

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA**

Desenvolvimento de sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína lipossomal
empregando a técnica de secagem por aspersão

ALINE FERREIRA OURIQUE

PORTO ALEGRE, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

Desenvolvimento de sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína lipossomal
empregando a técnica de secagem por aspersão

Tese apresentada por **Aline Ferreira Ourique**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Nanotecnologia Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14.02.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Maria Ismenia Zulian Lionzo
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Nadia Maria Volpato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Ourique, Aline Ferreira
Desenvolvimento de sistemas pulverulentos
contendo N-acetilcisteína lipossomal empregando a
técnica de secagem por aspersão / Aline Ferreira
Ourique. -- 2014.
157 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2014.

1. Secagem por aspersão. 2. N-acetilcisteína. 3.
Lipossomas. I. Beck, Ruy Carlos Ruver, orient. II.
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com financiamento do CNPq, da CAPES, da FAPERGS e do INCT_if/CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Getulio e Marli, meu irmão Atos e meu marido Fabricio

.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ruy Carlos Ruver Beck que me aceitou como aluna de iniciação científica quando eu cursava o primeiro semestre do curso de Farmácia, e hoje me formou doutora. Muito obrigada pela confiança, orientação, amizade, estímulo e todos os ensinamentos pessoais e profissionais durante estes oito anos de convivência.

As professoras Silvia S. Guterres e Adriana R. Pohlmann por terem me recebido em seus laboratórios, pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa renomado, e também pelas contribuições científicas.

À professora Solange C. Garcia e seus alunos, em especial, Ane, Rafa, Juliano e Elisa pela disponibilidade e colaboração na execução do experimento piloto *in vivo*.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios 405 e K204 pelos momentos de discussão científica e também pelos momentos de descontração e “BDs”. Foi muito bom conhecer e conviver com vocês. Em especial à Gabriele, à Kari, à Rê, ao Noé, ao Diego, e ao Manu. Obrigada queridos amigos!

À minha querida “IC”, hoje doutoranda, Paula dos Santos Chaves, pela dedicação, empenho, amizade e apoio durante estes anos de doutorado.

À minha amiga do coração Karine Coradini que esteve sempre comigo, obrigada pela amizade linda que construímos, pelo incentivo, companheirismo e por todos os momentos que compartilhamos juntas.

Aos meus amigos de infância, da época da Faculdade, aos amigos do Clube Dores e da UFSM, e também a minha sogra, a minha sobrinha Isadora e demais familiares que muitas vezes foram negligenciados pela correria do doutorado. Obrigada pelo simples fato de existirem, por me apoiarem, por acreditarem em mim e entenderem a minha ausência.

Aos meus pais por todos os ensinamentos, pelo exemplo de honestidade e bravura, pelo amor e carinho incondicionais, e pela compreensão. Amo muito vocês! Vocês são motivos de muito orgulho, e esta conquista é para vocês!

Ao meu irmão Atos que esteve sempre comigo seja, fisicamente ou nas ligações, quase que diárias, obrigada pelo apoio e pelo carinho.

Ao meu marido Fabricio (Bitio) por tudo. Obrigada pelo incentivo constante, pelo amor, carinho, compreensão, paciência e pela calma e serenidade em me

acalmar quando estive angustiada com o futuro. Obrigada pelo abraço apertado nas horas difíceis, por enxugar as minhas lágrimas depois de um dia complicado ou de um experimento frustrado, obrigada por cuidar de mim. Obrigada também por ter tido a brilhante idéia de termos um “bebê canino”, o Brutus, que foi meu companheiro nos momentos da redação da tese e que sempre me esperou em casa saltitando de felicidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica pelas oportunidades de crescimento científico.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

A presente tese foi redigida na forma de encarte de publicações para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos, e encontra-se dividida da seguinte maneira:

- Introdução incluindo a hipótese e justificativa do trabalho;
- Objetivos geral e específicos;
- Revisão da literatura sobre o tema específico de cada capítulo;
- Capítulos 1 – 3: artigos em redação, submetidos ou publicados em periódicos científicos internacionais que se referem às diferentes etapas do trabalho realizado;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências bibliográficas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO 1: Emprego da técnica de secagem por aspersão para a obtenção ou secagem de nanopartículas	33
Revisão	35
Publicação 1: Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents	45
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos	61
Revisão	63
Publicação 2: LC-UV method to assay N-acetylcysteine without derivatization: analyses of pharmaceutical products	67
CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e avaliação da deposição pulmonar <i>in vitro</i> e da atividade antioxidante de sistemas pulverulentos redispersíveis contendo N-acetilcisteína lipossomal	77
Revisão	79
Publicação 3: Redispersible liposomal-N-acetylcysteine dry powder: development, <i>in vitro</i> lung deposition and antioxidant activity.....	85

DISCUSSÃO GERAL	113
CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXO 1: Validação do método analítico por CLAE para doseamento de N-acetilcisteína nos lipossomas desenvolvidos.....	149
ANEXO 2: Perfil de distribuição granulométrica por difração de laser dos lipossomas contendo N-acetilcisteína antes e após o processo de filtração em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm.....	153

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 Evolução cronológica do número de artigos e patentes publicados nos últimos 20 anos envolvendo os termos “spray dry*” and “nano*”	26
--	----

Capítulo 1

Figura 1 Correlation between primary emulsion and nanoparticle size using the emulsion method proposed by Duncalf and co-workers	52
Figura 2 Chronological evolution of number of patents on spray-dried polymeric nanoparticles	57
Figura 3 Occurrence of class codes in the documents	58

Capítulo 2

Figura 1 Chemical structure of N-acetylcysteine	69
Figura 2 Chromatograms obtained from standard solution, sample solution from granules and sample solution from effervescent tablets ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$)	71
Figura 3 Chromatograms obtained from standard solution, sample solution from granules and sample solution from effervescent tablets ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$)	72

Capítulo 3

Revisão

Figura 1 Estrutura química da N-acetilcisteína (a) e da cisteína (b)	80
--	----

Publicação 3

Figura 1 Transmission electron microscopy image of N-acetylcysteine-loaded liposomes	98
Figura 2 Delta transmission (%) profiles of N-acetylcysteine-loaded liposomes and blank liposomes	99

Figura 3 Scanning electron images of dry powders containing only lactose,

containing non-encapsulated N-acetylcysteine, containing blank liposomes and containing N-acetylcysteine-loaded liposomes	100
Figura 4 Deagglomerating profiles by laser diffractometry of dry powders containing blank liposomes, containing N-acetylcysteine-loaded liposomes and containing non-encapsulated N-acetylcysteine	101
Figura 5 Transmission electron microscopy image of dry powders containing blank liposomes, containing N-acetylcysteine-loaded liposomes, containing only lactose and containing non-encapsulated N-acetylcysteine..	103
Figura 6 Aerosol performance of non-encapsulated N-acetylcysteine and liposomal-N-acetylcysteine dry powders	104
Figura 7 Effect of N-acetylcysteine formulations on lung homogenate against TBARS production	106

Discussão geral

Figura 1 Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos pós contendo apenas lactose, N-acetilcisteína não encapsulada, lipossomas brancos, e N-acetilcisteína associada aos lipossomas	122
---	-----

Anexo 1

Figura 1 Curva analítica média para quantificação de N-acetilcisteína	151
Figura 2 Cromatogramas obtidos do lipossoma contendo N-acetilcisteína e do lipossoma branco	152

Anexo 2

Figura 1 Representação gráfica do perfil granulométrico por difração de laser dos lipossomas contendo N-acetilcisteína antes e após o processo de filtração seqüencial em membranas de poros de 0,45 µm e 0,22 µm	155
---	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 Nanoparticles obtained from solutions by spray-drying	49
Tabela 2 Nanoparticles obtained from emulsions or dispersions and dried by spray-drying	50
Tabela 3 Spray-dried solid compositions containing polymeric nanoparticles	53
Tabela 4 Assignee and their countries, number of patents, and type of approach	58

Capítulo 2

Tabela 1 Available methods for the assay of N-acetylcysteine by liquid-chromatography without derivatization	70
Tabela 2 Repeatability and intermediate precision of the method for the assay of N-acetylcysteine in granules and effervescent tablets	73
Tabela 3 Accuracy of the method for the assay of N-acetylcysteine in granules and effervescent tablets	73
Tabela 4 Results showing the robustness of the method for the assay of N-acetylcysteine in granulated and effervescent tablets	74

Capítulo 3

Tabela 1 Mean particle size of N-acetylcysteine-loaded liposomes and blank liposomes obtained by three different techniques	97
Tabela 2 Physicochemical characteristics of spray-dried powders	99
Tabela 3 Geometric particle size and SPAN values of dry powders by laser diffraction (wet way), before and after water redispersion	102

Discussão geral

Tabela 1 Propriedades de fluxo dos pós contendo NAC não encapsulada (SD-NAC) e dos pós contendo NAC lipossomal (SD-NAC-Lip)	122
---	-----

Anexo 1

Tabela 1 Regressão linear da curva de N-acetilcisteína (ANOVA)	151
Tabela 2 Repetibilidade e precisão intermediária do método para quantificação de N-acetilcisteína nos lipossomas desenvolvidos	152

RESUMO

A secagem por aspersão é uma técnica rápida, de baixo custo, que em uma única etapa pode converter uma formulação líquida em um produto seco. Considerando sua ampla utilização tanto na indústria farmacêutica, quanto na academia, investigamos a sua aplicação na obtenção e secagem de nanopartículas. Após uma vasta revisão na literatura acerca das últimas patentes relacionadas à obtenção ou secagem de nanopartículas poliméricas, bem como, as invenções que abordaram a secagem de lipossomas empregando a técnica de secagem por aspersão, foi observado um aumento significativo no número de patentes publicadas nos últimos anos. A maioria destas patentes, independente do tipo de nanopartícula, utiliza esta técnica para aumentar a estabilidade de formulações líquidas, ou então, para obter formas sólidas intermediárias que possam ser facilmente convertidas em formas farmacêuticas finais e administradas por diferentes vias como pulmonar, parenteral, cutânea e oral. Tendo em vista a versatilidade desta técnica, este trabalho aborda também a obtenção de um sistema inalatório de pó seco inédito através da secagem por aspersão de lipossomas contendo N-acetilcisteína. A N-acetilcisteína é um composto hidrofílico, e considerando essa característica, foi encapsulada em vesículas lipossomais. A primeira etapa experimental do trabalho foi devotada a validação de um método analítico para quantificar o fármaco de escolha nas formulações desenvolvidas. Devido à inexistência de um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta sem derivatização preliminar da amostra, foi desenvolvido um método simples, rápido e original, sem necessidade de derivatização prévia da amostra, atendendo a todos os requisitos internacionais estabelecidos. O método pode ser aplicado também na quantificação do fármaco em duas formulações farmacêuticas comerciais, representando uma importante ferramenta analítica para a indústria farmacêutica. Os lipossomas contendo N-acetilcisteína foram produzidos empregando o método de evaporação em fase reversa e apresentaram tamanho exclusivamente nanométrico, sendo que, considerando o número de partículas, mais de 80% possuem diâmetro médio menor do que 100 nm. No entanto, considerando a limitada estabilidade físico-química destas vesículas, foi realizada a conversão destas formulações líquidas em sistemas pulverulentos

utilizando a técnica de secagem por aspersão. Os pós obtidos apresentaram adequadas características para administração pulmonar, como diâmetro aerodinâmico em torno de 1,5 μm e fração respirável acima de 30%, com a grande vantagem de serem redispersíveis em meio aquoso recuperando o tamanho nanométrico. Além disso, após ensaio de TBARS induzido, foi demonstrado que a encapsulação da N-acetilcisteína em lipossomas é essencial para a manutenção da sua atividade antioxidante após o processo de secagem. Ainda, o pó contendo o fármaco encapsulado apresentou melhor atividade quando comparado às formulações líquidas e sólidas contendo o fármaco não-encapsulado, sendo uma alternativa à formulação líquida comercial e um bom candidato para o tratamento de doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Secagem por aspersão, N-acetilcisteína, cromatografia líquida de alta eficiência, lipossomas, sistema inalatório de pó seco, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Development of liposomal dry powder of N-acetylcysteine by spray drying technique

