controlada de $37 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A massa de micropartículas utilizada foi de 150 mg (1,5 mg de dapsona), acondicionada em cápsulas de gelatina dura transparentes número 0. As amostras foram coletadas automaticamente (5 mL, coletor VK8000) nos tempos 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480, 720 e 1440 minutos, sem reposição de meio e analisadas posteriormente por espectroscopia UV em 293 nm, conforme metodologia previamente validada (ANEXO 2).

4.2.2.8 Modelagem matemática dos perfis de dissolução

As curvas de dissolução foram construídas a partir dos dados de dapsona liberada (%) em função dos tempos de coleta. Posteriormente, esses perfis foram avaliados por diferentes metodologias: métodos modelo-dependentes e eficiência de dissolução.

A eficiência de dissolução (ED) foi determinada segundo a metodologia descrita por Khan (Khan, 1975) e comparada entre o fármaco livre e a formulação microparticulada através do método estatístico ANOVA ($\alpha = 0,05$). A ED é uma avaliação modelo-independente que pode ser definida a partir da área sob a curva de dissolução, sendo expressa como a porcentagem da área de um retângulo que descreve 100 % da dissolução de um determinado período de tempo (Equação 4). Para o cálculo da área sob a curva foi utilizado o software Origin[®] 7.0.

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

A modelagem matemática dos perfis de liberação foi realizada com o auxílio do programa Micromath Scientist[®] (versão 3.0, Micromath[®], Inc., EUA) através do

ajuste dos dados experimentais a dois modelos: monoexponencial e biexponencial (Equação 5 e Equação 6).

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equação 5}$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \quad \text{Equação 6}$$

Onde: %D é o percentual de dapsona dissolvida no tempo t ; α e β são as constantes relacionadas ao tempo de duração dos dois componentes nos quais a função de decaimento é decomposta e k são as constantes cinéticas observadas; A e B são as concentrações iniciais de fármaco.

Foi realizada a modelagem ajustada ao modelo monoexponencial e biexponencial, e a escolha do modelo que melhor descreveu os dados experimentais foi realizada através da análise do critério de seleção do modelo (MSC), do coeficiente de correlação e do ajuste do gráfico.

Adicionalmente, também foi aplicado o modelo da Lei da Potência aos perfis de dissolução para a obtenção dos parâmetros a e n , os quais caracterizam um sistema quanto às características estruturais e geométricas, além do mecanismo de liberação do fármaco (Equação 7).

$$ft = at^n \quad \text{Equação 7}$$

Onde ft representa a liberação fracional do fármaco, a é a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica analisada e n é o expoente de liberação, o qual indica o mecanismo de liberação do fármaco.

A partir do valor de n encontrado, pode-se estimar o mecanismo de liberação do fármaco a partir das micropartículas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Mecanismos de liberação de substâncias a partir de sistemas poliméricos de acordo com o expoente de liberação n relacionado à Lei das Potências (Korsmeyer, Gurny *et al.*, 1983).

Expoente de liberação n			Mecanismo de liberação
Filme	Cilíndrico	Esférico	
0,50	0,45	0,43	Difusão fickiana
$0,50 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II

4.2.2.9 Análise da toxicidade pulmonar das partículas *in vivo*

Foi realizada a análise do fluido de lavagem bronco alveolar (FLBA) em animais Wistar machos de 60 dias, pesando na faixa de 250 – 350 g, para verificar a toxicidade pulmonar das micropartículas contendo o fármaco e do fármaco livre. Para a avaliação da toxicidade pulmonar das partículas foram utilizados 16 ratos Wistar machos. Os animais foram mantidos sob condições-padrão: temperatura (22 ± 2 °C), umidade (60 – 80%), ciclo de 12 horas claro/escuro, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos com 4 animais por caixa, nos grupos que seguem:

- Grupo Controle positivo – dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1%
- Grupo Controle negativo – Ar (10 mL)
- Grupo Teste – 5 mg micropartículas de dapsona (MPDap)
- Grupo Comparativo – dapsona livre

Para anestesia dos animais, foi administrada uma solução (0,6 – 1 mL) de pentobarbital sódico (50mg/Kg), que é descrita em trabalhos da literatura como sistema anestésico para este tipo de experimento animal (Todo, Okamoto *et al.*, 2001; He, Gao *et al.*, 2007). Para a administração intratraqueal dos tratamentos acima citados, a traquéia foi exposta e uma incisão realizada entre o 5° e 6° anel traqueal. Os tratamentos foram administrados com auxílio de uma microseringa (PennCentury - Model DP-4 Dry Powder Insufflator™ - para os pós) e microseringa de instilação para a solução de SDS.

Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os pulmões removidos cirurgicamente e foi feita a coleta do fluido de lavagem bronco alveolar com solução fisiológica. Foram realizadas três lavagens com solução salina (volume utilizado 3 mL). A cada lavagem, o pulmão era levemente massageado para a difusão total da solução salina pelo tecido pulmonar, efetivando o processo de lavagem. Após lavagem dos pulmões, o fluido de lavagem foi centrifugado e o sobrenadante coletado para quantificação de lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina (Hussain, Majumder *et al.*, 2006). As análises foram realizadas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A determinação da LDH foi realizada através do ensaio cinético UV (Kit Desidrogenase láctica, Roche Diagnóstica®) e as concentrações de proteínas totais através do método colorimétrico do Biureto (Kit proteínas totais, Roche Diagnóstica®). A comparação dos resultados foi realizada pelo teste estatístico de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Este protocolo de experimentação animal (ANEXO 3) foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Animais – CEUA/UFRGS (protocolo 21411).

4.2.2.10 Microscopia eletrônica de varredura dos pulmões

Os fragmentos de partes profundas dos pulmões foram coletados e conservados em solução de glutaraldeído a 2,5% (procedimento recomendado pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS). Após 7 dias, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação, realizando lavagens com etanol e

acetona. Foi determinado o ponto de secagem crítico. Subsequentemente, as amostras foram acomodadas em *stubs* de alumínio com 12,5 mm de diâmetro, com auxílio de fita adesiva dupla face de carbono, posterior metalização com ouro e analisadas em diferentes aumentos (MEV, *Jeol Scanning Microscope JSM-6060*, Tóquio, Japão).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação das micropartículas de quitosana por *spray-drying*

Foi possível obter partículas sólidas e pulverulentas a partir da formulação contendo quitosana e dapsona, utilizando a metodologia previamente proposta (*spray-drying*). As micropartículas apresentaram-se como um pó amarelo claro, levemente aglomerado e com odor característico de quitosana. O uso do homogeneizador foi essencial para a obtenção de uma formulação mais homogênea e com tamanho de partícula reduzido, tanto na emulsão final quanto dos pós obtidos. Isso se pode afirmar, pois em um estudo anterior foi realizada uma comparação da mesma formulação, preparada utilizando-se o homogeneizador de alto cisalhamento ultra-turrax (5 minutos, a 19000 rpm) e homogeneizador a alta pressão (3 ciclos, a 500 bar) e apenas o ultra-turrax para homogeneização do sistema, sem o uso do homogeneizador, previamente à secagem. As micropartículas obtidas com homogeneização (MPDap) apresentaram tamanho de partícula menor, menor diâmetro aerodinâmico teórico (4 – 5 μm) e melhor fluxo, quando comparadas à mesma formulação, porém submetida apenas ao processo de homogeneização por ultra-turrax (> 15 μm). As micropartículas obtidas apenas pelo ultraturrax apresentaram um diâmetro médio maior (em torno de 30 μm) e um span também superior (2.23). Portanto, a metodologia de MPDap foi a selecionada para a continuidade do trabalho (caracterizações e avaliações).

5.2 Caracterização físico-química das micropartículas

5.2.1 Rendimento

Os rendimentos das operações de secagem estão apresentados na Tabela 3, para os três lotes da formulação MPDap. Esses valores estão abaixo dos obtidos pela técnica proposta (*spray-drying*) contendo quitosana descritos na literatura – de 40 a 75% (Grenha, Seijo *et al.*, 2005; Alhalaweh, Andersson *et al.*, 2009). Os motivos para o baixo rendimento podem ser por perda de pó por adsorção na torre de secagem e, ainda, perda de parte dele através da parte superior do ciclone. Mesmo assim estes rendimentos estão de acordo com processos de secagem que usam pequenos volumes de formulações.

Tabela 3. Rendimentos dos processos de secagem de 3 lotes da formulação MPDap.

Amostras	Rendimento (%)
MPDap 1	36,10
MPDap 2	40,86
MPDap 3	37,26
Média (%)	38,07
Desvio	2,48

5.2.2 Análises de tamanho de partícula

A análise granulométrica das micropartículas foi realizada através de difratometria de laser utilizando água como meio não-solvente. Primeiramente, foi realizado um estudo de desaglomeração das partículas em meio aquoso pela via úmida. Os perfis de desaglomeração estão mostrados na Figura 5.

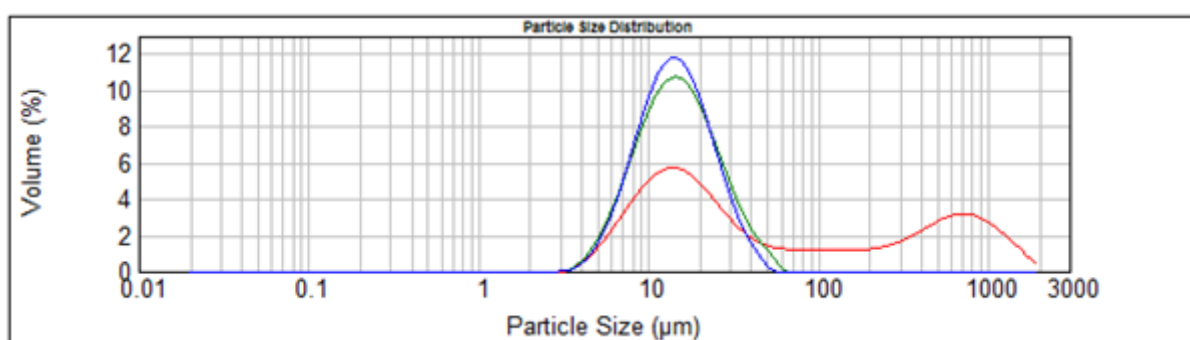


Figura 5. Distribuição de diâmetro de partícula por volume para o ensaio de desaglomeração da formulação MPDap por via úmida. Tempos de análise: 0 minutos (linha vermelha), 5 minutos (linha verde) e 10 minutos (linha azul).

Pode-se observar que a partir da segunda leitura (em 5 minutos, linha verde), ocorre a desaglomeração das partículas, em meio aquoso. Esses perfis evidenciam que as partículas desaglomeram facilmente em apenas 5 minutos, mostrando um volume médio do tamanho de partícula ($d_{4,3}$) inicial (tempo zero) de 250 μm . Na segunda leitura (5 minutos) o valor de $d_{4,3}$ foi de 17 μm e na terceira leitura (10 minutos) o diâmetro médio foi de 15 μm . Este valor manteve-se constante até o fim do estudo de desaglomeração, demonstrando que, em meio aquoso, as micropartículas de quitosana contendo dapsona desaglomeram facilmente em um tempo de 5 minutos e o tamanho mínimo das partículas obtido a partir do pó aglomerado, fica em torno de 15 μm . Os valores de $d_{0,1}$, $d_{0,5}$, $d_{0,9}$, $d_{4,3}$ e *span* estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Estudo de desaglomeração das micropartículas por difratometria de laser.

Tempos	Tempo 0	Tempo 5	Tempo 10	Tempo 30
$d_{0,1}$ (μm)	8,3	7,3	7,8	7,7
$d_{0,5}$ (μm)	28,9	14,7	14,3	14,3
$d_{0,9}$ (μm)	856,9	30,3	25,5	25,9
<i>SPAN</i>	29,5	1,8	1,3	1,3
$d_{4,3}$ (μm)	250,0	17,0	15,6	15,7

Pode-se observar que o tamanho médio de partícula obtido, em torno de 15 μm , é superior ao que é relatado na literatura como sendo a faixa ideal para a administração pulmonar (1 – 5 μm). Neste caso, deve-se salientar que esta análise considera as características do pó em meio aquoso apenas, dos aglomerados formados e a redução de aglomerados maiores até aglomerados menores. Nesta análise as características aerodinâmicas das partículas não são levadas em

consideração, ou seja, o diâmetro aerodinâmico, a densidade e o perfil de deposição *in vitro*.

Diante destes resultados, tornou-se necessário a determinação do diâmetro médio geométrico (d_{geo}) das partículas pela via seca. Estas análises foram realizadas utilizando o mesmo equipamento de difratometria de laser, porém utilizando o dispositivo específico para dispersão de pós (“*Scirocco 2000 dry powder feeder*”, Mastersizer® 2000, Malvern Instruments, UK), sob as condições experimentais previamente mencionadas. Neste equipamento ocorre um turbilhonamento do ar (ciclone) com pressão, fluxo de ar e de alimentação de amostra constantes. A amostra é desaglomerada pela força deste fluxo de ar e a leitura então é realizada.

Na Figura 6, estão demonstradas as 3 leituras de 3 diferentes lotes da partículas de quitosana MPDap.

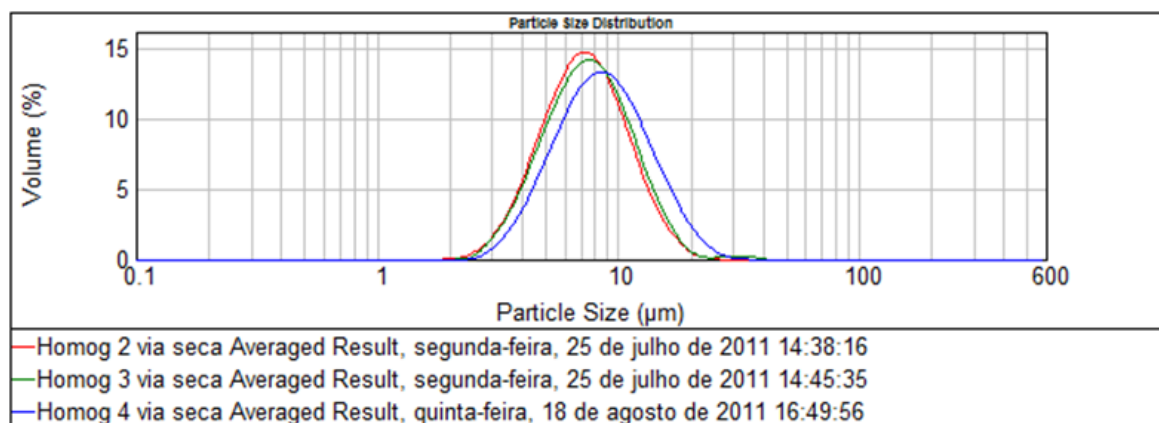


Figura 6. Distribuição de diâmetro de partícula por volume de 3 diferentes lotes da MPDap analisados por via seca.

Pode-se observar a partir da análise da Figura 6 que as 3 leituras de cada lote situam-se na faixa micrométrica (1 – 10 µm) e são sobreponíveis, demonstrando um controle tecnológico de diâmetro das partículas do pó e uma uniformidade de tamanho entre lotes. Além disso, o *span*, que reflete a polidispersão, foi próximo de 1, o que indica uma baixa polidispersão sendo ideal para sistema polidispersos microparticulados.

Os resultados de diâmetro médio e *span* estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição granulométrica por difração de laser de três lotes de micropartículas, via seca.

Amostras	d _{4,3} (µm)	SPAN
MPDap 1	7,861	1,091
MPDap 2	8,226	1,123
MPDap 3	9,443	1,214
Média	8,51	1,143
Desvio	0,828	0,064

A média do diâmetro geométrico encontrado entre os lotes, por difratometria e pela via seca, foi em torno de 8 µm. Este resultado está mais próximo aos valores descritos para a administração pulmonar de fármacos (d_{aero}: 1 – 5 µm), porém ainda é superior. No entanto, este valor encontrado é o diâmetro geométrico das partículas, que não leva em consideração a densidade das mesmas. Portanto, é imprescindível a determinação do diâmetro aerodinâmico das micropartículas. Igualmente, também são necessárias as avaliações por microscopia eletrônica de varredura, para verificar o tamanho da partícula primária, e a deposição *in vitro* das partículas em impactador em cascata de Andersen, simulando a distribuição das micropartículas no trato respiratório.

5.2.3 Densidade de compactação e diâmetro aerodinâmico

Os resultados das análises de densidade de compactação para cada lote de formulação, bem como os valores das massas pesadas e volumes medidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise da densidade de compactação dos 3 lotes de formulação. Valores de massa, volume bruto (V bruto), volume após 10 compactações (V 10), volume após 500 compactações (V 500) e volume após 1250 compactações (V1250) de cada uma das formulações.

Amostras	Massa (g)	V bruto (mL)	V 10 (mL)	V 500 (mL)	V 1250 (mL)	Densidade de compactação. (g/mL)
MPDap 1	0,5146	2,00	2,00	1,90	1,81	0,2843
MPDap 2	0,5264	2,00	2,00	1,96	1,96	0,2685
MPDap 3	0,5696	2,00	2,00	1,91	1,82	0,3129

O diâmetro aerodinâmico teórico (d_{aero}) foi calculado de acordo com a equação 3, previamente apresentada, que leva em consideração o diâmetro geométrico das partículas, obtidas por difração de laser pela via seca, e a densidade de compactação. Os valores de d_{aero} estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Diâmetro aerodinâmico teórico das micropartículas de quitosana calculado a partir da densidade de compactação e do diâmetro geométrico (d_{geo}) obtido por difratometria de laser.

Amostras	Densidade de compactação (g/mL)	d_{geo} (μm)	d_{aero} (μm)
MPDap 1	0,2843	7,86	4,19
MPDap 2	0,2685	8,22	4,25
MPDap 3	0,3129	9,44	5,28
Média			4,57
Desvio (\pm)			0,61

Os três lotes de micropartículas MPDap1, MPDap2, MPDap3 apresentaram diâmetros aerodinâmicos teóricos de 4,19 μm , 4,25 μm e 5,28 μm , respectivamente. Os dois primeiros lotes situaram-se dentro da faixa adequada para a administração pulmonar (Frijlink e De Boer, 2004; Pilcer e Amighi, 2010; Pilcer, Wauthoz *et al.*, 2012) e o terceiro um pouco acima. Por sua vez, a média dos valores do d_{aero} teórico foi de $4,57 \pm 0,61$, dentro da faixa preconizada para o uso de fármacos pela via pulmonar. Esses resultados demonstram que essas partículas são adequadas e poderiam ser utilizadas para a administração de dapsona pela via pulmonar.

5.2.4 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura é muito importante na caracterização de micropartículas. Essa técnica permite a observação da morfologia das partículas, topografia, presença ou não de poros, determinação do tamanho da partícula primária isolada e, ainda, a verificação da distribuição de tamanho do sistema (Vehring, Foss *et al.*, 2007; Li, Yan *et al.*, 2011).

A Figura 7 corresponde às micropartículas de quitosana obtidas por *spray-drying*. Pode-se observar que essas partículas são esféricas, o que está de acordo com a literatura, que relata que partículas obtidas por *spray-drying* e quitosana, geralmente apresentam esse formato (Alhalaweh, Andersson *et al.*, 2009; Learoyd, Burrows *et al.*, 2009).

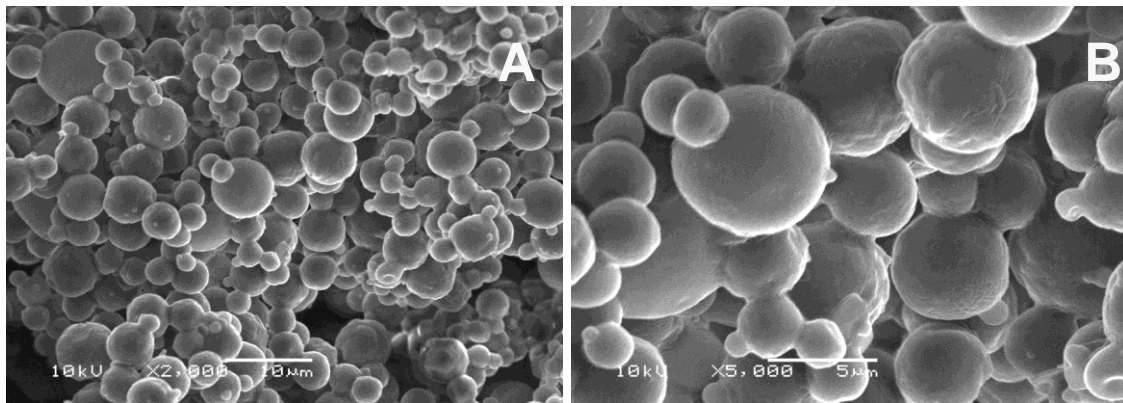


Figura 7. Fotomicrografias de varredura de MPDap, em A) aumento de 2000x e em B) aumento de 5000x.

Com base nessa análise, foi possível observar que as partículas apresentaram um tamanho inferior aos obtidos pela análise por difratometria de laser, sendo esses tamanho na faixa entre 1 e 5 μm . Essa diferença se dá, provavelmente, devido ao fato de algumas partículas ainda permanecerem aglomeradas durante a análise de difratometria de laser, tanto pela via úmida quanto pela via seca. Como discutido anteriormente, esses diâmetros observados na microscopia eletrônica de varredura, corroborando com os resultados encontrados na determinação do diâmetro aerodinâmico das partículas, são ideais para a administração pulmonar.

Pode-se observar, também, a partir destas imagens, uma tendência à baixa polidispersão do sistema, que apresenta a maioria das partículas na faixa micrométrica (1 – 5 μm), embora algumas partículas maiores que 5 e menores que 1 μm também foram evidenciadas.

Quanto à topografia, as imagens revelam que as partículas são lisas e sem poros. Uma superfície lisa das micropartículas reflete um bom fluxo do pó, o que permite uma melhor dispersão destas partículas, devido a menor presença de forças de atrito entre a superfície das partículas (Tonon, Brabet *et al.*, 2009).

A Figura 8 corresponde a lotes diferentes de partículas de quitosana em um aumento de 10000x.

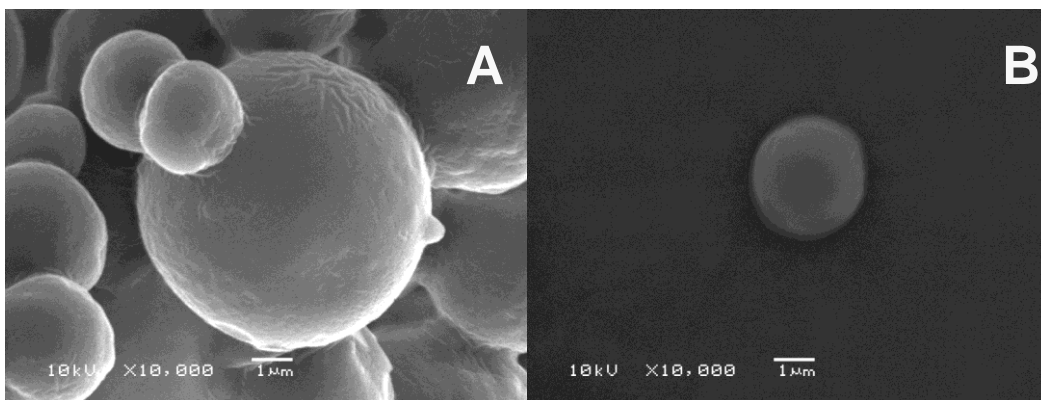


Figura 8. Fotomicrografias de varredura de MPDap, em A e B com aumento de 10000x.

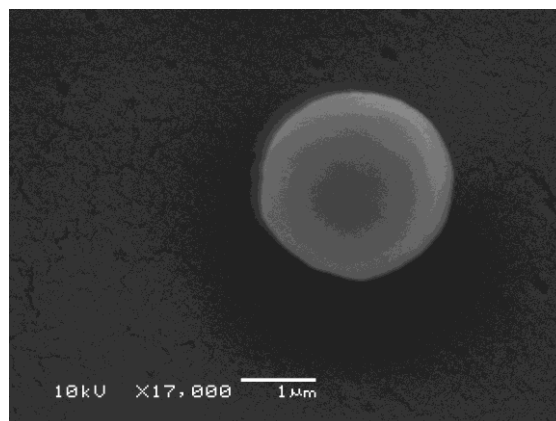


Figura 9. Fotomicrografia de varredura de MPDap, em aumento de 17000x.