Spray drying is a rapid technique, with low cost, that in a single step is able to convert a liquid formulation into a dry product. Considering its wide use both in the pharmaceutical industry and academic, we investigated its application in the production and drying of nanoparticles. After an extensive literature review on the latest patents related to obtaining or drying polymeric nanoparticles, as well as inventions that addressed the drying of liposomes using the spray drying technique, a significant increase in the number of patents published in recent years was observed. The majority of these patents, regardless of the type of nanoparticle, used this technique to increase the stability of liquid formulations or to obtain intermediate solid forms which can be easily converted into final dosage forms and administered by different routes such as pulmonary, parenteral, cutaneous and oral. Considering the versatility of this technique, this work evaluated the obtaining of a new innovative dry powder inhaler by spray drying of liposomes containing N-acetylcysteine. N-acetylcysteine is a hydrophilic compound and as a result of this characteristic, we encapsulated it in liposomal vesicles. The first stage of the experimental work was devoted to the validation of an analytical method to quantify the drug of choice in the developed formulations. Due to the lack of a method by high efficiency liquid chromatography with an ultraviolet detector without preliminary derivatization of the samples we developed a simple, fast and unique method, without preliminary derivatization, taking into account all international requirements. The developed method could be applied to assay the drug in two commercial dosage forms, representing an important analytical tool for the pharmaceutical industry. Liposomes containing N-acetylcysteine were prepared by the reverse phase evaporation method and presented exclusively nanometric size, and considering the number of particles, more than 80% are less than 100 nm. However, as the physicochemical stability of these vesicles is limited, the conversion of such liquid formulations in powder systems was carried out using the spray drying technique. The obtained powders were suitable for pulmonary administration, as aerodynamic diameter about of 1.5 μm and respirable fraction above 30%, with the great advantage of being

redispersible in aqueous medium, recovering the original nanometric size. Moreover, the induced TBARS assay showed that the encapsulation of N-acetylcysteine in liposomes was essential for the maintenance of its antioxidant activity after the drying process. In addition, the powder containing the encapsulated drug had better activity than the liquid and solid formulations containing the non-encapsulated drug, being an alternative to commercial liquid formulation and a good candidate for the treatment of pulmonary diseases associated with oxidative stress.

Keywords: Spray drying, N-acetylcysteine, high performance liquid chromatography, liposomes, dry powder inhaler, antioxidant activity.

A secagem por aspersão (*spray drying*) é uma operação unitária pela qual um produto líquido é atomizado em um fluxo de gás aquecido para a obtenção instantânea de um pó. É uma técnica bastante difundida em diversos campos da indústria, principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil e agrícola (ESTEVINHO et al., 2013).

A obtenção de produtos secos por aspersão pode aprimorar aspectos tecnológicos e logísticos da formulação, tais como a melhora na estabilidade microbiológica, a diminuição dos riscos de degradação química ou biológica, e a redução nos custos de transporte e armazenamento (ESTEVINHO et al., 2013). Além disso, é uma técnica rápida, com baixo custo, que propicia a modulação das características físico-químicas dos pós obtidos, e que pode ser aplicada a compostos termossensíveis (BROADHEAD, ROUAN e RHODES, 1992).

Na indústria farmacêutica, esta técnica é bastante utilizada para microencapsular compostos ativos (VEHRING, 2008; PATEL, PATEL e SUTHAR, 2009), para aprimorar propriedades biofarmacêuticas (PARADKAR et al., 2004; SOLLOHUB e CAL, 2010), melhorar características de compactabilidade e compressibilidade (DI MARTINO et al., 2001; JAIN et al., 2012), entre outras. Além disso, a literatura científica tem demonstrado a sua aplicação na secagem de sistemas coloidais, como nanocápsulas e lipossomas, mantendo a estrutura supramolecular dos mesmos (GOLDBACH, BROCHART e STAMM, 1993; TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007). Neste contexto, o objetivo da secagem é geralmente aumentar a estabilidade das formulações, embora a técnica também possa ser utilizada para a obtenção de nanopartículas.

A ampla utilização e versatilidade da técnica de secagem por aspersão na secagem ou obtenção de nanopartículas pode ser evidenciada pelo número crescente de publicações acerca do tema nos últimos 20 anos, e pelo seu potencial mercadológico, o qual é comprovado, além dos artigos, a partir das diversas patentes publicadas que empregam esta técnica na obtenção/secagem de sistemas nanoestruturados para as mais diversas finalidades (Figura 1).

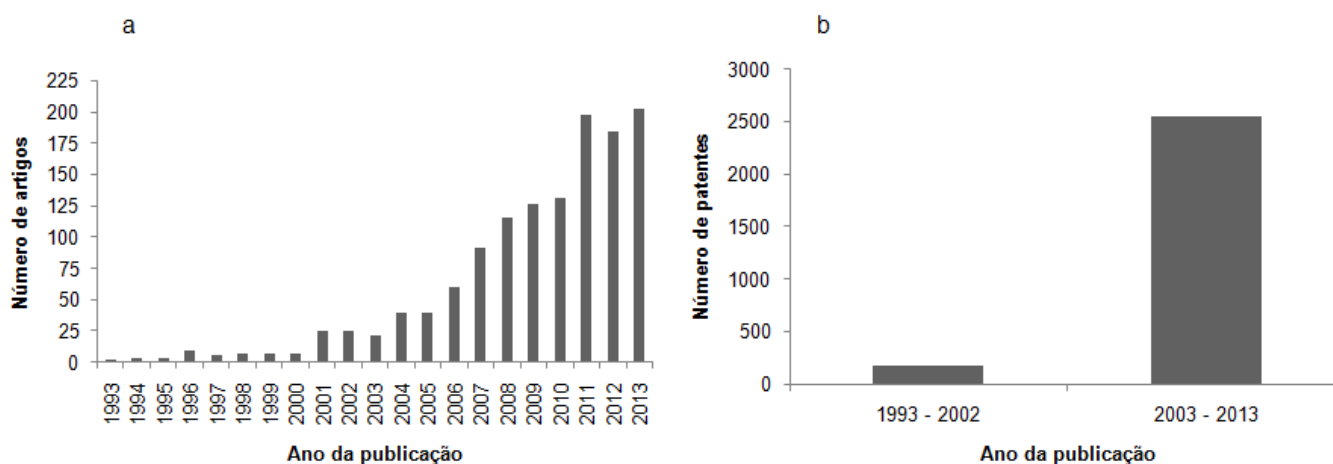


Figura 1. Evolução cronológica do número de artigos (a) e patentes (b) publicados nos últimos 20 anos envolvendo os termos “spray dry*” and “nano*”. As bases de dados utilizadas para a pesquisa das publicações e patentes foram Web of Science e Derwent Innovations Index, respectivamente (novembro de 2013).

A secagem por aspersão pode ser empregada também na obtenção de sistemas pulverulentos derivados de aminoácidos ou proteínas (ADLER, UNGER e LEE, 2000). Quando estes pós vislumbram o uso pulmonar, estudos de formulação são indispensáveis para assegurar que o processo de secagem não altera a estrutura protéica, e para garantir que o produto final possua propriedades aerodinâmicas adequadas (SOLLOHUB e CAL, 2010).

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico derivado do aminoácido L-cisteína utilizado na clínica médica há mais de 50 anos como agente mucolítico, e é o único antídoto aprovado em casos de intoxicação por paracetamol (WEBB, 1962; WU et al., 2006). A NAC está disponível comercialmente em diferentes formas farmacêuticas, e para uso pulmonar apresenta-se atualmente na forma de solução para inalação. Para a administração deste tipo de formulação, há necessidade de um dispositivo nebulizador, o que torna o processo mais lento, além de demandar manutenção rotineira para evitar contaminações microbiológicas (AQUINO et al., 2012). Além disso, estudos têm demonstrado a atividade antioxidante deste composto (ARUOMA et al., 1989; KELLY, 1998; KAPLAN et al., 2008; BRANNAN, 2011), o qual poderia ser útil no tratamento de doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo como asma, fibrose

cística e doença pulmonar obstrutiva crônica (GILLISSEN e NOWAK, 1998; MUKHERJEE et al., 2009; SANSONE et al., 2009). Assim, as desvantagens das formulações comerciais e as potencialidades da NAC geram a possibilidade de novas perspectivas no desenvolvimento de sistemas inovadores para a entrega deste fármaco diretamente nos pulmões, como por exemplo, utilizando formulações pulverulentas.

Além disso, a encapsulação de antioxidantes em lipossomas tem se mostrado eficaz no tratamento de doenças pulmonares (HOESEL et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2009; MUKHOPADHYAY et al., 2009). Estas vesículas fosfolipídicas, devido a sua organização estrutural, permitem a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos, no seu compartimento aquoso, quanto lipofílicos, entre as moléculas de fosfolipídios. Sendo assim, a NAC seria um bom candidato para ser encapsulado no núcleo dos lipossomas, e esta abordagem torna-se interessante devido às propriedades já descritas para estas partículas como liberação controlada (BECK-BROICHSITTER et al., 2013), entrega de fármacos a locais específicos, como os pulmões (DU et al., 2010), eficácia comparável ou melhor que formulações comerciais e segurança (BATIST et al., 2001; RAFIYATH et al., 2012).

No entanto, estas vesículas possuem limitada estabilidade físico-química, o que torna seu desenvolvimento e futura comercialização um desafio para a indústria farmacêutica. Para contornar esta desvantagem, e aumentar a estabilidade destas formulações, estudos têm proposto a secagem de lipossomas através de técnicas como liofilização e secagem por aspensão (LO, TSAI e KUO, 2004; GLAVAS-DODOV et al., 2005; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2008; CHEN et al., 2010).

Assim, considerando o exposto, este trabalho tem como proposta geral o desenvolvimento de sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína, visando uma alternativa para o tratamento de doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo. Os lipossomas foram escolhidos como sistemas carreadores devido às características do fármaco e aos benefícios já descritos para estes sistemas. Devido a inexistência de uma formulação pulverulenta de NAC para uso pulmonar, a técnica de secagem por aspensão foi escolhida para a obtenção de sistemas inalatórios de pós secos contendo N-acetilcisteína.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Produzir sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína lipossomal empregando a técnica de secagem por aspersão, investigando a influência da nanoencapsulação no perfil de deposição pulmonar e na atividade antioxidante *in vitro* das formulações propostas.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a aplicação e o potencial mercadológico da técnica de *spray drying* na secagem ou obtenção de nanopartículas;
- ✓ Validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta para quantificação da N-acetilcisteína em diferentes formulações;
- ✓ Desenvolver lipossomas contendo N-acetilcisteína empregando o método de evaporação em fase reversa, caracterizando-os quanto à distribuição de tamanho de partícula, pH, teor, eficiência de encapsulação, morfologia e estabilidade física;
- ✓ Desenvolver sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína empregando a técnica de secagem por aspersão, caracterizando os pós obtidos quanto ao rendimento do processo, teor, umidade residual, distribuição de tamanho de partícula, redispersão aquosa e morfologia;
- ✓ Estudar a influência da nanoencapsulação no perfil de deposição pulmonar *in vitro* dos pós contendo N-acetilcisteína utilizando o impactador em cascata de Andersen;
- ✓ Investigar a influência do processo de preparação dos lipossomas, da encapsulação do fármaco e do processo de secagem sobre a atividade antioxidante da N-acetilcisteína nas formulações desenvolvidas utilizando o ensaio de TBARS induzido em pulmões de ratos saudáveis.

CAPÍTULO 1: Emprego da técnica de secagem por aspersão para a obtenção ou secagem de nanopartículas

Revisão

A técnica de secagem por aspersão consiste na conversão de uma forma líquida em partículas sólidas envolvendo uma única etapa. Esta técnica é amplamente utilizada nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica devido a sua simplicidade, baixo custo, reprodutibilidade, rapidez, facilidade de escalonamento e possibilidade de modular as características físico-químicas para a obtenção de pós com diferentes funcionalidades (BROADHEAD, ROUAN e RHODES, 1992; BARAS, BENOIT e GILLARD, 2000; CAL e SOLLOHUB, 2010; JAIN et al., 2012) .

Uma das primeiras aplicações industriais deste método foi na produção de leite em pó, a qual permanece sendo uma das mais importantes ainda hoje. Sua ampla utilização foi impulsionada pela II Guerra Mundial com a súbita necessidade de transportar grandes quantidades de alimentos, gerando a busca por métodos que reduzissem o volume e peso dos alimentos, bem como, melhorassem a conservação dos mesmos (CAL e SOLLOHUB, 2010).