A partir das fotos de microscopia eletrônica de varredura pode-se verificar o tamanho da partícula primária. Observando a Figura 9, nota-se que o tamanho da partícula primária, neste sistema particulado, é menor que os diâmetros obtidos pelas técnicas de difração de laser (cerca de 8 µm). Nesta foto encontra-se uma

partícula isolada com cerca de 1 μm , tamanho adequado para a administração pulmonar (Frijlink e De Boer, 2004).

5.2.5 Deposição das partículas *in vitro* em impactador em cascata de Andersen

Foi avaliada a deposição *in vitro* das micropartículas em impactador em cascata de Andersen (ACI). Esta avaliação é de extrema importância no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos visando à via pulmonar, pois representa o perfil de deposição das partículas no trato respiratório simulado.

Com estas análises tem-se uma estimativa de como essas micropartículas vão se distribuir no trato respiratório e onde ficarão depositadas, além de ser possível determinar a fração de partículas finas respiráveis depositadas nos estágio correspondente a faixa de 0,4 – 5,8 μm , (*FPF – fine powder fraction*). O FPF é um parâmetro importante, pois reflete a porção de partículas que são capazes de chegar às partes mais profundas dos pulmões, as quais garantem uma maior concentração de fármaco no sítio alvo e maior eficácia terapêutica.

A Figura 10 apresenta a média dos perfis de distribuição de três lotes diferentes da formulação MPDap.

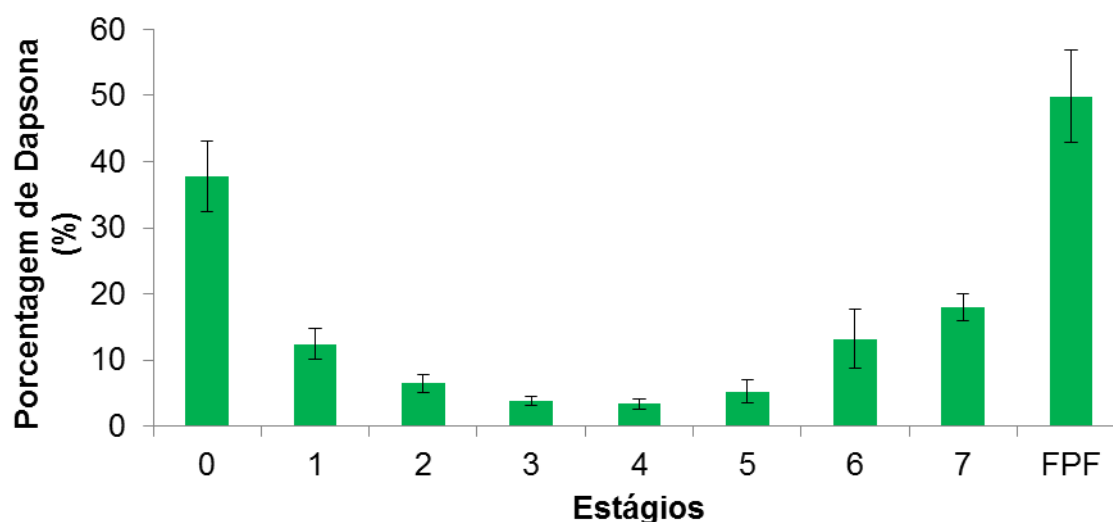


Figura 10. Perfil de distribuição das micropartículas avaliadas em impactador em cascata de Andersen. Cada estágio refere-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$), o FPF representa a soma dos estágios 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (0: 9,0 – 10,0 μm ; 1: 5,8 – 9,0 μm ; 2: 4,7 – 5,8 μm ; 3: 3,3 – 4,7 μm ; 4: 2,1 – 3,3 μm ; 5: 1,1 – 2,1 μm ; 6: 0,7 – 1,1 μm ; 7: 0,4 – 0,7 μm).

O estágio zero, que representa as partículas que ficam depositadas na região orofaríngea, além do pó remanescente na cápsula e no atuador, foi o que apresentou a maior quantidade de partículas entre os estágios, cerca de 38%. As partículas que permaneceram na cápsula e no atuador estavam aglomeradas, provavelmente o que dificultou a dispersão pelo ar e a deposição no impactador.

Os valores de *FPF* que constam na literatura são variados, situando-se de 10 até 80%. Contudo, não há um consenso de um valor ideal de *FPF* para a administração pulmonar de uma formulação (Sansone, Aquino *et al.*, 2009; Aquino, Prota *et al.*, 2012). O resultado obtido apresentou uma fração de partículas finas respiráveis de, aproximadamente, 50%.

Um aspecto importante a ser analisado é que esta formulação foi idealizada e preparada sem a presença de adjuvantes de secagem. Mesmo sem adjuvantes, apresentou morfologia e características aerodinâmicas adequadas para o uso pulmonar proposto.

Este valor de *FPF* demonstra o alto potencial da formulação como sistema de veiculação de fármacos para inalação pulmonar.

5.2.6 Quantificação da dapsona nas micropartículas por CLAE

As partículas de dapsona apresentaram um carga de fármaco de, aproximadamente, 1 % (Tabela 8), em relação à quantidade total de sólidos da formulação o que corresponde a 10 mg de dapsona/g de pó.

A quantidade de dapsona associada às partículas foi inferior à esperada (7%). A concentração teórica esperada era de 73 mg de fármaco por grama de pó, no entanto, a quantificação mostrou uma concentração de 10 mg de fármaco por grama de pó. Durante o processo de secagem das formulações observou-se que parte do material seco ficou aderido à torre de secagem do equipamento formando um filme. Também foi observado pó na saída para o filtro na parte superior do ciclone. Neste sentido, a dapsona poderia estar associada a estes materiais perdidos, havendo, conseqüentemente, uma diminuição na concentração de fármaco no material coletado. O teor das micropartículas está apresentado na Tabela 8. A baixa variabilidade entre os lotes (recuperação da dapsona nos pós) indica que o sistema é homogêneo, não tendo havido segregação dos pós durante a secagem.

Tabela 8. Concentração de dapsona nas micropartículas de quitosana.

Amostras	C (mg/g)
MPDap 1	10,88
MPDap 2	9,51
MPDap 3	9,87
Média	10,09
Desvio (\pm)	0,58

5.2.7 Perfis de liberação *in vitro*

Objetivando avaliar o perfil de liberação do fármaco, foi realizada a dissolução *in vitro* da formulação, em tampão pH 7,4 a $37 \pm ^\circ\text{C}$. A escolha do pH 7,4 foi devido ao fato desse ser o pH do fluido pulmonar (Grenha, Seijo *et al.*, 2005; Learoyd, Burrows *et al.*, 2009; Tomoda, Ohkoshi *et al.*, 2009).

Através da análise inicial do experimento de dissolução (Figura 11), pode-se observar que o fármaco livre dissolveu cerca de 80% nos primeiros 30 minutos de experimento e antes de 200 minutos de ensaio, todo o fármaco já havia dissolvido no meio de dissolução. Por outro lado, o perfil de liberação e dissolução da dapsona a partir das micropartículas apresentou duas fases distintas da dissolução: uma fase rápida de liberação, denominada *burst phase*, pois cerca de 55% do fármaco tinha sido liberado das micropartículas nos primeiros 30 minutos de experimento. Esta fase é, geralmente, caracterizada pela presença de fármaco adsorvido na superfície da partícula, assim como porção de fármaco que está dispersa na matriz polimérica, estando mais facilmente exposta ao meio de dissolução.

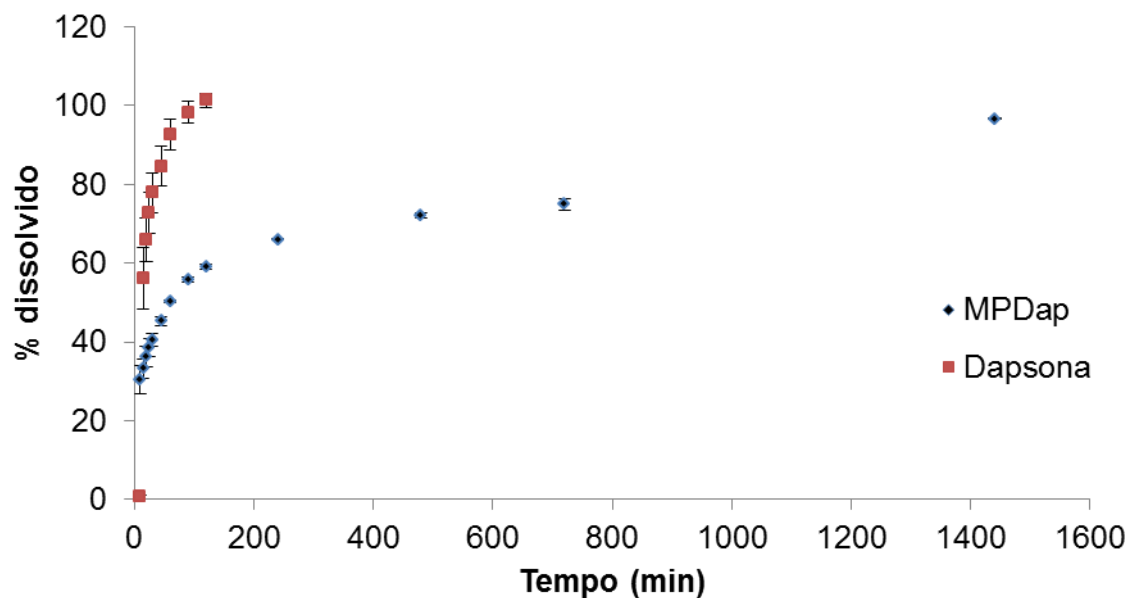


Figura 11. Perfis de liberação obtidos pela dissolução da dapsona livre e das micropartículas contendo dapsona em tampão fosfato pH 7,4 utilizando dissolutor.

Após essa fase rápida, observou-se uma fase lenta de liberação. A liberação do fármaco no decorrer do ensaio demonstrou-se controlada e sustentada, caracterizando uma possível liberação biexponencial. Essa fase pode ser caracterizada pela porção de fármaco que está majoritariamente encapsulada no interior da micropartículas. Essa porção é referente a quantidade de fármaco que está dissolvida no núcleo da partícula, portanto demora mais para ser liberada.

De posse dos dados de dissolução, fez-se necessário a modelagem destes perfis, afim de adequá-los ao modelo de liberação mais adequado.

5.2.8 Modelagem matemática dos perfis de liberação

A partir dos perfis de liberação obtidos, foi realizada a modelagem matemática desses perfis. Para isso, foram testados os modelos monoexponencial e biexponencial para verificar a melhor adequação aos perfis de liberação. A modelagem foi efetuada até o ponto em que a formulação atingiu 100 % de liberação. Considerando os valores para o critério de seleção do modelo e os valores de coeficiente de correlação, além do ajuste do gráfico, o modelo biexponencial foi a que melhor descreveu os dados obtidos a partir da dissolução das micropartículas. Os resultados dos valores calculados estão apresentados na Tabela 9, a modelagem dos perfis pelo modelo monoexponencial está apresentado na Figura 12 e para o modelo biexponencial na Figura 13, para MPDap.

Tabela 9. Valores do critério de seleção do modelo (MSC) e coeficiente de correlação (r) para os modelos monoexponencial e biexponencial, para a formulação MPDap.