O processo de secagem envolve quatro fases consecutivas: 1) atomização do produto (solução, suspensão, dispersão ou emulsão); 2) contato do spray gerado com o ar aquecido; 3) secagem das gotículas aspergidas e 4) separação do produto seco. Estas quatro fases são seqüenciais e a evaporação do solvente ocorre rapidamente permitindo a secagem de materiais sensíveis ao calor (BROADHEAD, ROUAN e RHODES, 1992; JAIN et al., 2012).

As partículas obtidas por essa técnica tendem a ser esféricas e com estreita distribuição de tamanho. No entanto, as condições de secagem podem ser modificadas, e desta forma, propiciar a alteração e o controle de propriedades das partículas obtidas, tais como forma, distribuição de tamanho, densidade, fluxo e umidade, tornando a secagem por aspersão um método muito versátil e adequado para a preparação de formulações farmacêuticas (BROADHEAD, ROUAN e RHODES, 1992; SEVILLE, LI e LEAROYD, 2007; VEHRING, 2008; PATEL, PATEL e SUTHAR, 2009; JAIN et al., 2012). O material sólido obtido pode ser utilizado como uma forma farmacêutica final ou como produto intermediário na obtenção de formas farmacêuticas finais para ser administrado

por diferentes vias, como parenteral, nasal ou pulmonar (VEHRING, FOSS e LECHUGA-BALLESTEROS, 2007).

Dentre as inúmeras aplicações da técnica de secagem por aspersão na indústria farmacêutica, está a microencapsulação de moléculas bioativas utilizada normalmente para a obtenção de formulações de liberação controlada, para melhorar a biodisponibilidade e também para mascarar o sabor desagradável de algum ingrediente farmacêutico (PALMIERI et al., 2001; VEHRING, 2008, PATEL, PATEL e SUTHAR, 2009). Além disso, esta técnica é empregada para melhorar a compactabilidade e compressibilidade de fármacos e excipientes por ser possível modificar propriedades como distribuição de tamanho, cristalinidade e polimorfismo (DI MARTINO et al., 2001; JAIN et al., 2012), para modificar propriedades biofarmacêuticas como solubilidade e taxa de dissolução (PARADKAR et al., 2004; SOLLOHUB e CAL, 2010) a partir, por exemplo, da formação de complexos e de dispersões sólidas, além de ser uma excelente técnica para a produção de pós com características adequadas para uso inalatório e viável de ser utilizada para a secagem de materiais termossensíveis como proteínas (ADLER, UNGER e LEE, 2000; SOLLOHUB e CAL, 2010).

A utilização de pós para inalação obtidos por *spray drying* é uma estratégia muito promissora para a entrega de fármacos e moléculas bioativas devido a vantagens como aumento da vida de prateleira da formulação, manutenção da atividade biológica após o processo de secagem, maior adesão ao tratamento e possibilidade de entrega específica no pulmão (SEVILLE, LI e LEAROYD, 2007; COLONNA et al., 2008). Neste contexto, diferentes sistemas dispersos como emulsões (CHRISTENSEN, PEDERSEN e KRISTENSEN, 2001; DOLLO et al., 2003), nanocápsulas (TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2006; TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007) e lipossomas (GOLDBACH, BROCHART e STAMM, 1993) já foram secos empregando essa técnica de secagem, com preservação das suas estruturas, a partir da utilização de adjuvantes de secagem, como lactose (GOLDBACH, BROCHART e STAMM, 1993; TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007), dióxido de silício coloidal (TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2006), manitol (TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007), maltodextrina (DOLLO et al., 2003; TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI,

2007) e hidroxipropilmetilcelulose (CHRISTENSEN, PEDERSEN e KRISTENSEN, 2001; TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007).

Com relação à secagem por aspersão de lipossomas, além de aumentar a sua limitada estabilidade físico-química, esta técnica torna possível a obtenção de sistemas inalatórios de pós secos (DPIs), que são dispositivos utilizados para administração pulmonar, sendo mais vantajosos que os nebulizadores ou inaladores de dose medida por propiciarem maior estabilidade ao fármaco, serem de fácil manipulação, possuírem baixo custo e por serem livres de gases propelentes (LO, TSAI e KUO, 2004; CHARNVANICH, VARDHANABHUTI e KULVANICH, 2010).

Estudos têm demonstrado que a obtenção de DPIs a partir da secagem de lipossomas oferece uma abordagem nova e vantajosa para o tratamento de doenças pulmonares, como asma, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica, visto que, as vesículas podem ser preparadas com fosfolipídios com composição similar ao tensoativo pulmonar endógeno, o qual é predominantemente formado por dipalmitoilfosfatidilcolina (WILLIS, HAYES JUNIOR e MANSOUR, 2012). Além disso, os sistemas pulverulentos lipossomais possuem características promissoras para administração pulmonar especialmente relacionadas a uma liberação do fármaco de maneira controlada (CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007), proteção frente à degradação (CHARNVANICH, VARDHANABHUTI e KULVANICH, 2010; CHEN et al., 2012), redução da toxicidade e dos efeitos colaterais (CHEN et al., 2012), e possibilidade de depósito no pulmão com aumento da permanência do fármaco no local de ação (CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007; WILLIS, HAYES JUNIOR e MANSOUR, 2012).

Apesar destas inúmeras vantagens, pós lipossomais obtidos por *spray drying* podem possuir baixa eficiência de encapsulação e propriedades aerodinâmicas inadequadas para entrega pulmonar (CHEN et al., 2012). Para contornar estes problemas, estudos de formulação demonstram que a utilização de dissacarídeos, como a sacarose e trealose, são capazes de proteger os lipossomas e/ou o material encapsulado durante o processo de secagem (LO, TSAI e KUO, 2004; CHEN et al., 2012) ou propiciar a obtenção de pós com adequadas propriedades aerodinâmicas (CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007).

Além disso, a utilização de aminoácidos, como a leucina, pode melhorar a deposição pulmonar do pó desenvolvido, desde que, este antiaderente seja utilizado em concentrações adequadas (CHEN et al., 2012).

Ainda, trabalhos recentes demonstram a aplicabilidade da técnica de *spray drying* na secagem de lipossomas contendo genes ou proteínas. Com o intuito de obter formulações estáveis e viáveis para entrega de genes pela via pulmonar Colonna e colaboradores em 2008 propuseram a obtenção de pós contendo DNA plasmidial associado a lipossomas. Estes pesquisadores demonstraram que as formulações pulverulentas obtidas a partir de lipossomas contendo uma mistura de lipídios catiônicos e quitosana, apresentaram boa eficiência de transfecção celular, comparada com as formulações líquidas, e mantiveram a integridade estrutural do DNA encapsulado. Já Charnvanich e colaboradores em 2010 propuseram uma abordagem diferente, realizaram a secagem de uma dispersão contendo lipossomas brancos, compostos por fosfatidilcolina hidrogenada e colesterol, juntamente com uma solução contendo a lisozima, como proteína modelo, e manitol como adjuvante de secagem. Neste estudo, os autores demonstraram que, após a reconstituição em solução tampão, os pós espontaneamente formaram lipossomas contendo a proteína encapsulada, ou seja, não houve a necessidade da pré-encapsulação da proteína em lipossomas antes do processo de secagem. Os autores também demonstraram que este processo não afetou a atividade biológica da lisozima.

No entanto, existem alguns resultados controversos descritos na literatura no que diz respeito à manutenção da integridade dos lipossomas após o processo de secagem (KARADAG et al., 2013). Em 1987, Hauser e Strauss verificaram a preservação da estrutura das vesículas e manutenção da integridade e permeabilidade da bicamada após a secagem de lipossomas unilamelares na presença de 10% de sacarose. Em contrapartida, Wessman, Edwards e Mahlin (2010) produziram pós a partir de lipossomas unilamelares utilizando 10% de lactose e verificaram que o processo de secagem ocasionou rearranjos estruturais formando agregados e estruturas bi e multilamelares, devido à criação de um desequilíbrio osmótico durante o processo de desidratação. Uma alternativa para evitar a agregação ou desintegração dos lipossomas durante o processo de secagem e redispersão foi proposta por Karadag e colaboradores

em 2013, que revestiram a superfície de lipossomas aniônicos com quitosana, e utilizaram 20% de maltodextrina para facilitar o processo de secagem. Neste trabalho, verificaram que lipossomas não revestidos na presença de maltodextrina floculavam, tornando o sistema inadequado para a secagem. No entanto, quando as vesículas eram previamente revestidas com quitosana não houve alterações estruturais após a adição da maltodextrina, sugerindo que a quitosana adsorvida aumentou a repulsão eletrostática e o impedimento estérico entre os lipossomas, impedindo assim os efeitos osmóticos que poderiam causar agregação e desintegração dos lipossomas. A partir desta abordagem, após a secagem por aspersão e reconstituição dos lipossomas revestidos com quitosana utilizando 20% de maltodextrina em tampão acetato houve recuperação do tamanho nanométrico da dispersão original.

A literatura científica relata muitos trabalhos demonstrando a grande aplicabilidade dos lipossomas em diferentes setores industriais, como nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. No entanto, manter a estabilidade destas vesículas em meio aquoso ainda representa um desafio para sua comercialização (KARADAG et al., 2013). Neste sentido, a técnica de secagem por aspersão tem sido uma solução para este problema e representa uma tendência em nível industrial, que tem se refletido no depósito de muitas patentes que envolvem a obtenção de sistemas pulverulentos lipossomais por esta técnica.

Em 2011, Haas e Fattler (WO 2011144745) propuseram um método para obter lipossomas com capacidade de carga aprimorada e adequada estabilidade. Para este propósito, faz-se necessário a presença de uma substância osmoticamente ativa, como açúcares ou íons, que propicie uma diferença de osmolaridade entre as fases interna e externa de lipossomas brancos, os quais posteriormente são secos por aspersão e incubados com o fármaco para a encapsulação do mesmo. A partir de exemplos, os inventores demonstraram que, quanto maior este gradiente de osmolaridade, maior a encapsulação do paclitaxel nas lamelas de lipossomas preparados com trealose.

A utilização de açúcares, como comentado anteriormente, é uma estratégia utilizada também para a preservação das vesículas durante o processo de secagem e sua subsequente reidratação. Hauser, ainda na década de 80 (WO

1988006441) demonstrou através da sua invenção a habilidade da sacarose em estabilizar lipossomas unilamelares pequenos durante o processo de secagem por aspersão, onde a integridade das vesículas foi mantida, o tamanho médio e a distribuição de tamanho de partícula não foram afetados, e a agregação ou fusão após a reidratação foram evitadas, mantendo-se a utilidade das vesículas.

No entanto, o uso destes excipientes deve ser criteriosamente avaliado, pois na invenção proposta por Gregoriadis, Zadi e Jayasekera (WO 1999065465), cerca de uma década após a de Hauser, os inventores propuseram um método para obter lipossomas pequenos com alta eficiência de encapsulação a partir da secagem de uma mistura composta por lipossomas vazios, fármaco e açúcar, onde este último foi utilizado com o intuito de prevenir fenômenos de agregação e fusão das vesículas após a secagem. Em um dos exemplos, os inventores relataram que aumentando a quantidade de sacarose houve diminuição do tamanho das vesículas, mas também redução na eficiência de encapsulação do fármaco.

Além de aumentar a estabilidade dos lipossomas, a secagem por aspersão destas dispersões propicia a obtenção de formulações muito versáteis que podem ser empregadas como formas farmacêuticas intermediárias ou finais para administração por diferentes vias, como pulmonar, oral, cutânea e parenteral.

A invenção descrita por Wiggenghorn e colaboradores (WO 2008055628) propõe um método contínuo para obter lipossomas com distribuição de tamanho adequada para administração parenteral. A solução ou suspensão orgânica de lipídios após receber a injeção de uma solução de trealose forma lipossomas multilamelares os quais são submetidos ao processo de extrusão e na seqüência passados através de um bico atomizador. Este processo é executado em um aparato descrito nesta invenção, o qual possui um dispositivo poroso conectado a um bico atomizador. Neste aparato, encontram-se acoplados a torre de secagem e o ciclone. O pó obtido pode ser utilizado no preparo de formulações farmacêuticas finais e intermediárias, e após reconstituição em água o tamanho nanométrico é recuperado possibilitando a administração por diferentes vias.

Em 1998 Manzo e colaboradores (WO 1998011877) inventaram uma formulação de uso tópico cutâneo a partir da secagem por aspersão de lipossomas, a qual se apresentou como uma alternativa aos talcos

convencionais para bebês, os quais eram formulados normalmente com amido de milho ou talco, e eventualmente causavam irritação cutânea ou poderiam prejudicar os pulmões dos bebês, se inalados durante a troca de fraldas. Nesta invenção, demonstraram a obtenção de formulações lipossomais pulverulentas com capacidade de absorção da umidade, proteção do composto encapsulado frente a processos de degradação e maior tempo de contato com a pele. Essas formulações foram utilizadas como formas intermediárias na obtenção de talcos para bebês. Em 2002 (US 6387398), os mesmos inventores propuseram outras aplicações para os pós obtidos através desta invenção, como a sua utilização na obtenção de batons com propriedades anti-inflamatórias e também desodorantes contendo a fragrância encapsulada nos lipossomas.

Ainda tratando de formas farmacêuticas intermediárias, mas para administração oral de compostos ativos, Yatvin em 2003 (WO 2003099261) desenvolveu formulações para uso oral, onde o composto, que pode ser fármaco, hormônio, enzima, material genético ou nutrientes, é encapsulado em lipossomas que podem ser secos por aspersão, e o pó obtido misturado a excipientes para obtenção de comprimidos com revestimento entérico. No ano seguinte, Trubiano e Karras (US 20040247658) propuseram a encapsulação de compostos como vitaminas, ácidos graxos e antioxidantes, utilizando amido modificado, obtido por hidrólise enzimática, como agente de encapsulação com intuito de melhorar a biodisponibilidade destes compostos. Dentre os exemplos demonstrados, está a encapsulação de lipossomas contendo coenzima Q-10 com amido modificado, onde este último foi lentamente adicionado às vesículas e a mistura foi seca por *spray drying*. Os inventores verificaram que não houve alteração no tamanho dos lipossomas após a adição do amido, e demonstram ainda a possibilidade de obtenção de comprimidos a partir do pó obtido. De maneira semelhante, Mahlberg e colaboradores (WO 2009050333) descreveram a microencapsulação de lipossomas contendo a coenzima Q-10, utilizando a proteína do soro de leite modificado como polímero, como uma alternativa para proteger os lipossomas do pH ácido e da captura pelo sistema mononuclear fagocitário. Além disso, foi demonstrado que a associação a lipossomas levou a um aumento da biodisponibilidade e diminuição da eliminação da coenzima Q-10 quando comparada a uma formulação convencional disponível comercialmente.

O método de microencapsulação proposto por estes inventores engloba diferentes etapas sendo a primeira responsável pela mistura e agitação das fases polimérica e lipídica, seguida de ajuste de pH e aquecimento, homogeneização e por fim secagem por aspersão.

Na área cosmética, a secagem por aspersão de lipossomas apresenta-se como uma alternativa para aumentar a estabilidade de ativos cosméticos lábeis. Esta aplicação foi demonstrada por Chen e colaboradores em 2005 (US 20050175681) que propuseram a encapsulação da vitamina A em lipossomas e a sua posterior secagem obtendo-se um produto intermediário estável, que ao ser ressuspenso em água recupera a dispersão lipossomal original.

Como mencionado anteriormente, as formulações lipossomais pulverulentas podem também ser formas farmacêuticas finais, e neste contexto, a principal via de administração explorada pelos inventores é a via pulmonar, como demonstrado por Axelsson e colaboradores (WO 1988001862) e Radhakrishnan, Mihalko e Abra (US 4895719) no final dos anos 80. Estes inventores propuseram a secagem por aspersão de lipossomas para a obtenção de um pó, que posteriormente é misturado a propelentes e administrados por inalação através de dispositivos de dose medida. Sabendo das limitações e desvantagens deste e de outros tipos de dispositivos para administração pulmonar de fármacos, Diederichs e colaboradores (US 20050196345) propuseram um novo dispositivo para administração pulmonar de pós contendo ou não lipossomas. Esta invenção propõe um inalador que dispensa a respiração forçada dos pacientes, e que elimina o risco de agregação dos pós, devido a sua higroscopicidade, que poderia modificar o tamanho de partícula e o perfil de deposição pulmonar.

Além da área farmacêutica e cosmética, a utilização da técnica de *spray drying* na secagem de lipossomas tem sido empregada em diferentes setores industriais. Um exemplo desta aplicação é a invenção de Hrdina e colaboradores (WO 2008089707) que demonstraram a sua aplicação na indústria têxtil, onde prepararam lipossomas contendo cloreto de sódio e lecitina e realizaram a sua secagem obtendo um pó para ser utilizado como um aditivo em banhos de tingimento, juntamente com os pigmentos na coloração de fibras de celulose, lãs e poliamidas sintéticas.

No contexto da secagem por aspersão de sistemas nanométricos, além da secagem de lipossomas, esta técnica também tem sido extensamente utilizada para a secagem e obtenção de nanopartículas poliméricas, como estratégia para aumentar a estabilidade destes sistemas e/ou obter pós redispersíveis. Assim, considerando o tema desta tese de doutorado, o grande número de estudos acerca das nanopartículas poliméricas no campo farmacêutico, a ampla aplicabilidade e versatilidade da técnica de secagem por aspersão, e o convite recebido para redação de uma revisão sobre patentes com foco na secagem de partículas poliméricas, o objetivo deste capítulo foi abordar as últimas patentes que utilizaram a técnica de secagem por aspersão na obtenção ou secagem de nanopartículas.

PUBLICAÇÃO 1: Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents

O conteúdo presente na *Publicação 1* desta tese de doutorado foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Tese e Dissertações da UFRGS, pois o mesmo encontra-se publicado no periódico *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* (BECK, R. C. R., OURIQUE, A. F., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Spray-Dried Polymeric Nanoparticles for Pharmaceuticals: A Review of Patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 6, p. 195-208, 2012).

Com o intuito de preservar os direitos de publicação das editoras dos periódicos científicos, o texto completo foi substituído pelo resumo abaixo contendo os principais resultados obtidos.

Após uma vasta revisão na literatura acerca das últimas patentes relacionadas à obtenção de nanopartículas poliméricas empregando a técnica de secagem por aspersão, 30 patentes foram selecionadas e divididas em três grupos de acordo com as seguintes abordagens: i) secagem por aspersão de soluções para a obtenção de nanopartículas; ii) secagem por aspersão de dispersões/emulsões para a obtenção de nanopartículas ou iii) nanopartículas secas através da técnica de secagem por aspersão. Após este levantamento, foi possível observar que houve um aumento significativo no número de patentes que utilizam esta técnica para obter ou secar nanopartículas poliméricas nos últimos 15 anos. Ainda, observou-se que a maioria delas utiliza a secagem por aspersão como uma alternativa para aumentar a estabilidade de formulações líquidas, ou então, para obter formas sólidas que podem ser facilmente convertidas em outras formas farmacêuticas como, comprimidos, cápsulas, pós para inalação e grânulos.

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos

Revisão

A necessidade de assegurar a credibilidade de resultados obtidos após diferentes análises farmacêuticas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para isto, indústrias e laboratórios acadêmicos desenvolvem e validam métodos que possam garantir dados analíticos confiáveis e reprodutíveis. A validação de métodos é uma das medidas universalmente reconhecida como parte fundamental do sistema de garantia de qualidade, principalmente na área analítica. Este processo engloba desde o planejamento até a execução experimental do protocolo, assim como o tratamento estatístico dos resultados (Thompson, ELLISON e WOOD, 2002; RIBANI et al., 2004).

Para a realização da validação de um método analítico, existem recomendações a serem seguidas, as quais foram definidas e regulamentadas por diferentes organizações. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) disponibilizam guias e resoluções que descrevem e orientam como executar essa validação. Em âmbito internacional, organizações como Food and Drug Administration (FDA), United States Pharmacopoeia (USP) e International Conference on Harmonization (ICH) regulamentam este processo, sendo que a ICH é uma tentativa para harmonizar as diferenças entre os parâmetros exigidos por cada uma destas organizações.

Os parâmetros analíticos a serem validados devem ser baseados na intenção de uso do método. Normalmente os parâmetros exigidos para validação de métodos analíticos são: especificidade, linearidade, faixa de concentração, limites de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004).

O desenvolvimento de novos métodos é uma etapa bastante relevante e freqüente que faz parte da rotina de laboratórios industriais e de pesquisa acadêmica. Mais especificamente, o desenvolvimento e a validação de métodos que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possuem um importante papel na descoberta, no desenvolvimento e na fabricação de produtos farmacêuticos onde são utilizados para identificar, quantificar ou purificar o(s) composto(s) de interesse (SINGH, 2013).

A CLAE possui múltiplas vantagens como a possibilidade de reutilização da mesma coluna para várias análises, obtendo-se resultados reprodutíveis, alto poder de resolução, propicia separações rápidas com monitoramento contínuo do eluente, análises com alto nível de exatidão, e o procedimento analítico e o manuseio dos dados podem ser facilmente automatizados. Ainda, existe uma variedade de colunas cromatográficas e detectores disponíveis comercialmente que permitem ajustar a especificidade do método com baixos limites de detecção. Estes diversos benefícios fazem com que esta técnica analítica seja uma das mais procuradas atualmente (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

A N-acetilcisteína (NAC) é um agente mucolítico prescrito na clínica médica para o tratamento de doenças pulmonares hipersecretivas (WEBB, 1962). Sua ação mucolítica-fluidificante está baseada na interação dos grupos tióis livres com as pontes dissulfeto das glicoproteínas, despolimerizando os complexos mucoproteicos e os ácidos nucleicos que estão presentes nas secreções, atuando, desta forma, nas características reológicas do muco (ATKURI et al., 2007; KUSMIEREK e BALD, 2008).

Além disso, as propriedades detoxificantes da NAC foram descobertas nos anos 70 e, desde então, ela vem sendo utilizada como antídoto em casos de intoxicação por paracetamol (ZIMENT, 1986). Neste caso, onde há geração de um metabólito altamente tóxico, N-acetil-*p*-benzoquinonaimina, a NAC age como fonte de L-cisteína para a síntese de glutathione, que é amplamente deplegada durante a overdose (ATKURI et al., 2007).

As formas farmacêuticas de NAC disponíveis comercialmente são: xarope, comprimidos efervescentes, grânulos e solução. Métodos analíticos baseados em cromatografia líquida vêm sendo descritos para a quantificação da NAC em diferentes matrizes biológicas e em formulações farmacêuticas (JOHANSSON e LENNGREN, 1988; HARADA et al., 2001; GLOWACKI e BALD, 2009; GUO et al., 2009; TANG et al., 2009; OZYUREK et al., 2012). No entanto, poucos destes métodos se dedicam à quantificação do fármaco em produtos farmacêuticos utilizando detector ultravioleta sem derivatizar a amostra. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos que utilizem equipamentos modernos com detectores ultravioletas capazes de realizar análises precisas em baixos comprimentos de onda, sem a necessidade de derivatização da amostra, torna-

se relevante, visto que, o detector UV é o mais utilizado, mais estável e requer pouca manutenção, e que o processo de derivatização requer reagentes específicos para tal propósito, envolvendo várias etapas e assim, aumentando o tempo e o custo final da análise (KUSMIEREK et al., 2009). Além disso, os poucos métodos descritos na literatura científica, bem como, os métodos oficiais, que utilizam o detector UV sem derivatizar a amostra, não demonstram sua aplicação para a quantificação da NAC em diferentes formas farmacêuticas (RIEUTORD et al., 1999; TOUSSAINT et al., 2000; USP, 2008; BP, 2008).

Assim, com o intuito de propiciar uma ferramenta eficiente, útil e economicamente viável, que facilite as análises de rotina de laboratórios analíticos acadêmicos ou industriais, bem como, possibilitar a quantificação do fármaco de escolha deste trabalho nas formulações desenvolvidas, o objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar um método analítico para quantificação da N-acetilcisteína em formulações farmacêuticas comerciais, grânulos e comprimidos, e também nas formulações desenvolvidas nesta tese (Anexo 1), utilizando as condições cromatográficas idênticas, detector ultravioleta e sem necessidade de derivatização prévia da amostra.

**PUBLICAÇÃO 2: LC-UV method to assay N-acetylcysteine without
derivatization: analyses of pharmaceutical products**

O conteúdo presente na *Publicação 2* desta tese de doutorado foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Tese e Dissertações da UFRGS, pois o mesmo encontra-se publicado no periódico *Analytical Methods* (OURIQUE, A. F., CORADINI, K., CHAVES, P. S., GARCIA, S. C., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S., BECK, R. C. R. A LC-UV Method to Assay N-Acetylcysteine without Derivatization: Analyses of Pharmaceutical Products. *Analytical Methods*, v. 5, p. 3321-3327, 2013).