Equação		MPDap 1	MPDap 2	MPDap 3
Monoexponencial	MSC	1,3125	-0,0900	0,1753
	r	0,9736	0,9066	0,9148
Biexponencial	MSC	6,8354	3,9046	3,5785
	r	0,9999	0,9989	0,9982

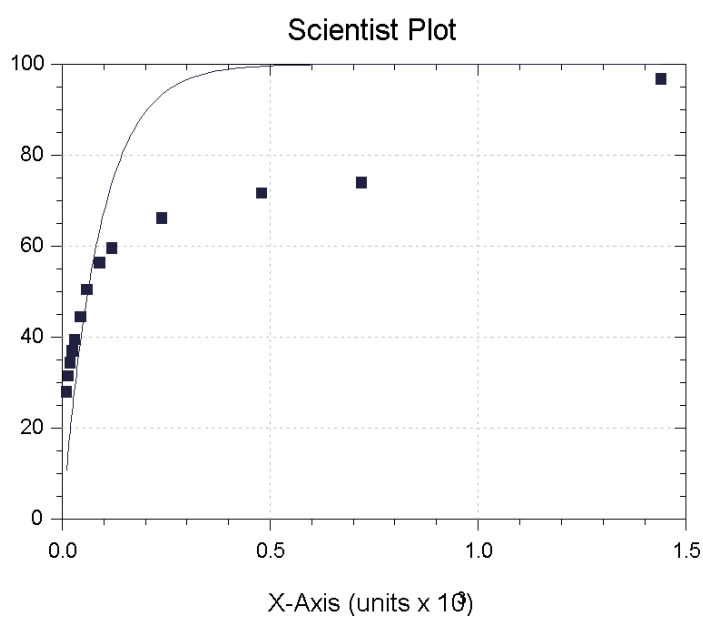


Figura 12. Ajuste de gráfico da formulação MPDap segundo o modelo monoexponencial.

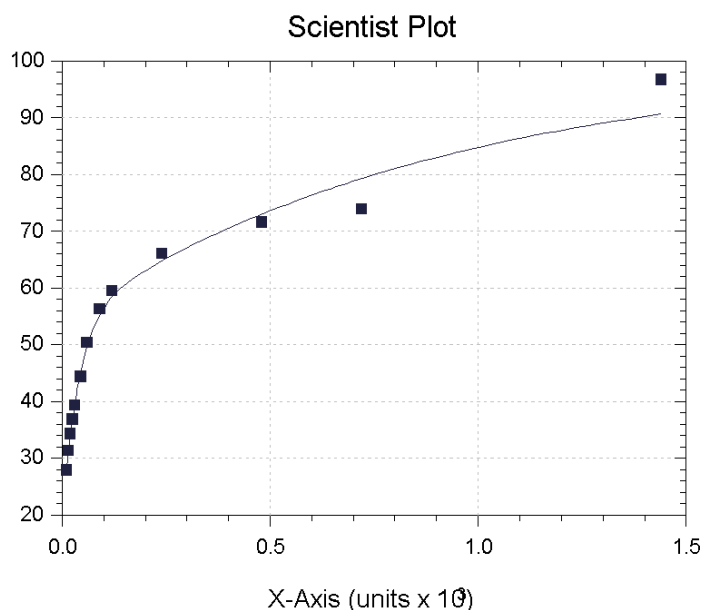


Figura 13. Ajuste de gráfico da formulação MPDap segundo o modelo biexponencial.

A partir da modelagem matemática, pode-se constatar matematicamente que as partículas apresentaram um perfil de dissolução constituído de uma fase de liberação rápida (*burst phase*) e de uma fase de liberação controlada (fase lenta), caracterizando-se como um modelo biexponencial.

Esta liberação rápida pode ser devido a uma porção do fármaco estar adsorvida ou retida na parede polimérica, mais próximo do meio de dissolução. Além disso, por ser um sistema polidisperso, a porção com partículas menores pode também contribuir para este *burst* de liberação, devido a uma maior disponibilidade do fármaco pela maior área superficial das micropartículas.

Após esta fase de liberação rápida, observa-se uma liberação controlada da dapsona até o final das 24 horas do ensaio de dissolução. Esta fase lenta de liberação ocorre devido à presença do polímero quitosana que possui propriedades para controlar ou retardar a liberação de fármacos a partir de sistema particulados contendo este polímero (Grenha, Seijo *et al.*, 2005). Obteve-se a dissolução total do fármaco ao final das 24 horas de experimento

A Tabela 10 apresenta os parâmetros calculados: constante de liberação da fase rápida (α) e da fase lenta (β), a fração de fármaco que contribuiu para cada

fase (A e B respectivamente), bem como o tempo de meia vida para cada uma das fases.

Tabela 10. Parâmetros obtidos a partir da modelagem matemática, segundo o modelo biexponencial, para as micropartículas MPDap: constantes de liberação (α e β), porcentagem de fármaco que contribuiu para cada etapa (A e B) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

Etapa		MPDap
Rápida	A (%)	54,5
	α (min^{-1})	0.025
	$t_{1/2}$ (min)	15.75
Lenta	B (%)	45,8
	β (min^{-1})	0.002
	$t_{1/2}$ (min)	213.06

Paralelamente, o perfil de liberação do fármaco livre foi modelado a partir do modelo monoexponencial, sendo obtidos os seguintes parâmetros: MSC 5,199, coeficiente de correlação de 0,9981, constante cinética de dissolução de $0,052 \text{ min}^{-1}$ e um tempo de meia vida de 13,45 minutos. Comparando-se esses valores ao obtidos para a fase lenta das micropartículas, pode-se constatar que houve um aumento significativo no tempo de meia vida, indicando a sustentação da liberação da dapsona.

A modelagem matemática dos perfis de dissolução também foi efetuada a partir da equação que descreve a Lei da Potência. Essa abordagem foi feita a fim de elucidar os mecanismos de liberação da dapsona a partir das micropartículas, pela determinação do parâmetro n . Os valores dos coeficientes de correlação, MSC e do parâmetro n , calculados para as micropartículas de quitosana (MPDap) estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros obtidos a partir da modelagem pela Lei da Potência para a formulação MPDap.

Parâmetro	MPDap
MSC	2.75
R	0.9807
<i>n</i>	0.39

Conforme pode-se observar as micropartículas apresentaram um *n* inferior ao estabelecido para processos caracterizados por difusão fickiana. Ritger e Peppas (1987) afirmaram, contudo, que em sistemas microparticulados polidispersos esses valores podem apresentar essa alteração (Ritger e Peppas, 1987). Eles descreveram que em uma mistura hipotética com 20 % de partículas de 20 µm, 60 % de 100 µm e 20 % de 500 µm pela lei da Potência foi determinado um *n* = 0,30, que é considerado diferente do valor obtido para uma amostra monodispersa de 100 µm (*n* = 0,43). Portanto, o valor calculado para MPDap (0,39), mesmo sendo inferior ao tabelado, pode se enquadrar nestas definições citadas. Dessa forma, pode-se concluir que as micropartículas de quitosana contendo dapsona possuem provavelmente um mecanismo de liberação governado pelo processo de difusão.

5.2.9 Análise da toxicidade pulmonar

A análise do fluido de lavagem bronco alveolar é uma das metodologias descritas na literatura para a avaliação da toxicidade de substâncias (Todo, Okamoto *et al.*, 2001). O resultado obtido do doseamento da lactato desidrogenase (LDH) dos grupos está apresentada na Figura 14.

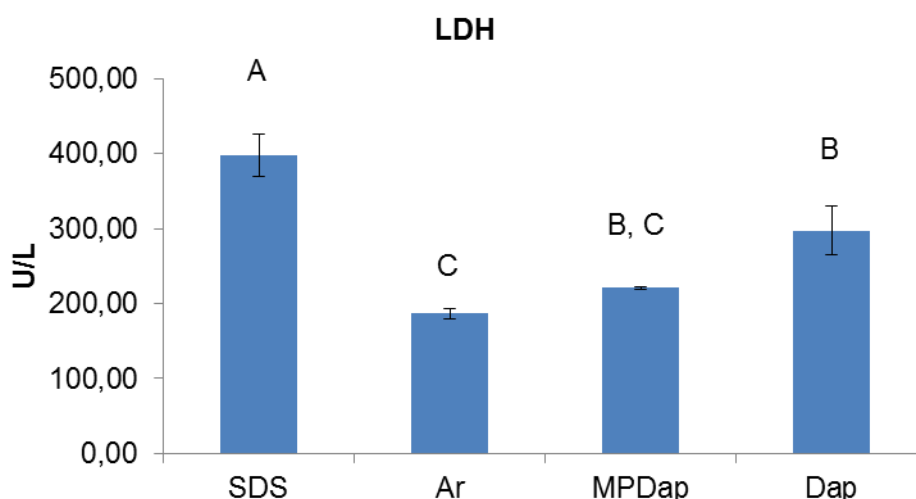


Figura 14. Doseamento da lactato desidrogenase no fluido de lavagem bronco alveolar dos animais tratados com dodecil sulfato de sódio (SDS, controle +), ar (controle -), MPDap (micropartículas de quitosana) e dapsona (livre).

Os resultados demonstraram que o SDS aumentou os níveis de LDH extracelular, caracterizando um efeito elevado de toxicidade. Contudo, tanto o fármaco, quanto as micropartículas apresentaram uma toxicidade significativamente inferior àquela apresentada pelo SDS (Hussain, Majumder *et al.*, 2006). Pela análise estatística, o grupo tratado com micropartículas obteve resultados significativamente iguais àqueles animais para os quais apenas ar foi administrado. Esse primeiro resultado demonstra que as micropartículas possivelmente não possuam toxicidade para o tecido pulmonar.

Outro indicativo de descontinuidade das membranas é a presença da enzima fosfatase alcalina no meio extracelular (Henderson, 2005; Hussain e Ahsan, 2005; Rawat, Yang *et al.*, 2008). A quantificação desta enzima está apresentada na Figura 15.

Os resultados obtidos demonstraram novamente a toxicidade do SDS sobre o tecido pulmonar. Novamente, tanto o fármaco, quanto as micropartículas apresentaram uma toxicidade significativamente inferior àquela apresentada pelo SDS. Para esse teste, as quantidades doseadas de fosfatase alcalina no meio extracelular, para o grupo tratado com micropartículas, foi inferior ao do grupo

tratado apenas com ar. Isso indica uma menor toxicidade para a dapsona quando microencapsulada em relação à forma livre, neste parâmetro bioquímico.

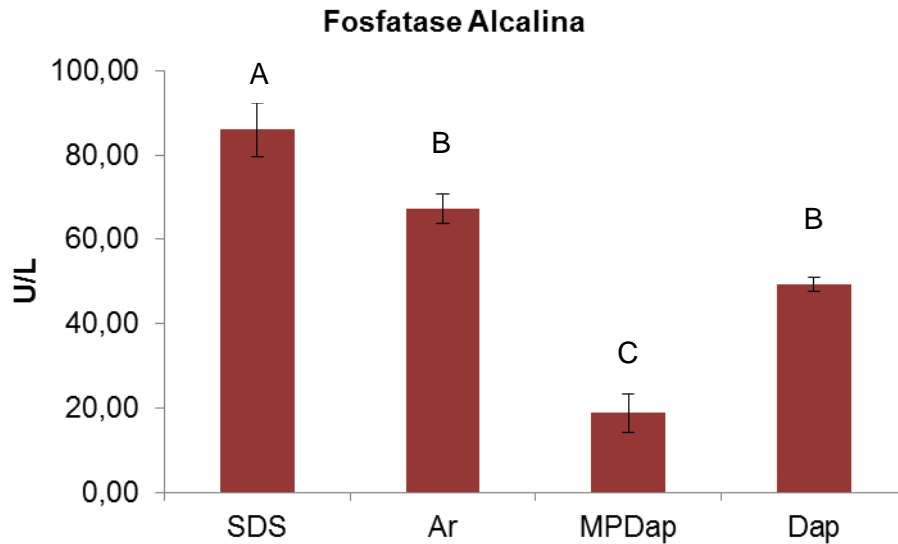


Figura 15. Doseamento da fosfatase alcalina no fluido de lavagem bronco alveolar dos animais tratados com dodecil sulfato de sódio (SDS, controle +), ar (controle -), MPDap (micropartículas de quitosana) e dapsona (livre).

Também foi realizada a quantificação dos níveis de proteínas totais e albumina no fluido de lavagem. Esses marcadores são importantes para avaliar o potencial citotóxico de tratamentos, pois uma vez quantificadas no meio extracelular, demonstram indícios de morte celular (Hussain, Majumder *et al.*, 2006). A quantificação dos níveis de proteínas totais e albumina do fluido de lavagem estão apresentadas na Figura 16 e na Figura 17, respectivamente.