Com o intuito de preservar os direitos de publicação das editoras dos periódicos científicos, o texto completo foi substituído pelo resumo abaixo contendo os principais resultados obtidos.

Considerando a inexistência de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV para a quantificação da N-acetilcisteína em grânulos e comprimidos efervescentes sem derivatização prévia da amostra, e utilizando as mesmas condições cromatográficas, uma validação foi proposta e executada. A separação foi realizada utilizando como fase estacionária uma coluna de fase reversa C18, e como fase móvel, uma mistura de fosfato de potássio monobásico 0,05M e acetonitrila (95:5 v/v) contendo 0,095% (v/v) de ácido fosfórico. O composto foi detectado em 214nm e a linearidade avaliada na faixa de concentração de 10 à 50µg/mL. O método desenvolvido é simples, rápido e atendeu a todas as exigências dos guias internacionais de validação analítica.

CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e avaliação da deposição pulmonar *in vitro* e da atividade antioxidante de sistemas pulverulentos redispersíveis contendo N-acetilcisteína lipossomal

Revisão

Os radicais livres são espécies atômicas ou moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita de valência (GILLHAN, PAPACHRISTODOULOU e THOMAS, 1997; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000), tornando-os altamente reativos. Eles podem reagir quimicamente com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). Os danos mais graves são aqueles causados pelos radicais livres derivados do oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS), que são produzidos inicialmente pelas mitocôndrias das células como um produto normal do metabolismo humano, durante a conversão de oxigênio molecular em água (ZAFARULLAH et al., 2003). A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase, e sua ação controla a geração de EROS impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2-5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias é reduzido de forma univalente, dando origem às EROS (BARBOSA et al., 2010).

Em condições fisiológicas normais, as células possuem um sistema de defesa antioxidante constituído, por exemplo, por vitaminas (A, E e C) e por enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione (DE ANDRADE JÚNIOR et al., 2005). As EROS podem desempenhar efeitos benéficos ou maléficos nos organismos. Elas podem, por exemplo, desempenhar papel importante na regulação da resposta imunológica. No entanto, quando há aumento da sua produção ou redução da sua eliminação geram um desequilíbrio fisiológico caracterizado como estresse oxidativo (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000; JUNQUEIRA e RAMOS, 2005). O somatório de danos oxidativos relacionados ao desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes no organismo pode levar a diversos danos a estruturas celulares, como os lipídios, membranas, proteínas e ácidos nucleicos, e desta forma, ocorre a redução da capacidade funcional destas estruturas celulares e aumenta os riscos à diversas doenças (FINKEL e HOLBROOK, 2000).

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico derivado do aminoácido L-cisteína, do qual difere devido à presença de um grupamento acetil (HANLY et

al., 2012). (Figura 1). Este fármaco apresenta inúmeras aplicações, muitas destas decorrentes das propriedades químicas do grupo nucleofílico sulfidríla livre (-SH) presente na sua estrutura, que interage diretamente com os grupos eletrofílicos de radicais de oxigênio (PEREIRA-FILHO et al., 2008). Sua estrutura permite o fácil acesso aos compartimentos intracelulares, onde, é desacetilada formando a L-cisteína, aminoácido indispensável para a síntese de glutathiona (GSH), disponível.

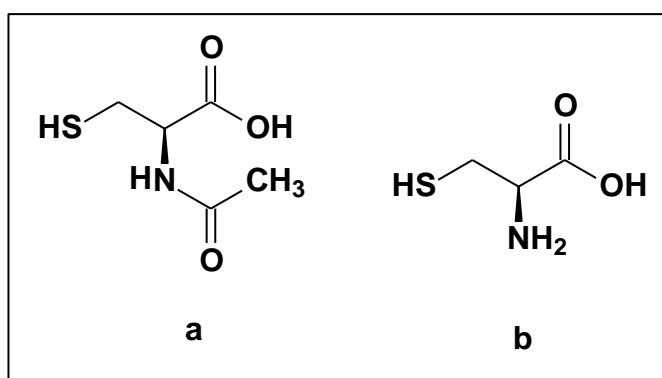


Figura 1. Estrutura química da N-acetilcisteína (a) e da cisteína (b).

A NAC apresenta aplicações na clínica médica como mucolítico no tratamento de afecções respiratórias caracterizadas por hipersecreção densa e viscosa (WEBB, 1962), como bronquite (KELLY, 1998; STEY et al., 2000) e fibrose cística (RIEUTORD et al., 1999; ATKURI et al., 2007), e é o único antídoto aprovado em casos de intoxicação por paracetamol (ZIMENT, 1986). Este fármaco está disponível comercialmente em várias formas farmacêuticas, como comprimidos, grânulos, xarope e solução. A apresentação para uso pulmonar é uma solução para inalação, a qual necessita de um dispositivo para administração tornando o processo lento e dependente de manutenção diária para evitar contaminação microbiológica (AQUINO et al., 2012).

Mais recentemente, a propriedade antioxidante deste composto vem sendo descrita (DEKHUIJZEN, 2004; SADOWSKA, MANUEL-Y-KEENOY e DE BACKER, 2007; DAY, 2008; GALICIA-MORENO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011; RADOMSKA-LESNIEWSKA e SKOPINSKI, 2012), a qual pode ser de forma direta ou indireta. Sua ação antioxidante direta é devido ao seu grupo sulfidríla livre que permite reduzir diretamente EROs, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH), a espécies menos reativas formando

radicais sulfúricos ou cisteína (ARUOMA et al., 1989; ZAFARULLAH et al., 2003). Por outro lado, e de maneira indireta, a NAC é precursora de L-cisteína que atua na biossíntese de glutathiona reduzida, a qual desempenha um importante papel no balanço redox intracelular (KELLY, 1998; KAPLAN et al., 2008; PEREIRA-FILHO et al., 2008; BRANNAN, 2011). Esta propriedade torna o seu uso promissor no tratamento de condições caracterizadas pelo estresse oxidativo ou pelo decréscimo de GSH (KELLY, 1998) como, por exemplo, HIV (DE ROSA et al., 2000), diabetes (RIBEIRO et al., 2011), doenças cardíacas (OLIVEIRA et al., 2009), renais (FUENTES et al., 2008), hepáticas (GALICIA-MORENO et al., 2009), pulmonares (SOTOUDEH et al., 2012) e cerebrais (BERMAN et al., 2011).

Dentre as doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo estão a fibrose pulmonar idiopática, a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica e a fibrose cística (GILLISEN e NOWAK, 1998; MUKHERJEE et al., 2009; SANSONE et al., 2009). No entanto, embora recentemente tenha se reconhecido uma importante atividade antioxidante da NAC, resultados controversos sobre a sua eficácia no tratamento de algumas destas doenças têm sido demonstrados. Por exemplo, ao passo que Tam e colaboradores (2013) não encontraram nenhuma evidência para recomendar o uso da NAC por nebulização ou via oral em pacientes com fibrose cística, Dauletbaev e colaboradores (2009), a partir da realização de um estudo clínico de fase II, demonstram que altas doses de NAC (2800 mg/dia) são bem toleradas e seguras, e que embora não tenham alterado parâmetros clínicos ou inflamatórios, propiciaram um aumento da glutathiona extracelular, sugerindo a necessidade de estudos a longo prazo para confirmar a eficácia da NAC e verificar os seus impactos no tratamento destes pacientes.

A nanoencapsulação de antioxidantes em vesículas lipossômicas é uma ferramenta farmacêutica comprovadamente moderna e eficiente que vem sendo descrita para o tratamento de doenças pulmonares (HOESEL et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2009; MUKHOPADHYAY et al., 2009). Lipossomas ou vesículas lipossômicas são estruturas coloidais constituídas de um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas. Devido a esta organização estrutural, os lipossomas conseguem reter substâncias hidrofílicas, no núcleo aquoso e

substâncias hidrofóbicas, entre as lamelas (VEMURI e RHODES, 1995; ARAÚJO et al., 2003; BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007). Estes sistemas são hábeis para controlar a liberação de fármacos (CROMMELIN et al., 1991; HWANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008; RAMANA et al., 2012; BECK-BROICHSITTER et al., 2013), realizar a entrega de fármacos a locais específicos, como os pulmões (POYNER et al., 1995; SCHREIER, 1998; HUANG e WANG, 2006; CHONO et al., 2009; DU et al., 2010) e possuem eficácia igual ou melhor, menor toxicidade e maior segurança quando comparados com os tratamentos convencionais (BATISTA et al., 2001; HARRIS et al., 2002; O'BRIEN et al., 2004; RAFIYATH et al., 2012). Além disso, são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos, sendo altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007). Por todos estes motivos, estas vesículas fosfolipídicas foram os primeiros nanossistemas utilizados na clínica e, ainda hoje, são os únicos aprovados para administração endovenosa (ROSSI-BERGMANN, 2008).

O primeiro medicamento lipossomal a ser introduzido no mercado foi a doxorrubicina (Doxil/Caelyx) em 1995. Este medicamento é indicado para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado à SIDA (FAROKHZAD e LANGER, 2006). Poucos anos depois foi aprovado para uso clínico o medicamento Ambisome (lipossomas contendo Anfotericina B) que reduziu sensivelmente a toxicidade renal da Anfotericina B. Este medicamento está no mercado desde 1998 para o tratamento de infecções fúngicas e da leishmaniose visceral (MEYERHOFF, 1999, DERAY, 2002). Outras formulações lipossomais para tratamento do câncer estão também no mercado, como o Myocet (doxorrubicina) e o Daunoxome (daunorrubicina), e muitas outras estão em estudos clínicos, que é o caso, por exemplo, de lipossomas contendo cisplatina, lurtotecano, vincristina, paclitaxel e topotecano (IMMORDINO, DOSIO E CATTEL, 2006).

No entanto, embora a ampla aplicação dos lipossomas na encapsulação de diferentes compostos, poucos estudos demonstram a associação da NAC à estes sistemas. Em 2007 Alipour e colaboradores encapsularam a NAC em lipossomas e verificaram que o pré-tratamento intravenoso de ratos Sprague-Dawley machos com esta formulação lipossomal conferiu uma proteção frente ao dano hepático induzido por lipopolissacarídeo. A encapsulação da NAC em

lipossomas também já se mostrou eficaz no tratamento da hepatotoxicidade em ratos induzida pela cadeia A da proteína ricina (BUONOCORE et al., 2011).

A literatura demonstra ainda, que além de serem eficazes na prevenção e na reversão da hepatotoxicidade, lipossomas contendo NAC também possuem efeito profilático frente ao dano pulmonar induzido por lipopolissacarídeo e por paraquat em ratos e em cultura de células A549, respectivamente (MITSOPOULOS et al., 2008; MITSOPOULOS e SUNTRES, 2011).

Entretanto, suspensões aquosas de lipossomas, como as desenvolvidas e testadas nos estudos supracitados, apresentam limitada estabilidade química e física. Com o intuito de aumentar a estabilidade destas vesículas pode-se sugerir a sua conversão em formas sólidas, através de processos de secagem, como a secagem por aspersão, obtendo-se formulações lipossomais pulverulentas (LO, TSAI e KUO, 2004; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2008).

Neste cenário, considerando as desvantagens da formulação comercial líquida de NAC para uso pulmonar, e a limitada estabilidade dos lipossomas, o objetivo deste capítulo foi desenvolver sistemas pulverulentos redispersíveis contendo N-acetilcisteína associada à lipossomas como uma alternativa para o tratamento de doenças pulmonares relacionadas ao estresse oxidativo, investigando a influência da nanoencapsulação no seu perfil de deposição pulmonar *in vitro* e na sua atividade antioxidante.

**PUBLICAÇÃO 3: Redispersible liposomal-N-acetylcysteine dry powder:
development, in vitro lung deposition and antioxidant activity**

O conteúdo presente na *Publicação 3* desta tese de doutorado foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Tese e Dissertações da UFRGS, pois o mesmo encontra-se submetido para publicação no periódico *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Com o intuito de preservar o ineditismo do trabalho, o texto completo foi substituído pelo resumo abaixo contendo os principais resultados obtidos.