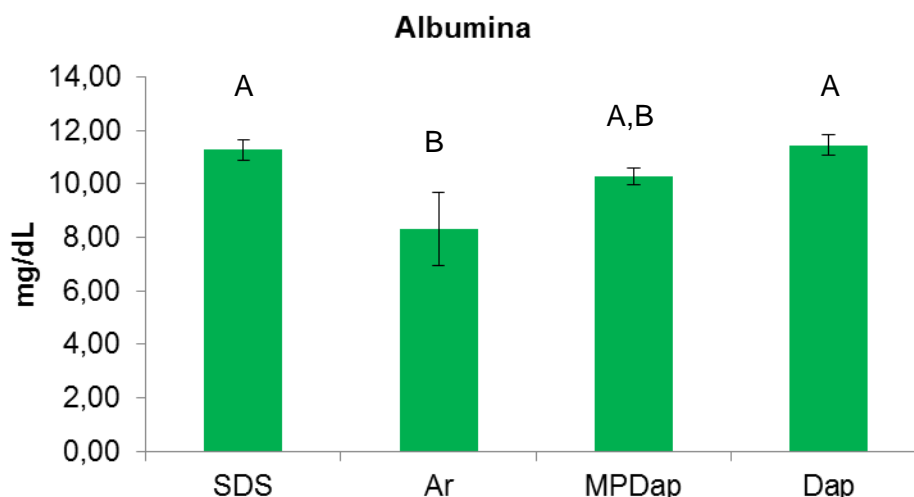


Figura 16 Doseamento de albumina no fluido de lavagem bronco alveolar dos animais tratados com dodecil sulfato de sódio (SDS, controle +), ar (controle -), MPDap (micropartículas de quitosana) e dapsona (livre).

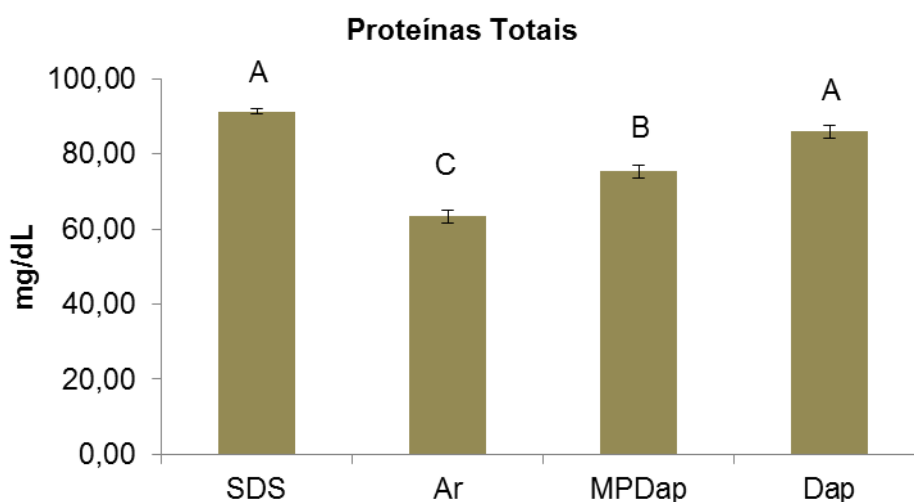


Figura 17 Doseamento de proteínas totais no fluido de lavagem bronco alveolar dos animais tratados com dodecil sulfato de sódio (SDS, controle +), ar (controle -), MPDap (micropartículas de quitosana) e dapsona (livre).

A Figura 16, referente à quantificação da albumina, mostra que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com SDS, fármaco livre e micropartículas. No entanto, também não houve diferença significativa entre os animais tratados com as micropartículas e o grupo tratado apenas com ar. Pelos dados obtidos sugere-se que esta análise pode não refletir uma conclusão exata da toxicidade dos tratamentos. Então, foi realizada a análise dos níveis de proteínas

totais presentes no fluido de lavagem. A Figura 17 mostra a quantificação das proteínas totais, onde se pode observar que os níveis proteicos, no grupo tratado com o fármaco livre, foram estatisticamente iguais ao grupo tratado com SDS, indicando similar toxicidade. Em contrapartida, esse teste bioquímico foi o primeiro a demonstrar que o tratamento com as micropartículas apresenta menor toxicidade que o tratamento com o fármaco livre e SDS. Um aspecto importante a ser ressaltado é a questão da liberação controlada da dapsona a partir das micropartículas, como evidenciado no experimento de dissolução *in vitro*. A menor toxicidade evidenciada da dapsona microencapsulada em relação à forma livre pode estar relacionada com a liberação controlada, ou seja, uma menor quantidade de dapsona está presente no tecido pulmonar na unidade do tempo. Isso sugere que o uso da dapsona encapsulada em micropartículas possivelmente reduz os riscos de toxicidade ao tecido pulmonar no tratamento com esse fármaco pelas vias aéreas.

5.2.10 Microscopia eletrônica de varredura dos pulmões

Foram obtidas fotos de microscopia eletrônica de varredura dos tecidos pulmonares retirados de um animal de cada grupo testado.

A partir da comparação das fotos de microscopia eletrônica de varredura dos tecidos pulmonares pode-se observar entre o pulmão sadio, que foi administrado apenas ar (Figura 18), e o pulmão que foi administrado a solução de SDS 0,1 % (Figura 19) uma diferença no aspecto do tecido.

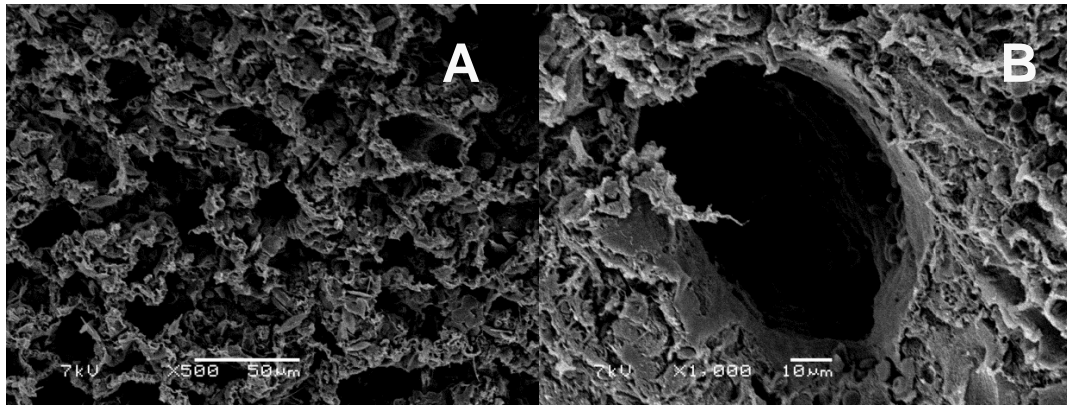


Figura 18 Fotomicrografias de pulmão sadio nos aumentos de 500 (A) e 2500x (B).

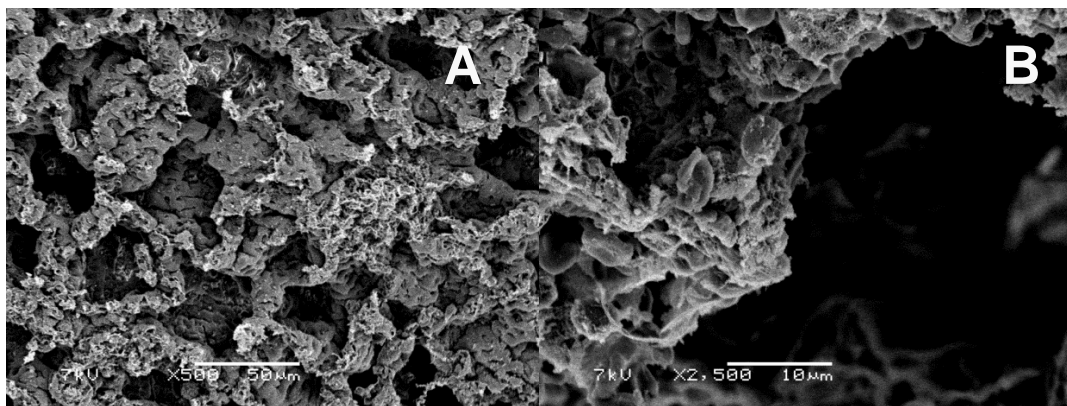


Figura 19 Fotomicrografias de pulmão danificado, tratado com solução de SDS 0,1 % nos aumentos de 500 (A) e 2500x (B).

Foi possível observar (Figura 18 – A) a constituição de um pulmão sadio com as inúmeras aberturas dos brônquios e bronquíolos e com mais detalhamento da luz do brônquio (Figura 18 – B). Por outro lado, na Figura 19 podemos evidenciar uma descontinuidade tecidual sugerindo lesão dos tubos respiratórios, pois percebe-se que as aberturas dos brônquios não são tão evidentes quanto nas fotomicrografias do pulmão sadio. Além disso, podemos observar a presença de hemácias no tecido mostrando que possivelmente ocorreu lesão vascular do tecido com extravasamento de eritrócitos para o meio (Figura 19 – B).

A Figura 20 mostra o tecido pulmonar tratado apenas com dapsona. Nestas fotos podemos ver as aberturas dos tubos respiratórios. No entanto, na Figura 20 – B podemos observar a presença de hemácias no tecido. Este resultado corrobora os

dados bioquímicos que indicaram que o tratamento com o fármaco livre causa dano celular.

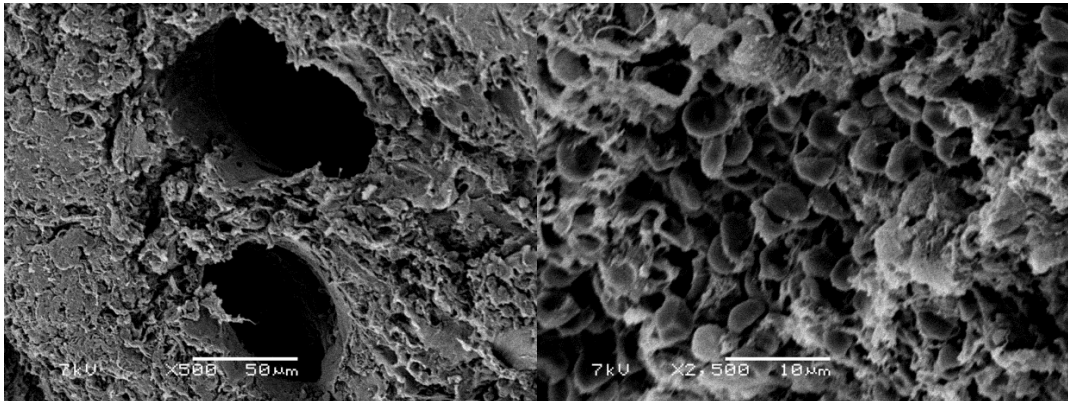


Figura 20 Fotomicrografias de pulmão danificado, tratado com dapsona livre nos aumentos de 500 (A) e 2500x (B).

A Figura 21 apresenta o tecido pulmonar que foi submetido ao tratamento com as micropartículas contendo dapsona. Nesta figura pode-se observar que o pulmão apresenta uma maior integridade tecidual, além disso foi possível observar a presença de micropartículas ainda aderidas ao tecido (Figura 21 – B).

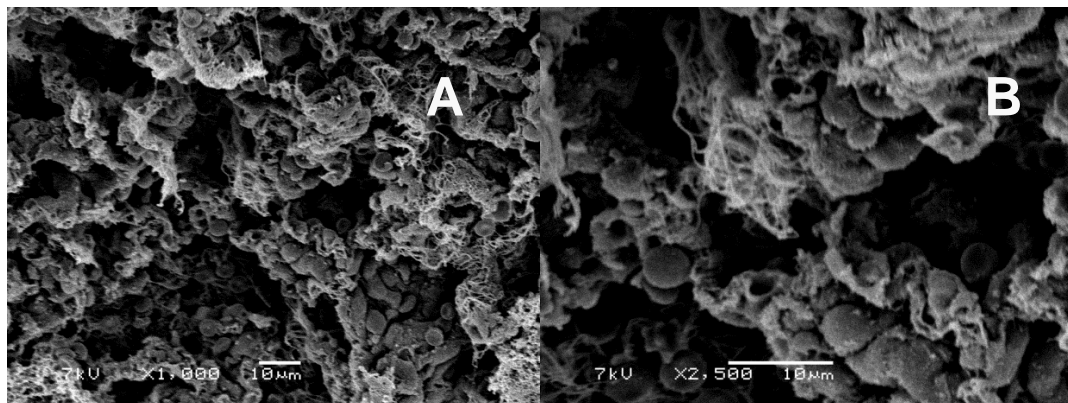


Figura 21 Fotomicrografias de pulmão tratado com micropartículas contendo dapsona nos aumentos de 1000 (A) e 2500x (B).

Na Figura 22 pode-se evidenciar a presença de uma micropartícula alocada na luz de um bronquíolo. Um aspecto importante a ser ressaltado é em relação ao diâmetro da luz do tubo respiratório (cerca de 4 μm) e o tamanho da micropartícula

inserida neste tubo (cerca de 3 μm), mostrando o tamanho reduzido das micropartículas e evidenciando à sua chegada às partes mais profundas dos pulmões, em regiões próxima aos alvéolos.

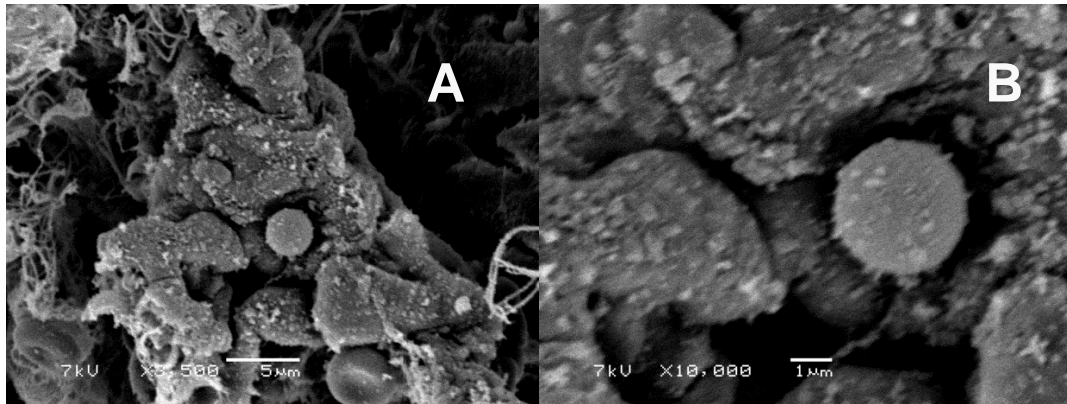


Figura 22 Fotomicrografias de pulmão tratado com micropartículas contendo dapsona nos aumentos de 5500 (A) e 10000x (B).

O método de *spray-drying* mostrou-se adequado para a sua obtenção das micropartículas. O rendimento do processo de secagem foi de, aproximadamente, 40%, no entanto, a quantidade de material coletado foi suficiente para a caracterização e avaliação das micropartículas.

O estudo de desaglomeração mostrou que as partículas, inicialmente aglomeradas, desaglomeram com o decorrer do tempo e agitação. Isso é evidenciado pela diminuição do tamanho médio e redução do *span*.

A análise de tamanho de partícula pela via seca demonstrou que as partículas apresentaram um tamanho geométrico médio de 8,5 μm . A análise do diâmetro aerodinâmico mostrou que as micropartículas de quitosana possuem um diâmetro médio em torno de 4,5 μm . Este diâmetro é ideal para a administração pulmonar, pois está dentro da faixa preconizada na literatura.

A morfologia das partículas, por microscopia eletrônica de varredura, evidenciou que as micropartículas apresentaram um formato esférico, superfície lisa e ausência de poros. As micropartículas apresentaram um tamanho entre 1 e 5 μm , que é inferior àquele obtido na análise por difratometria, sendo o tamanho obtido na análise por MEV mais condizente à faixa ideal para a administração pulmonar.

As micropartículas apresentaram um perfil de dissolução *in vitro* descrito pelo modelo biexponencial, apresentando uma fase de liberação rápida (*burst phase*) e uma fase de liberação controlada, a qual é significativamente mais lenta que a dissolução do fármaco livre. Através da análise pela Lei da Potência foi possível constatar que as partículas não sofrem inchamento, tendo sua liberação controlada por difusão.

O perfil de deposição *in vitro* das micropartículas utilizando o impactador em cascata de Andersen mostrou que cerca de 38% das micropartículas ficam aderidas na parte do equipamento relacionada a região orofaríngea. No entanto, a porção de partículas finas respiráveis, que são a porção terapêutica das micropartículas, foi em torno de 50%, sendo essa quantidade considerada satisfatória para a aplicação pulmonar.

O experimento *in vivo* da análise da toxicidade pulmonar mostrou que a quantificação da LDH apresentou uma toxicidade significativamente inferior àquela

apresentada pelo SDS, porém significativamente igual àqueles animais tratado apenas com dapsona livre. Por outro lado, a análise das proteínas totais e fosfatase alcalina, no fluido de lavagem, mostraram que o grupo tratado com o fármaco livre igual ao tratado com SDS. Por sua vez, o grupo com as micropartículas foi estatisticamente inferior ao grupo tratado com o fármaco livre e SDS. Esse primeiro resultado demonstra que as micropartículas possivelmente não possuam toxicidade para o tecido pulmonar.

A partir das fotos de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que as micropartículas foram capazes de chegar nas partes mais profundas dos pulmões, pois foram observadas na luz dos bronquíolos com diâmetro inferior à 5 μm .

O conjunto dos resultados experimentais apresentados neste trabalho sinaliza que as micropartículas de quitosana obtidas por *spray-drying* são uma estratégia bastante promissora para a administração pulmonar da dapsona.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A. *et al.* Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 5-28, Nov 5 2004.

AL-QADI, S. *et al.* Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. *Carbohydrate Polymers* [S.I.], v. 86, n. 1, p. 25-34, 2011.

ALHALAWEH, A. *et al.* Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. *Eur J Pharm Sci* [S.I.], v. 38, n. 3, p. 206-14, Oct 8 2009.

AMARO, M. I. *et al.* Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporous microparticles (NPMPs) intended for inhalation. *Int J Pharm* [S.I.], v. 421, n. 1, p. 99-109, Dec 12 2011.

ANDRIANOV, A. K.; PAYNE, L. G. Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates. *Adv Drug Deliv Rev* [S.I.], v. 34, n. 2-3, p. 155-170, Dec 1 1998.

AOKI, Y. *et al.* Respirable dry powder formulation of bleomycin for developing a pulmonary fibrosis animal model. *J Pharm Sci* [S.I.], v. 101, n. 6, p. 2074-81, Jun 2012.

AQUINO, R. P. *et al.* Dry powder inhalers of gentamicin and leucine: formulation parameters, aerosol performance and in vitro toxicity on CuFi1 cells. *Int J Pharm* [S.I.], v. 426, n. 1-2, p. 100-7, Apr 15 2012.

BENNETT, N. J. G. S. A. R., FREDERICK BURTON; MCLEAN, JOSEPH C; MURRAY, CLINTON; SCHREIBMAN, TANYA S; RIGSBY, MICHAEL. Pneumocystis (carinii) jiroveci Pneumonia. *eMedicine Infectious Diseases* 2010.

BLUM, R. N. *et al.* Comparative trial of dapsone versus trimethoprim/sulfamethoxazole for primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* [S.I.], v. 5, n. 4, p. 341-7, 1992.

CARVALHO, T. C. *et al.* Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? *Int J Pharm* [S.I.], v. 406, n. 1-2, p. 1-10, Mar 15 2011.

CHOUGULE, M. *et al.* Development of spray dried liposomal dry powder inhaler of Dapsone. *AAPS PharmSciTech* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 47-53, 2008.

CHOW, A. L. *et al.* Particle Engineering for Pulmonary Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* [S.I.], v. 24, n. 3, p. 411-437, 2007/03/01 2007.

COLEMAN, M. D. Dapsone-mediated agranulocytosis: risks, possible mechanisms and prevention. *Toxicology* [S.I.], v. 162, n. 1, p. 53-60, Apr 12 2001.

COSTA JR., E. D. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova* [S.I.], v. 31, p. 1460-1466, 2008.

CUSHION, M. T. *et al.* Method of testing the susceptibility of *Pneumocystis carinii* to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* [S.I.], v. 28, n. 6, p. 796-801, Dec 1985.

D'ADDIO, S. M. *et al.* Constant size, variable density aerosol particles by ultrasonic spray freeze drying. *Int J Pharm* [S.I.], v. 427, n. 2, p. 185-91, May 10 2012.

DANDEKAR, P. *et al.* Pulmonary targeting of nanoparticle drug matrices. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* [S.I.], v. 23, n. 6, p. 343-53, Dec 2010.

DE BOER, A. H. *et al.* In vitro performance testing of the novel Medspray wet aerosol inhaler based on the principle of Rayleigh break-up. *Pharm Res* [S.I.], v. 25, n. 5, p. 1186-92, May 2008.

DE SOUZA, W.; BENCHIMOL, M. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 100, n. 8, p. 903-8, Dec 2005.

DONOVAN, M. J. *et al.* Dry powder inhaler device influence on carrier particle performance. *J Pharm Sci* [S.I.], v. 101, n. 3, p. 1097-107, Mar 2012.

EL-SHERBINY, I. M. *et al.* Swellable microparticles as carriers for sustained pulmonary drug delivery. *J Pharm Sci* [S.I.], v. 99, n. 5, p. 2343-56, May 2010.

EL-SHERBINY, I. M.; SMYTH, H. D. Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: (I) self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres. *Int J Pharm* [S.I.], v. 395, n. 1-2, p. 132-41, Aug 16 2010.

ESPOSITO, E. *et al.* Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int J Pharm* [S.I.], v. 242, n. 1-2, p. 329-34, Aug 21 2002.

FISHMAN, J. A. Treatment of infection due to *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 1309-14, Jun 1998.

FRIJLINK, H. W.; DE BOER, A. H. Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 67-86, Nov 2004.

GERVELAS, C. *et al.* Direct lung delivery of a dry powder formulation of DTPA with improved aerosolization properties: effect on lung and systemic decorporation of plutonium. *J Control Release* [S.I.], v. 118, n. 1, p. 78-86, Mar 12 2007.

GRENHA, A. *et al.* Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [S.I.], v. 25, n. 4-5, p. 427-437, 2005.

GUTIERREZ, S. *et al.* High Prevalence of *Pneumocystis jiroveci* Colonization Among Young HIV-Infected Patients. *Journal of Adolescent Health* [S.I.], v. 48, n. 1, p. 103-105, Jan 2011.

GUYOT *et al.* *Commentaires relatifs aux methodes generales d'analyse des formes orales solides rceemment introduites dans les pharmacopes franaise et europeenne. Rapport d'une commission SFSTP.* Paris, FRANCE: Editions de sant, 1995. (6).

HAMISHEHKAR, H. *et al.* Effect of carrier morphology and surface characteristics on the development of respirable PLGA microcapsules for sustained-release pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm* [S.I.], v. 389, n. 1-2, p. 74-85, Apr 15 2010.

HE, L. *et al.* Improvement of pulmonary absorption of insulin and other water-soluble compounds by polyamines in rats. *J Control Release* [S.I.], v. 122, n. 1, p. 94-101, Sep 11 2007.

HENDERSON, R. F. Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. *Exp Toxicol Pathol* [S.I.], v. 57 Suppl 1, p. 155-9, Jul 2005.

HIRA, D. *et al.* Development of dry salbutamol sulfate powder with high inhalation performance independent of inhalation patterns. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* [S.I.], v. 60, n. 3, p. 334-40, 2012.

HUGHES, W. T. Pneumocystis carinii Pneumonia. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* v. 12. n. 42001. p. 309 - 314.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. State of insulin self-association does not affect its absorption from the pulmonary route. *Eur J Pharm Sci* [S.I.], v. 25, n. 2-3, p. 289-98, Jun 2005.

HUSSAIN, A. *et al.* Inhaled insulin is better absorbed when administered as a dry powder compared to solution in the presence or absence of alkylglycosides. *Pharm Res* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 138-47, Jan 2006.

ISLAM, N.; CLEARY, M. J. Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery--a review for multidisciplinary researchers. *Med Eng Phys* [S.I.], v. 34, n. 4, p. 409-27, May 2012.

JYOTHI, N. V. *et al.* Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 187-97, May 2010.

KAIALY, W. *et al.* Effect of carrier particle shape on dry powder inhaler performance. *Int J Pharm* [S.I.], v. 421, n. 1, p. 12-23, Dec 12 2011.

KAWAGUCHI, H. Functional polymer microspheres. *Progress in Polymer Science* [S.I.], v. 25, n. 8, p. 1171-1210, 2000.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [S.I.], v. 27, n. 1, p. 48-49, 1975.