Tendo em vista a ampla aplicabilidade da técnica de secagem por aspersão e as limitações da formulação comercial líquida de N-acetilcisteína para uso pulmonar, foram desenvolvidos sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína lipossomal. Os lipossomas foram produzidos pelo método de evaporação em fase reversa contendo 1mg/mL de fármaco, e após foram convertidos em pós empregando a técnica de secagem por aspersão utilizando como adjuvante de secagem 10% de lactose. Os sistemas pulverulentos foram caracterizados e apresentaram características tecnológicas adequadas. Além disso, apresentaram apropriado diâmetro aerodinâmico, fração respirável acima de 30%, e a grande vantagem de serem redispersíveis em meio aquoso, recuperando o tamanho nanométrico original. Após avaliação da atividade antioxidante, os pós contendo N-acetilcisteína encapsulada em lipossomas apresentaram melhor atividade quando comparados as formulações contendo o fármaco livre, tanto em solução quando na forma sólida, representando assim, uma alternativa à formulação líquida de N-acetilcisteína disponível comercialmente para a mesma via de administração, e um bom candidato para o tratamento de doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo.

DISCUSSÃO GERAL

A nanotecnologia é um ramo da ciência que tem se destacado nos últimos anos em diferentes setores da economia. A área da saúde é um dos setores mais beneficiados com os seus avanços, revolucionando o campo de liberação de fármacos e agentes de diagnóstico a sítios específicos (ROCO, 2003; JAIN, 2005; SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005; HU et al., 2011). Dentre os diferentes nanomateriais que vêm sendo estudados, podemos citar os quantum dots, as nanopartículas metálicas, os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas poliméricas (TORCHILIN, 2007). Estes sistemas podem apresentar benefícios como direcionamento do fármaco a locais específicos, diminuição dos efeitos colaterais, liberação controlada e aumento da biodisponibilidade (SCHAFFAZICK et al., 2003a; KINGSLEY et al., 2006; KUMARI, YADAV e YADAV, 2010; SCHÄFER-KORTING, 2010).

No entanto, estas nanopartículas normalmente apresentam-se como suspensões aquosas com limitada estabilidade físico-química. Neste sentido, diferentes técnicas tem sido propostas para realizar a secagem destas formulações líquidas obtendo-se um produto mais estável e versátil. Dentre estas técnicas, pode-se citar a liofilização (SCHAFFAZICK et al., 2003b), a secagem por aspersão (MULLER et al., 2000; TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007; VEHRING, 2008; SOLLOHUB e CAL, 2010) e a granulação por via úmida (FRIEDRICH et al., 2010).

A secagem por aspersão é uma técnica muito utilizada para a obtenção de formas sólidas a partir de uma formulação inicial líquida que possui aplicação industrial em larga escala devido a sua facilidade e baixo custo. Dentre as suas aplicações podemos citar a microencapsulação de fármacos e a obtenção de sistemas inalatórios de pós secos. Além do aspecto econômico, a secagem por aspersão possui vantagens frente a liofilização, como a obtenção de produtos de fácil redispersão com características de fluxo adequadas para administração pulmonar, ao contrário da liofilização que forma pós com padrão heterogêneo de distribuição de tamanho e de difícil redispersão (*cakes*).

Diante destes aspectos, este trabalho foi desenvolvido no sentido de avaliar a aplicação da técnica de secagem por aspersão na obtenção ou secagem de nanopartículas verificando a aplicação tecnológica da ciência e o potencial

mercadológico desta técnica. Além disso, de forma inédita, propusemos a obtenção de sistemas pulverulentos inovadores contendo N-acetilcisteína, como uma alternativa ao tratamento convencional disponível comercialmente.

Inicialmente, uma vasta revisão acerca das últimas patentes que utilizaram a técnica de secagem por aspersão para obtenção ou secagem de nanopartículas poliméricas foi realizada. Para isto, recorreu-se ao banco de dados Derwent Innovations IndexSM onde mais de 100 patentes foram previamente selecionadas. A partir de uma rigorosa apreciação, cerca de 30 foram selecionadas, as quais foram divididas em três grupos de acordo com as seguintes abordagens: i) secagem por aspersão de soluções para a obtenção de nanopartículas; ii) secagem por aspersão de dispersões/emulsões para a obtenção de nanopartículas ou iii) nanopartículas secas através da técnica de secagem por aspersão. Após este criterioso levantamento, foi possível observar que houve um aumento significativo no número de patentes que utilizam esta técnica para obter ou secar nanopartículas poliméricas nos últimos 15 anos. Ainda, foi observado que a maioria das invenções utiliza a secagem por aspersão como uma alternativa para aumentar a estabilidade de formulações líquidas, ou então, para a obtenção de formas sólidas que podem ser facilmente convertidas em outras formas farmacêuticas como, comprimidos, cápsulas, pós para inalação e grânulos.

Devido ao tipo de nanopartícula desenvolvido nesta tese, além do levantamento das últimas patentes que utilizaram a técnica de secagem por aspersão na obtenção ou secagem de nanopartículas poliméricas, foram avaliadas também as últimas patentes que empregaram esta técnica na secagem de lipossomas. Após cautelosa análise acerca das patentes que utilizaram a secagem por aspersão para obtenção de sistemas pulverulentos lipossomais, pode-se observar que os principais objetivos dos inventores vem de encontro com os constatados nas invenções que empregaram esta técnica para secagem das nanopartículas poliméricas, ou seja, aumentar a limitada estabilidade físico-químicas das formulações e obter formas farmacêuticas intermediárias ou finais para serem administradas por diferentes vias.

Após ter estudado extensamente a aplicação da técnica de secagem por aspersão e evidenciado a sua ampla utilização e versatilidade, a próxima etapa

do trabalho foi dedicada a obtenção de um sistema inalatório de pó seco (*Dry Powder Inhaler* – DPI) através da secagem por aspersão de lipossomas, e neste momento, foi realizada a escolha do fármaco de estudo, a N-acetilcisteína (NAC), que por ser um composto hidrofílico foi encapsulado em vesículas lipossomais, outro sistema de liberação nanométrico amplamente estudado nas últimas décadas.

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico, com ação mucolítica, precursor de L-cisteína e glutathiona reduzida (GSH). Após administração oral é rapidamente absorvido e sofre extenso metabolismo de primeira passagem no fígado e intestino delgado formando metabólitos como cisteína e sulfitos inorgânicos, sendo que, somente uma pequena porcentagem da molécula intacta de NAC chega no plasma e nos tecidos. O seu tempo de meia-vida plasmático é estimado em cerca de 2h, e após 10-12h da administração a NAC não é mais detectável (KELLY, 1998; SADOWSKA, MANUEL-Y-KEENOY e DE BACKER, 2007). Após administração oral somente 3% da NAC radiomarcada é excretada nas fezes indicando a quase completa absorção da NAC e seus metabólitos (BORGSTRÖM, KAGEDAL e PAULSEN, 1986). Após absorção a NAC é rapidamente metabolizada à cisteína a qual é indispensável para a síntese intracelular de GSH. Sendo assim, esta aparente baixa biodisponibilidade da NAC é ilusória, visto que, após desacetilação há formação de metabólitos tiólicos que estimulam a síntese de GSH, aumentam a atividade da glutathiona-S-transferase, promovem a detoxificação e atuam como sequestradores de espécies reativas (KELLY, 1998).

Tendo em vista a inexistência de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, sem derivatização prévia, uma validação, para a quantificação deste fármaco, foi proposto e executado o desenvolvimento de um novo método. O método desenvolvido é rápido, simples, confiável, específico, linear, preciso, exato e robusto e permite a quantificação da NAC em diferentes formas farmacêuticas, granulado e comprimidos efervescentes. As vantagens deste método em relação aos outros anteriormente propostos na literatura são: detecção no UV sem derivatização prévia, adequado tempo de retenção e possibilidade de quantificação do fármaco em diferentes formas farmacêuticas, utilizando as condições cromatográficas idênticas. Desta

forma, este método representa uma importante e adequada alternativa para a quantificação da NAC podendo ser facilmente aplicado em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos. Além disso, e atendendo o propósito inicial de quantificar o fármaco nas formulações lipossomais desenvolvidas neste trabalho, o método demonstrou ser linear, específico e preciso também para essa finalidade, e a partir do cumprimento destes parâmetros, sua exatidão foi inferida (ICH, 2005) (Anexo 1).

Na etapa seguinte deste trabalho, a NAC foi encapsulada em lipossomas, que foram produzidos pelo método de evaporação em fase reversa na concentração de 1 mg/mL de fármaco. Este método foi utilizado na tentativa de aumentar a quantidade de fármaco encapsulado no núcleo aquoso dos lipossomas (SZOKA e PAPAHADJOPOULOS, 1978).

Em estudos preliminares, otimizou-se o método de preparação dos lipossomas principalmente no que diz respeito a homogeneização do tamanho das vesículas obtidas. Para isto, foi avaliado o número de ciclos e pressão no homogeneizador à alta pressão, bem como, o número de unidades filtrantes necessárias, com porosidades de 0,45 μm e 0,22 μm , para obtenção de perfil granulométrico exclusivamente nanométrico. Após alguns testes, foi verificado que o menor número de ciclos possível foi de dois ciclos, mas que estes, embora facilitassem muito o processo de filtração sequencial, precisavam ser seguidos pelo mesmo, pois somente assim obtinha-se uma adequada distribuição unimodal nanométrica (Anexo 2).

Após essa etapa inicial de otimização, foi estudado o diâmetro das vesículas utilizando três técnicas diferentes: difração de laser, espalhamento de luz dinâmico e rastreamento de partículas. Os lipossomas apresentaram tamanho na faixa nanométrica e não houve influência da presença do fármaco neste parâmetro.

A técnica de difração de laser (LD) determina o tamanho de partículas desde a faixa nanométrica até a milimétrica através da avaliação da variação angular na intensidade da luz difundida após um laser incidir sobre a amostra e interagir com as partículas dispersas na mesma. Estes dados de intensidade da dispersão angular são utilizados para calcular o tamanho das partículas com base na teoria de difusão da luz de Mie, onde o tamanho das partículas é

indicado como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente (User Manual Mastersizer 2000, Malvern Instruments).

A técnica de rastreamento de partículas (NTA) utiliza o equipamento Nanosight que permite o rastreamento em tempo real do movimento browniano de nanopartículas em suspensão, o qual é realizado partícula por partícula. Esta técnica se apresenta como uma alternativa a uma das técnicas mais utilizadas para determinação de tamanho de partícula, o espalhamento de luz dinâmico (DLS), para a análise de amostras mais complexas e polidispersas (FILIPE, HAWE e JISKOOT, 2010).

Ambas as técnicas, DLS e NTA, baseiam-se no movimento browniano das partículas, cujo coeficiente de difusão das partículas no meio está relacionado com o tamanho das mesmas através da equação de Stokes-Einsten, no caso do DLS, ou de uma derivada desta equação que relaciona a velocidade das partículas com o seu raio hidrodinâmico no caso do NTA. No NTA este movimento é analisado por vídeo, onde mudanças na posição de partículas individuais são rastreadas em duas dimensões, e então, o coeficiente de difusão das partículas é determinado e relacionado com o seu diâmetro. Por outro lado, o DLS não é capaz de visualizar as partículas individualmente, e analisa o conjunto de partículas, onde o tamanho é determinado a partir de oscilações de intensidade da luz espalhada devido ao movimento browniano das partículas, podendo assim ser limitado para a análise de amostras polidispersas (CARR e MALLOY, 2006; APPLICATION NOTE NANOSIGHT, 2010; FILIPE, HAWE e JISKOOT, 2010).

Sendo assim, considerando a fundamentação e as peculiaridades de cada técnica, as diferenças observadas entre os diâmetros médios obtidos por NTA e DLS, onde os obtidos por NTA foram superiores aos obtidos por DLS, podem ser explicadas pela presença de uma pequena quantidade de partículas maiores, onde a intensidade de luz espalhada por estas partículas maiores impediu a detecção das partículas menores e evitou o rastreamento pelo software do NTA, como já foi previamente proposto por Filipe, Hawe e Jiskoot em 2010. Além disso, a necessidade de diferentes diluições da amostra, para NTA de 2000 vezes e para DLS de 500 vezes, também pode ter sido um problema, causando agregação das partículas e, por conseguinte diferenças nos diâmetros obtidos.

As formulações exibiram baixos valores de SPAN indicando reprodutibilidade e adequada homogeneidade no que se refere a distribuição de tamanho de partícula. O tamanho médio observado na microscopia eletrônica de transmissão corroborou com os resultados das outras técnicas, e as vesículas apresentaram forma esférica.

O teor de fármaco nos lipossomas foi determinado no método previamente validado e foi próximo ao valor teórico de 1 mg/mL. Com relação a eficiência de encapsulação da NAC nos lipossomas, esta foi em torno de 40%, valor superior a resultados anteriormente descritos na literatura (MITSOPOULOS et al., 2008; MITSOPOULOS e SUNTRES, 2011) reforçando a potencialidade do método de evaporação em fase reversa em aumentar a eficiência de encapsulação de compostos hidrofílicos em vesículas lipossomais. Além disso, os lipossomas não apresentaram tendência à instabilidade física após análise de retroespalhamento múltiplo de luz durante 1 hora.

Considerando que as formas sólidas tendem sempre a serem mais estáveis que as líquidas, e que os lipossomas possuem limitações com relação a sua estabilidade físico-química, as vesículas lipossomais desenvolvidas foram convertidas em formas sólidas através da técnica de secagem por aspersão, utilizando como adjuvante de secagem 10% de lactose. Para fins comparativos foram preparados pós contendo lipossomas brancos, bem como pós a partir de soluções de fármaco livre ou contendo apenas lactose.

Diferentes adjuvantes de secagem já foram utilizados na obtenção de sistemas pulverulentos lipossomais empregando a técnica de secagem por aspersão. Dentre eles estão o manitol (CHARNVANICH, VARDHANABHUTI e KULVANICH, 2010), a sacarose (HAUSER e STRAUSS, 1987; LO, TSAI e KUO, 2004; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2008; CHEN et al., 2012), a trealose (LO, TSAI e KUO, 2004; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007; COLONNA et al., 2008; CHEN et al., 2012), a maltodextrina (KARADAG et al., 2013) e a lactose (GOLDBACH, BROCHART e STAMM, 1993; LO, TSAI e KUO, 2004; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2007; CHOUGULE, PADHI e MISRA, 2008; COLONNA et al., 2008; WESSMAN, EDWARDS e MAHLIN, 2010).

A lactose foi escolhida como adjuvante de secagem neste trabalho por ser um dos carreadores mais utilizados, e devido ao seu favorável perfil toxicológico, pois trata-se de um adjuvante seguro e aprovado pelo FDA para inalação (LO, TSAI e KUO, 2004). Além disso, é de fácil disponibilidade, compatível com uma grande quantidade de fármacos, e facilita a secagem por aspersão de partículas coloidais devido a sua capacidade de extrair água e modular a agregação das partículas (TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007). Com relação a quantidade de lactose empregada, 10%, foi baseada em estudos prévios da literatura que secaram lipossomas (GOLDBACH, BROCHART e STAMM, 1993) e nanocápsulas (TEWA-TAGNE, BRIANÇON e FESSI, 2007), e verificaram que os pós obtidos com 10% de lactose foram hábeis em recuperar o tamanho nanométrico após redispersão aquosa, e ainda, que os pós contendo as nanopartículas poliméricas, obtidos nesta condição, apresentaram a melhor morfologia.

Todos os pós apresentaram coloração branca com certa pegajosidade após serem tasteados, possivelmente devido a alta higroscopicidade da lactose. Após análise morfológica empregando microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar partículas com a superfície lisa para os pós contendo apenas lactose ou o fármaco não encapsulado (Figura 1a e 1b), e uma superfície levemente porosa para o pó contendo os lipossomas brancos e para o pó contendo a NAC encapsulada (Figura 1c e 1d).

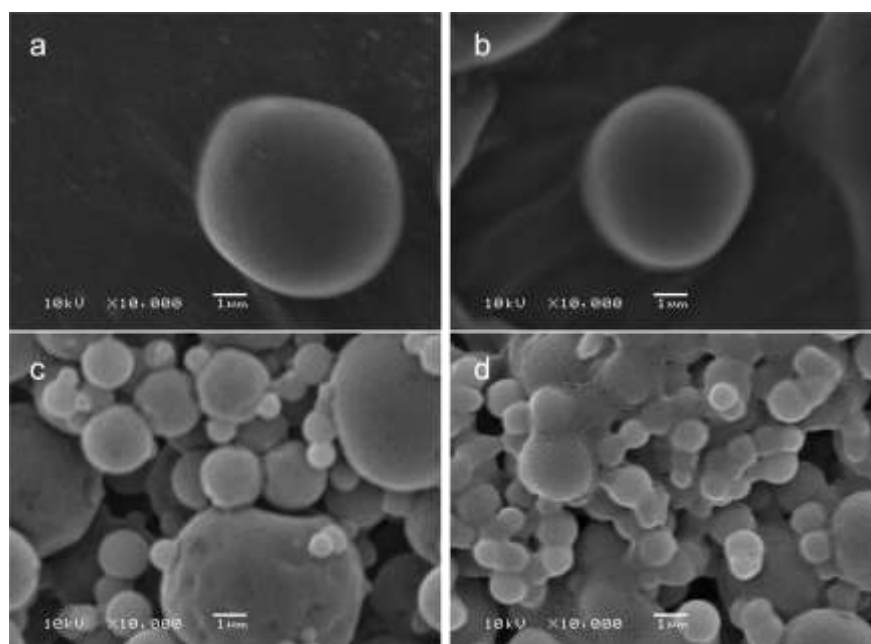


Figura 1. Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos pós contendo apenas lactose (a), NAC não encapsulada (b), lipossomas brancos (c) e NAC associada aos lipossomas (d). [bar = 1 μm (10.000 x)].

As propriedades de fluxo dos sistemas pulverulentos contendo N-acetilcisteína foram avaliadas e estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades de fluxo dos pós contendo NAC não encapsulada (SD-NAC) e dos pós contendo NAC lipossomal (SD-NAC-Lip).

Parâmetros	SD-NAC	SD-NAC-Lip
Densidade bruta (g/mL)	0,26 \pm 0,03	0,36 \pm 0,01
Densidade de compactação (g/mL)	0,44 \pm 0,05	0,52 \pm 0,02
Fator de Hausner	1,70 \pm 0,05	1,44 \pm 0,03
Índice de Carr (%)	41,3 \pm 1,60	30,4 \pm 1,48

Os resultados obtidos demonstraram que o pó contendo a NAC não encapsulada apresentou propriedades de fluxo inferiores ao pó contendo a NAC

associada as lipossomas, ou seja, alta coesividade indicada pelo elevado fator de Hausner (1,7) e fluxo extremamente pobre, superior à 40% (CARR, 1965; HAUSNER, 1967). Já a formulação pulverulenta contendo o fármaco encapsulado, demonstrou menor coesividade e melhor fluxo, representados pelo fator de Hausner em torno de 1,4 e pelo Índice de Carr de 30%, valor este próximo ao observado por Chougule, Padhi e Misra em 2007 e 2008, onde desenvolveram sistemas pulverulentos lipossomais contendo tacrolimus ou dapsona, respectivamente, empregando a técnica de secagem por aspersão e obtiveram, para os pós contendo 2% de lactose, um índice de Carr de 37% e 35%.

O processo de secagem apresentou altos rendimentos, o teor de fármaco foi próximo ao esperado, e a umidade residual abaixo de 10% para todos os pós. Após análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura, foram observadas partículas esféricas em todas as formulações. No entanto, apenas nos pós contendo lipossomas foi constatada a presença de partículas submicrométricas, ou seja, o processo de secagem por si só não é capaz de produzir este tipo de estruturas.

Na sequência, a técnica de difração de laser foi utilizada com dois propósitos diferentes. O primeiro visando a avaliação do diâmetro geométrico das partículas, e para isto foi utilizado o acessório necessário para análise pela via seca. Por outro lado, na segunda abordagem a intenção foi verificar a redispersão aquosa dos pós obtidos, e então neste momento, foi utilizada a unidade dispersora contendo água em seu interior. Após a análise por via seca, o diâmetro geométrico obtido foi em torno de 2,5 μm com baixos valores de SPAN indicando boa homogeneidade dos pós obtidos no que se refere a distribuição de tamanho de partícula. O diâmetro geométrico foi utilizado para calcular o diâmetro aerodinâmico o qual prediz a região do trato respiratório que as partículas irão se depositar. Na análise por via úmida, foi demonstrada a capacidade dos pós contendo lipossomas em recuperar o tamanho nanométrico quando em contato por um minuto com o meio aquoso. Ainda, com o intuito de visualizar estas nanoestruturas após a redispersão aquosa, os pós redispersos foram observados por microscopia eletrônica de transmissão, onde foi verificado a presença de estruturas nanométricas somente nos pós contendo lipossomas.

Além de adequadas características tecnológicas como alto rendimento, baixa umidade residual, teor de fármaco próximo ao teórico, estreita distribuição de tamanho de partícula e recuperação do tamanho nanométrico após redispersão em meio aquoso, os sistemas pulverulentos apresentaram características apropriadas para uso pulmonar, como diâmetro aerodinâmico na faixa recomendada para deposição no trato respiratório e fração respirável acima de 30%, demonstrando a potencialidade das formulações desenvolvidas para serem utilizadas como sistemas inalatórios de pós secos (DPIs). Os DPIs são mais adequados que os nebulizadores, mais convenientes e com menor custo, de fácil utilização, e por conterem formulações sólidas são mais estáveis, tanto do ponto de vista físico-químico quanto microbiológico (SANSONE et al., 2009).

A formulação de NAC disponível comercialmente para uso pulmonar é uma solução para inalação na concentração de 100 mg/mL a qual necessita de um dispositivo para a administração. O fato de o sistema pulverulento lipossomal desenvolvido neste trabalho possuir uma concentração de fármaco inferior à esta solução comercial, em torno de 8 mg de NAC/g pó, não configura um problema, visto que, a literatura científica descreve que a associação de substâncias a vesículas lipossomais tende a melhorar a eficácia e a segurança quando comparados aos tratamentos convencionais (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007). Além disso, sabe-se que a administração de formulações utilizando nebulizadores pode ocasionar perda do fármaco devido ao seu débito constante durante inspiração e expiração, a permanência de volume residual no copo nebulizador de até 1 mL e aos diferentes padrões de respiração, onde a respiração nasal reduz a deposição pulmonar em até 50% e respirações muito rápidas aumentam a deposição na orofaringe e nas vias aéreas superiores (PEREIRA, 1998). Ainda, vale ressaltar que o tratamento com esta formulação líquida comercial requer a aquisição de diluente e do aparelho de nebulização, o qual necessita de energia elétrica para o seu funcionamento, tendo impacto direto no orçamento do paciente, o qual também é responsável por assegurar a manutenção e limpeza periódica para evitar contaminação microbiológica ou redução na eficácia da nebulização (PEREIRA, 1998; BLAU et al., 2007).

Com relação a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de todas as formulações desenvolvidas neste trabalho, diferentes constatações foram

evidenciadas. Inicialmente, foi demonstrado que o processo de preparação dos lipossomas não alterou a atividade antioxidante do fármaco. Por outro lado, o processo de secagem ocasionou a perda da atividade antioxidante da NAC quando esta foi seca a partir de uma solução contendo o fármaco não encapsulado. No entanto, a encapsulação nos lipossomas manteve tal atividade após o processo de secagem, a qual foi superior quando comparada tanto com a solução do fármaco não-encapsulado, quanto com o pó preparado a partir desta solução. Neste cenário, a partir do conjunto de resultados apresentados, pode-se afirmar que a encapsulação do fármaco nos lipossomas foi essencial para a obtenção de um sistema inalatório de pó seco, o qual representa uma vantagem tecnológica comparada com a formulação de NAC disponível comercialmente para a mesma via de administração.