KLEINSTREUER, C. *et al.* Targeted Drug-Aerosol Delivery in the Human Respiratory System. *Annual Review of Biomedical Engineering* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 195-220, 2008.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KOVACS, J. A. *et al.* New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Jama-Journal of the American Medical Association* [S.I.], v. 286, n. 19, p. 2450-2460, Nov 2001.

LEAROYD, T. P. *et al.* Sustained delivery by leucine-modified chitosan spray-dried respirable powders. *Int J Pharm* [S.I.], v. 372, n. 1-2, p. 97-104, May 8 2009.

LEE, B. L. *et al.* Dapsone, trimethoprim, and sulfamethoxazole plasma levels during treatment of *Pneumocystis pneumonia* in patients with the acquired

immunodeficiency syndrome (AIDS). Evidence of drug interactions. *Ann Intern Med* [S.I.], v. 110, n. 8, p. 606-11, Apr 15 1989.

LI, F. Q. *et al.* A novel spray-dried nanoparticles-in-microparticles system for formulating scopolamine hydrobromide into orally disintegrating tablets. *Int J Nanomedicine* [S.I.], v. 6, p. 897-904, 2011.

MUEANNOOM, W. *et al.* Thermal ink-jet spray freeze-drying for preparation of excipient-free salbutamol sulphate for inhalation. *Eur J Pharm Biopharm* [S.I.], v. 80, n. 1, p. 149-55, Jan 2012.

ONEDA, F.; RE, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. *Powder Technology* [S.I.], v. 130, n. 1, p. 377-384, 2003.

OOMAH, B. D. *et al.* Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry* [S.I.], v. 69, n. 2, p. 187-193, 2000.

PILCER, G.; AMIGHI, K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* [S.I.], v. 392, n. 1-2, p. 1-19, Jun 15 2010.

PILCER, G. *et al.* Lactose characteristics and the generation of the aerosol. *Adv Drug Deliv Rev* [S.I.], v. 64, n. 3, p. 233-56, Mar 15 2012.

RAMESH, M.; CHANDRASEKAR, P. H. Effective alternates to trimethoprim-sulfamethoxazole as antimicrobial prophylaxis in stem cell recipients: are there any? *Pediatr Transplant* [S.I.], v. 12, n. 8, p. 823-6, Dec 2008.

RAVI KUMAR, M. N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci* [S.I.], v. 3, n. 2, p. 234-58, May-Aug 2000.

RAWAT, A. *et al.* Complexation of a poly-L-arginine with low molecular weight heparin enhances pulmonary absorption of the drug. *Pharm Res* [S.I.], v. 25, n. 4, p. 936-48, Apr 2008.

REDDY, C. *et al.* Drug usage evaluation of dapsone. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [S.I.], v. 71, n. 4, p. 456-460, Jul 1 2009.

REVEIZ, L. *et al.* Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 341-9, Oct 2009.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

ROUSE, J. J. *et al.* Controlled drug delivery to the lung: Influence of hyaluronic acid solution conformation on its adsorption to hydrophobic drug particles. *Int J Pharm* [S.I.], v. 330, n. 1-2, p. 175-82, Feb 7 2007.

SAGO, J.; HALL, R. P. Dapsone. *Dermatologic Therapy* [S.I.], v. 15, n. 4, p. 340-351, 2002.

SANSONE, F. *et al.* Physical characteristics and aerosol performance of naringin dry powders for pulmonary delivery prepared by spray-drying. *Eur J Pharm Biopharm* [S.I.], v. 72, n. 1, p. 206-13, May 2009.

SOU, T. *et al.* Investigating the interactions of amino acid components on a mannitol-based spray-dried powder formulation for pulmonary delivery: A design of experiment approach. *Int J Pharm* [S.I.], v. 421, n. 2, p. 220-9, Dec 15 2011.

SOUSA, A. R. D. D. *et al.* Hanseníase simulando erupção liquenóide: relato de caso e revisão de literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [S.I.], v. 85, p. 224-226, 2010.

THOMAS, C. *et al.* Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles. *Pharm Res* [S.I.], v. 27, n. 5, p. 905-19, May 2010.

TODO, H. *et al.* Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats. *Int J Pharm* [S.I.], v. 220, n. 1-2, p. 101-10, Jun 4 2001.

TOMODA, K. *et al.* Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles for treatment of lung cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [S.I.], v. 71, n. 2, p. 177-182, 2009.

TONON, R. V. *et al.* Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [S.I.], v. 29, p. 444-450, 2009.

TSAGOGIORGAS, C. *et al.* Aerosolized semifluorinated alkanes as excipients are suitable for inhalative drug delivery--a pilot study. *Int J Pharm* [S.I.], v. 422, n. 1-2, p. 194-201, Jan 17 2012.

VARGAS, M. *et al.* Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 536-547, 2009.

VEHRING, R. Pharmaceutical Particle Engineering & Spray Drying. *Pharmaceutical Research* [S.I.], v. 25, n. 5, p. 999-1022, 2008.

VEHRING, R. *et al.* Particle formation in spray drying. *Journal of Aerosol Science* [S.I.], v. 38, n. 7, p. 728-746, 2007.

VUKOVIĆ, G. D. *et al.* The response of peritoneal macrophages to dapsona covalently attached on the surface of carbon nanotubes. *Carbon* [S.I.], v. 48, n. 11, p. 3066-3078, 2010.

WANG, Y. *et al.* A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Int J Pharm* [S.I.], v. 424, n. 1-2, p. 98-106, Mar 15 2012.

WILLIS, L. *et al.* Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. *Lung* [S.I.], v. 190, n. 3, p. 251-62, Jun 2012.

WOLF, R. *et al.* Dapsone: unapproved uses or indications. *Clin Dermatol* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 37-53, Jan-Feb 2000.

YANG, J. F. *et al.* Thymosin-loaded enteric microspheres for oral administration: Preparation and in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics* [S.I.], v. 301, n. 1-2, p. 41-47, 2005.

ZHANG, X. *et al.* The development of a novel dry powder inhaler. *Int J Pharm* [S.I.], v. 431, n. 1-2, p. 45-52, Jul 15 2012.

ZHU, Y. I.; STILLER, M. J. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *J Am Acad Dermatol* [S.I.], v. 45, n. 3, p. 420-34, Sep 2001.

8.1 ANEXO 1

8.1.1 Validação de método analítico para doseamento de dapsona em micropartículas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

O método analítico para o doseamento da dapsona foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os parâmetros avaliados foram: especificidade (frente a uma formulação de micropartículas sem o fármaco), linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limites de detecção e quantificação sendo os ensaios realizados em cromatógrafo Perkin Elmer Série 200 com detector UV/VIS. Os parâmetros cromatográficos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da dapsona em sistemas microparticulados.

Parâmetros	Condições
Detecção	UV ($\lambda = 293 \text{ nm}$)
Fluxo	0.7 mL/min
Coluna	LiChrospher 100 RP ₁₈ (5 μm) (Merck)
Fase móvel	Acetonitrila:água:ácido acético glacial (40:59:1 v/v)
Volume de injeção	100 μL

Para avaliação da especificidade, uma suspensão de micropartículas foi preparada da mesma forma que a suspensão de micropartículas contendo dapsona, porém sem a presença do fármaco. O mesmo volume, tratamento e diluição das partículas utilizado no teste de precisão foi utilizado para o teste de especificidade, porém utilizando-se a suspensão sem fármaco. Nesse teste nenhum pico de absorção foi detectado no tempo onde a dapsona é detectada, concluindo-se que o método é específico (Figura 23).

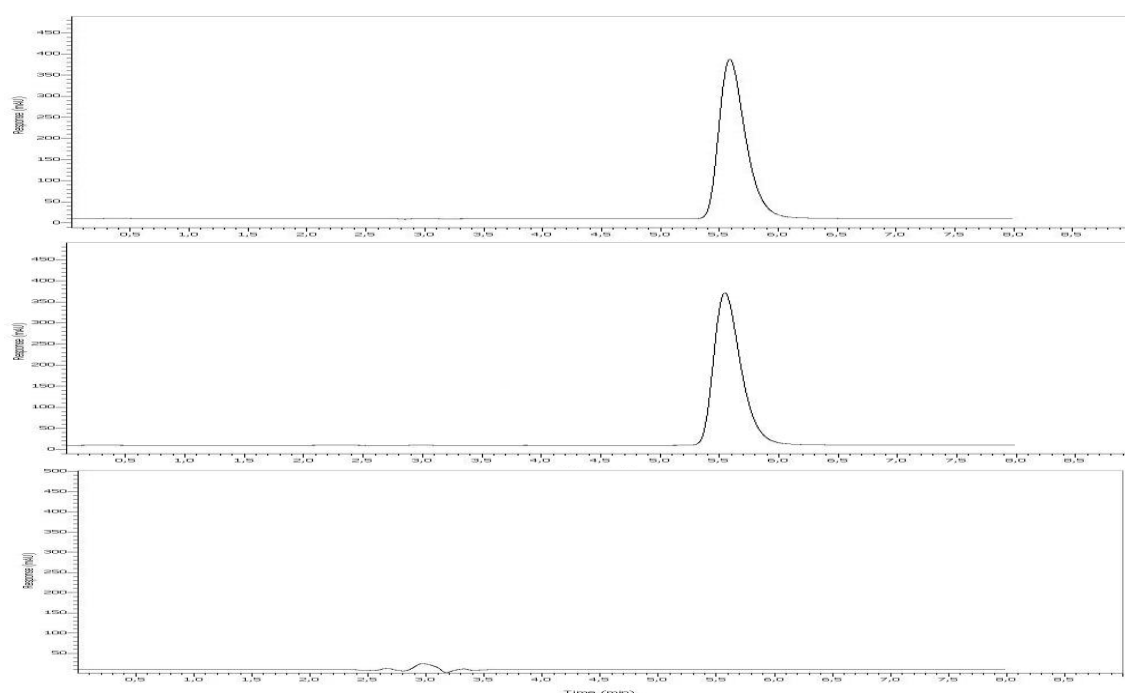


Figura 23. Em A) ponto da curva 7 $\mu\text{g/mL}$, B) micropartículas referente ao ponto 7 $\mu\text{g/mL}$ e C) micropartículas sem fármaco.

Para a avaliação da linearidade, três curvas analíticas foram construídas, com uma faixa de concentração utilizada de 0,10 a 10,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo todas diluições realizadas em fase móvel. As amostras foram filtradas através de membrana com 0,45 μm de poro (Durapore, Millipore[®]) antes das análises e injetadas no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas. Na Figura 24 apresentam-se a média das três curvas de analíticas.

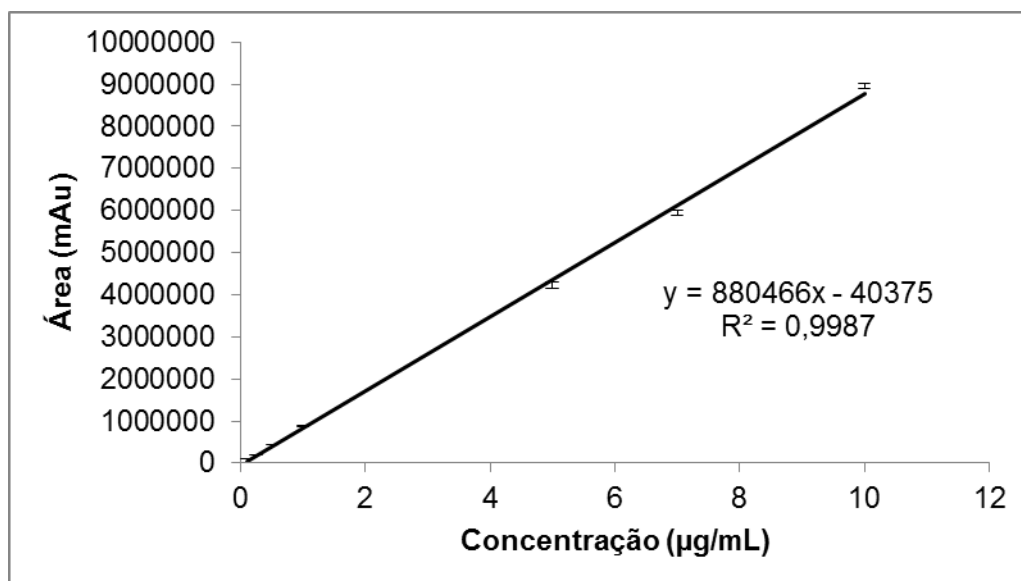


Figura 24. Representação gráfica da média das três curvas analíticas.

Na avaliação da repetibilidade seis amostras foram preparadas a partir das suspensões de micropartículas, para uma concentração de 1 µg/mL de dapsona. Para tanto as micropartículas foram diluídas em acetonitrila e levadas à extração em banho de ultrassom por 30 minutos para a total liberação do fármaco. Posteriormente, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi diluído 20 vezes em fase móvel. Após, as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm de poro (Durapore, Millipore®) e injetadas no CLAE, sendo o resultado da análise expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR). A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre as injeções dessa mesma concentração (1 µg/mL) realizadas em dois dias consecutivos, calculando-se, posteriormente, o DPR dos resultados das determinações.

O teste de exatidão foi realizado adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco, a partir de uma solução mãe, a uma amostra branca de micropartículas tratada da mesma forma que as partículas de fármaco no teste de precisão. As concentrações utilizadas para o teste de exatidão foram de 0,25, 1,0 e 7,0 µg/mL.

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade apresentou DPR de 2,8 %

para a sextuplicata da concentração de 1,3 µg/mL. A precisão intermediária foi avaliada em dois dias consecutivos, com seis amostras em cada dia, de mesma concentração (1,3 µg/mL). Os valores de DPR foram 2,8 % e 2,4 % para cada dia. Para ambos os estudos os valores de desvios padrões relativos foram inferiores a 5 %, conforme preconizado pelo ICH (2005) e RE 899 (ANVISA), demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão. No que diz respeito à exatidão, o método permitiu a recuperação de 110,0 ± 1,3% para a concentração de 0,25 µg/mL; 103,5 ± 0,2% para 1,0 µg/mL e 100,2 ± 2,2% para 7,0 µg/mL, o que o caracteriza como exato, segundo os preceitos da *International Conference on Harmonization* (2005) e RE 899 (ANVISA).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente, utilizando as equações 8 e 9, através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma da *International Conference on Harmonization* (2005)

$$LD = \frac{3,33 \cdot DP}{A} \quad \text{Equação 8}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{A} \quad \text{Equação 9}$$

onde LD é o limite de detecção, LQ o limite de quantificação, DP o desvio padrão da reta de calibração e B o coeficiente angular da reta de calibração.

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,01 µg/mL e 0,03 µg/mL, respectivamente.

A fase móvel foi considerada adequada, o pico referente à dapsona (Figura 25) apresentou-se bem definido e com tempo de análise de 5,5 minutos.

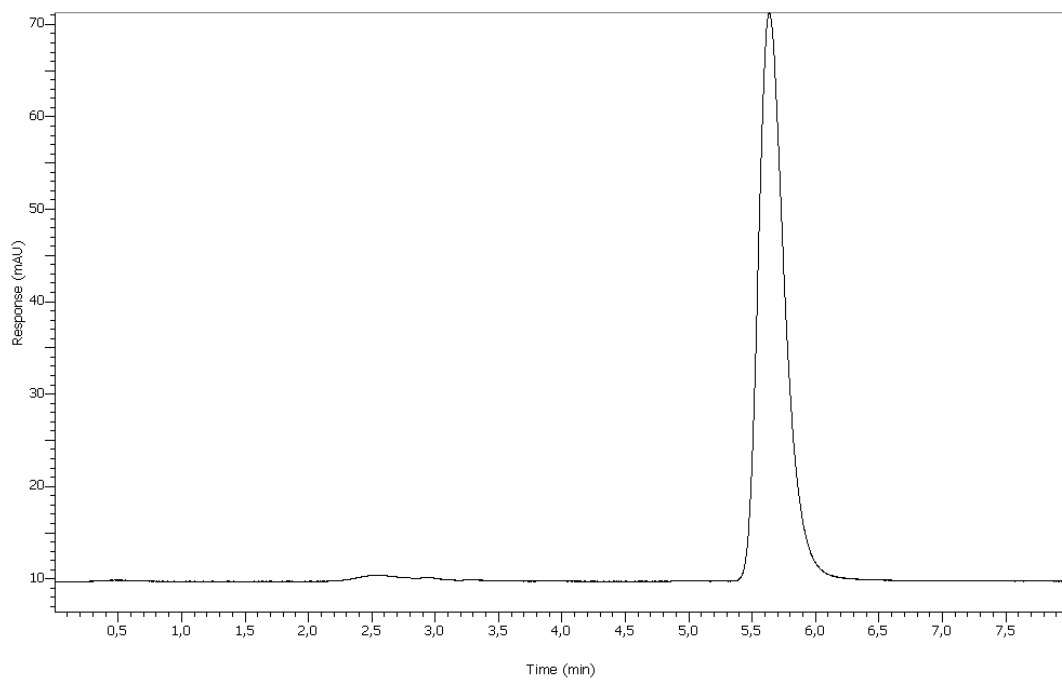


Figura 25. Cromatograma referente ao ponto de concentração 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dapsona.

8.2 ANEXO 2

8.2.1 Validação de método analítico para doseamento de dapsona em micropartículas por espectroscopia UV

O método analítico para o doseamento da dapsona nos experimentos de liberação foi realizado através de espectroscopia UV.

Os parâmetros avaliados foram: especificidade (frente a uma formulação de micropartículas sem o fármaco), linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, limites de detecção e quantificação sendo os ensaios realizados em Espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV – 160A), em comprimento de onda de 260 nm usando como solvente acetonitrila.

Para avaliação da especificidade, uma formulação branca foi preparada com todos os componentes das micropartículas, porém sem a presença do fármaco (Figura 26). O mesmo volume, tratamento e diluição das micropartículas utilizadas no teste de precisão foi utilizado para o teste de especificidade, porém utilizando-se a micropartícula sem fármaco. Foi efetuada uma varredura com essa formulação, não sendo observado nenhum pico de absorção em 293 nm. Dessa forma o método foi considerado específico.

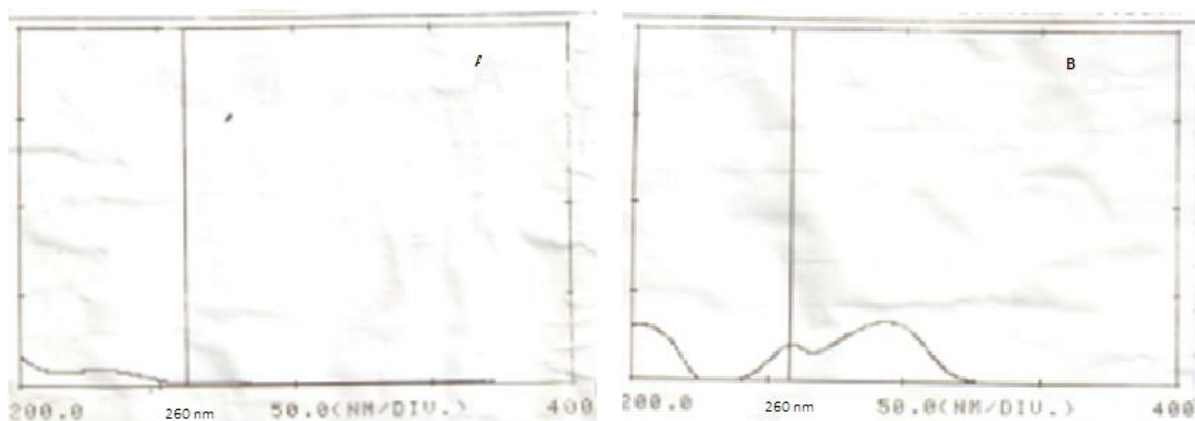


Figura 26. Em A) micropartículas sem fármaco e B) micropartículas referente ao ponto 5 µg/mL.

Para a avaliação da linearidade três curvas analíticas foram construídas, a partir de três soluções-mãe diferentes, com uma faixa de concentração utilizada de 1,0 a 10,0 µg/mL. Na Figura 27 a representação da média das três curvas analíticas. Os limites de detecção (Equação 8) e quantificação (Equação 9) foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma da *International Conference on Harmonization* - ICH (2005) e RE 899 (ANVISA).

$$LD = \frac{3,33 \cdot DP}{A} \quad \text{Equação 8}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{A} \quad \text{Equação 9}$$

onde LD é o limite de detecção, LQ o limite de quantificação, DP o desvio padrão da reta de calibração e B o coeficiente angular da reta de calibração.

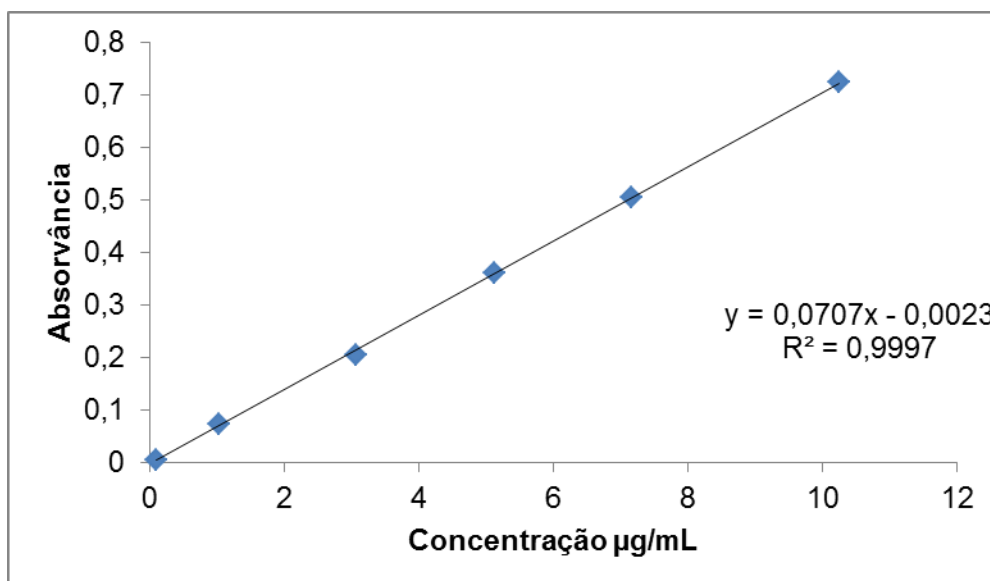


Figura 27. Representação gráfica da média das 3 curvas analíticas.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações 9 e 10 com base nos resultados do experimento de linearidade. Dessa forma, os valores encontrados foram de 0,15 µg/mL para o limite de detecção e 0,45 µg/mL para o limite de quantificação.

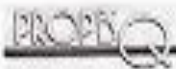
Na avaliação da repetibilidade seis amostras foram preparadas a partir das micropartículas, para uma concentração que estivesse dentro da curva analítica. Para isso 50 mg de pó foram adicionadas a um balão volumétrico (25 mL) com acetonitrila e levadas ao processo de extração por de 30 minutos em banho de ultrasson. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, diluído em acetonitrila (200 µL em um balão de 10 mL), filtrado em membrana de 0,45 µm (Durapore, Millipore®) e analisado por espectroscopia UV.

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade apresentou DPR de 3,05 % para a sextuplicata. A precisão intermediária foi avaliada em três dias consecutivos, com três amostras em cada dia, de mesma concentração. Os valores de DPR foram 3,05 %, 1,93 % e 0,94 % para cada dia. Para ambos os estudos os valores de

desvios padrões relativos foram inferiores a 5 %, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão.

8.3 ANEXO 3

3.1 Carta de aprovação do comitê de ética de pesquisa em animais – CEUA – UFRGS

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21411

Título: Desenvolvimento e caracterização de um novo sistema microparticulado para a administração pulmonar de dapsona, contendo polímero catiônico, e avaliação toxicológica em modelos animais *in vivo*


Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

SILVIA STANISCUASKI GUTERRES - coordenador desde 29/06/2011
ADRIANA RAFFIN POHLMANN - pesquisador desde 29/06/2011
Denise Soledade Jornada - pesquisador desde 29/06/2011
Manoel Oriz de Oliveira - pesquisador desde 29/06/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 24 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 18 de Dezembro de 2012

 _____ STELA MARIS KUZEL RATES Coordenador da comissão de ética	 _____ Bruno Cassel Neto Vice-Pro-Reitor de Pesquisas PROPESQ/UFRGS
--	---