CONCLUSÕES

- ✓ A aplicabilidade e versatilidade da técnica de secagem por aspersão foi demonstrada a partir da apresentação e discussão das patentes depositadas nos últimos anos abordando seu emprego para obtenção ou secagem de nanopartículas;
- ✓ O método desenvolvido para a quantificação da NAC em duas formas farmacêuticas comerciais empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV atendeu a todos os requisitos oficiais de validação e, desta forma, apresenta-se como uma alternativa para análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade. Além disso, o método foi validado para aplicação na quantificação deste fármaco nos lipossomas desenvolvidos neste trabalho;
- ✓ Os lipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa apresentaram tamanho situados na escala nanométrica, com teor próximo ao esperado (1mg/mL) e eficiência de encapsulação superior à anteriormente relatada na literatura;
- ✓ O processo de secagem para a obtenção dos pós contendo o fármaco encapsulado ou não-encapsulado apresentou ótimos rendimentos, produzindo pós de características compatíveis com a administração pulmonar proposta, com diâmetro aerodinâmico próximo a 1,5 µm e fração respirável acima de 30%;
- ✓ Os pós produzidos a partir da secagem de lipossomas contendo NAC são redispersíveis em água, recuperando o tamanho nanométrico original;
- ✓ O processo de preparação dos lipossomas não alterou a atividade antioxidante *in vitro* do fármaco, de acordo com o método utilizado;
- ✓ A secagem por aspersão do fármaco a partir de sua solução influenciou negativamente na sua atividade antioxidante. O pó contendo o fármaco livre apresentou atividade pró-oxidante em todas as concentrações testadas;
- ✓ O pó obtido a partir da secagem por aspersão da N-acetilcisteína encapsulada nos lipossomas teve a melhor atividade antioxidante *in vitro*, de acordo com o método empregado, demonstrando que a nanoencapsulação da NAC é um fator determinante para a obtenção de

sistemas inalatórios de pós secos contendo esse fármaco e empregando essa técnica de secagem;

- ✓ Os sistemas pulverulentos contendo a N-acetilcisteína lipossomal obtidos a partir da técnica de secagem por aspersão demonstraram ser bons candidatos para o tratamento de doenças pulmonares associadas ao estresse oxidativo, e podem ser sugeridos como uma alternativa à formulação líquida comercial de NAC, a qual necessita de um dispositivo para inalação e possui maior risco de contaminação microbiológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, M.; UNGER, M.; LEE, G. Surface composition of spray-dried particles of bovine serum albumin/trehalose/surfactant. *Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 863-870, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899, 2003.

ALIPOUR, M. et al. Prophylactic effect of liposomal n-acetylcysteine against LPS-induced liver injuries. *Journal of Endotoxin Research*, v. 13, p. 297-304, 2007.

APPLICATION NOTE NANOSIGHT. Nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS) - a comparison. 2010.

AQUINO, R. P. et al. Dry powder inhalers of gentamicin and leucine: formulation parameters, aerosol performance and in vitro toxicity on CuFi1 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 426, p. 100-107, 2012.

ARAÚJO, D. R. et al. Drug-delivery systems for local anesthetics: Therapeutic applications. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 53, p. 663-671, 2003.

ARUOMA, O. I. et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and hypochlorous acid its reaction superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 6, p. 593-597, 1989.

ATKURI, K. R. et al. N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 7, p. 355-359, 2007.

AXELSSON, B. I. et al. A new system for administration of liposomes to mammals. WO1988/001862 A1, 1988.

BARAS, B.; BENOIT, M. A.; GILLARD, J. Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(DL-lactide) microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 200, p. 133-145, 2000.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATIST, G. et al. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, p. 1444-1454, 2001.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 167-179, 2007.

BECK-BROICHSITTER, M. et al. Correlation of drug release with pulmonary drug absorption profiles for nebulizable liposomal formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, p. 106-114, 2013.

BERMAN, A. E. et al. N-acetylcysteine prevents loss of dopaminergic neurons in the EAAC1 mouse. *American Neurological Association*, v. 69, p. 509-520, 2011.

BLAU, H. et al. Microbial contamination of nebulizers in the home treatment of cystic fibrosis. *Child: Care, Health and Development*, v. 33, p. 491-495, 2007.

BRANNAN, R. G. Effect of N-acetyl-cysteine on liposomal and muscle model oxidation induced by reactive oxygen, nitrogen, and sulfur. *Meat Science*, v. 88, p. 733-739, 2011.

BRITISH PHARMACOPEIA, United Kingdom London, 2008.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, S. T. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 18, p. 1169-1206, 1992.

BORGSTRÖM, L.; KAGEDAL, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinetics of n-acetylcysteine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 31, p. 217-222, 1986.

BUONOCORE, C. et al. Treatment of ricin-A-chain-induced hepatotoxicity with liposome-encapsulated n-acetylcysteine. *Journal of Drug Targeting*, v. 19, p. 821-829, 2011.

CAL, K.; SOLLOHUB, S. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 575-586, 2010.

CARR, B.; MALLOY, A. NanoParticle tracking analysis – The NANOSIGHT system. 2006.

CARR, R. L. Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering Journal*, v. 72, p. 163-168, 1965.

CHARNVANICH, D.; VARDHANABHUTI, N.; KULVANICH, P. Effect of cholesterol on the properties of spray-dried lysozyme-loaded liposomal powders. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science Technology*, v. 11, p. 832-842, 2010.

CHEN, C. et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, v. 142, p. 299-311, 2010.

CHEN, J. et al. Liposomal vitamin A and method of preparation. US2005/0175681 A1, 2005.

CHEN, K. et al. Investigation into the effect of varying L-leucine concentration on the product characteristics of spray-dried liposome powders. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 64, p. 1412-1424, 2012.

CHONO, S. et al. Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 137, p. 104-109, 2009.

CHOUGULE, M.; PADHI, B.; MISRA, A. Development of spray dried liposomal dry powder inhaler of dapsone. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science Technology*, v. 9, p. 47-53, 2008.

CHOUGULE, M.; PADHI, B.; MISRA, A. Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus: Preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. *International Journal of Nanomedicine*, v. 2, p. 675-688, 2007.

CHRISTENSEN, K. L.; PEDERSEN, G. P.; KRISTENSEN, H. G. Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 212, p. 187-194, 2001.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

COLONNA, C. et al. Non-viral dried powders for respiratory gene delivery prepared by cationic and chitosan loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, p. 108-118, 2008.

CROMMELIN, D. J. A. et al. Liposomes and immunoliposomes for controlled release or site specific delivery of anti-parasitic drugs and cytostatics. *Journal of Controlled Release*, v. 16, p. 147-154, 1991.

DAULETBAEV, N. et al. A phase II study on safety and efficacy of high-dose n-acetylcysteine in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Medical Research*, v. 14, p. 352-358, 2009.

DAY, B. J. Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 10, p. 355-370, 2008.

DE ANDRADE JÚNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. 60-68, 2005.

DE ROSA, S. C. et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 30, p. 915-929, 2000.

DEKHUIJZEN, P. N. R. Antioxidant properties of n-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, v. 23, p. 629-636, 2004.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 37-41, 2002.

DI MARTINO, P. et al. The spray drying of acetazolamide as method to modify crystal properties and to improve compression behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, p. 209-221, 2001.

DIEDERICHS, J. E. et al. Compressed air inhaler for pulmonary application of liposomal powder aerosols and powder aerosols. US2005/0196345 A1, 2005.

DOLLO, G. et al. Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 19, p. 273-280, 2003.

DU, B. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 2-methoxyestradiol-loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 384, p. 140-147, 2010.

ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 31, p. 138-155, 2013.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1456-1459, 2006.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by Nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, v. 27, p. 796-810, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, p. 239-247, 2000.

FRIEDRICH, R. B. et al. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: The wet granulation process as a promising approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 616-621, 2010.

FUENTES, M. C. R. et al. Treatment with n-acetylcysteine in stable renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, v. 40, p. 2897-2899, 2008.

GALICIA-MORENO, M. et al. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative

stress. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 21, p. 908-914, 2009.

GILLHAN, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. P.; THOMAS, J. H. *Wills' biochemical basis of medicine*. Oxford: Reed Educacional and Professional Publishing Ltda, p. 196-202, 1997.

GILLISSEN, A.; NOWAK, D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respiratory Medicine*, v. 92, p. 609-623, 1998.

GLAVAS-DODOV, M. et al. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 291, p. 79-86, 2005.

GLOWACKI, R.; BALD, E. Determination of n-acetylcysteine and main endogenous thiols in human plasma by HPLC with ultraviolet detection in the form of their S-quinolinium derivatives. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 32, p. 2530-2544, 2009.

GOLDBACH, P.; BROCHART, H.; STAMM, A. Spray-drying of liposomes for a pulmonary administration. I. Chemical stability of phospholipids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 19, p. 2611-2622, 1993.

GREGORIADIS, G.; ZADI, B.; JAYASEKERA, P. N. Method of forming liposomes. WO1999/065465 A1, 1999.

GUO, X. et al. Simultaneous analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a new probe, 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(4-iodoacetamido)difluoroboradiaza-s-indacene. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 3874-3880, 2009.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. *Annals New York Academy Sciences*, v. 899, p. 136-147, 2000.
HAAS, H.; FATLER, U. Improved liposomal formulations of lipophilic compounds. WO2011/144745 A2, 2011.

HANLY, L. N. et al. N-acetylcysteine as a novel prophylactic treatment for ifosfamide-induced nephrotoxicity in children: Translational pharmacokinetics. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 52, p. 55-64, 2012.

HARADA, D. et al. Determination of reduced, protein-unbound, and total concentrations of n-acetyl-l-cysteine and l-cysteine in rat plasma by postcolumn ligand substitution high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 290, p. 251-259, 2001.

HARRIS, L. et al. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, v. 94, p. 25-36, 2002.

HAUSER, H. O. Dehydrating vesicle preparations for long-term storage. WO1988/006441 A1, 1988.

HAUSER, H.; STRAUSS, G. Stabilization of small unilamellar phospholipid vesicles during spray-drying. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 897, p. 331-334, 1987.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy*, v. 3, p. 7-13, 1967.

HOESEL, L. M. et al. Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 10, p. 973-981, 2008.

HRDINA, R. et al. Liposome of a textile auxiliary agent, method of its preparation and a preparation containing it. WO2008/089707 A1, 2008.

HU, Y. et al. Nanodevices in diagnostics. *Nanomedicine and Nanotechnology*, v. 3, p. 11-32, 2011.

HUANG, Y.; WANG, C. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 9-14, 2006.

HWANG, T. et al. Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the in vitro cytotoxicity and in vivo intratumor drug accumulation against melanomas. *Journal of Dermatological Science*, v. 46, p. 11-20, 2007.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, p. 297-315, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, v. 358, p. 37-54, 2005.

JAIN, M. S. et al. Spray drying in pharmaceutical industry: A review. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, v. 4, p. 74-79, 2012.

JOHANSSON, M.; LENNGREN, S. Determination of cysteine, glutathione and n-acetylcysteine in plasma by ion-pair reversed-phase liquid chromatography and post-column derivatization. *Journal of Chromatography*, v. 432, p. 65-74, 1988.

JUNQUEIRA, V. B. C.; RAMOS, L. R. Estresse oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. *Geriatrics e gerontologia*. Barueri: Manole Ltda, p. 315-324, 2005.

KAPLAN, M. et al. Influence of N-acetylcysteine on renal toxicity of cadmium in rats. *Pediatric Nephrology*, v. 23, p. 233-241, 2008.

KARADAG, A. et al. Presence of electrostatically adsorbed polysaccharides improves spray drying of liposomes. *Journal of Food Science*, v. 78, p. 206-221, 2013.

KELLY, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alternative Medicine Review*, v. 3, p. 114-127, 1998.

KINGSLEY, J. D. et al. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 1, p. 340-350, 2006.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.75, p. 1-18, 2010.

KUSMIEREK, K.; BALD, E. Determination of n-acetylcysteine and thioglycolic acid in human urine. *Chromatographia*, v. 67, p. 23-29, 2008.

KUSMIEREK, K. et al. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 3300-3308, 2009.

LO, Y.; TSAI, J.; KUO, J. Liposomes and disaccharides as carriers in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 259-272, 2004.

MAHLBERG, K. et al. Microencapsulated liposomal compositions. WO2009/050333 A1, 2009.

MANZO, R. P. et al. Liposome encapsulated active agent dry powder composition. WO1998/011877 A1, 1998.

MEYERHOFF, A. U.S. food and drug administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, p. 42-48, 1999.

MITSOPOULOS, P. et al. Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, p. 106-111, 2008.

MITSOPOULOS, P.; SUNTRES, Z. E. Protective effects of liposomal n-acetylcysteine against paraquat-induced cytotoxicity and gene expression. *Journal of Toxicology*, v. 2011, p. 1-14, 2011.

MUKHERJEE, S. et al. Protection of half sulfur mustard gas-induced lung injury in guinea pigs by antioxidant liposomes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 23, p. 143-153, 2009.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Role of MAPK/AP-1 signaling pathway in the protection of CEES-induced lung injury by antioxidant liposome. *Toxicology*, v. 261, p. 143-151, 2009.

MULLER, C. R. et al. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, p. 343-347, 2000.

O'BRIEN, M. E. R. et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, v. 15, p. 440-449, 2004.

OLIVEIRA, D. M. et al. Efeitos da n-acetilcisteína no condicionamento isquêmico: estudo em corações isolados de ratos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 24, p. 23-30, 2009.

OZYUREK, M. et al. Determination of biothiols by a novel on-line HPLC-DTNB assay with post-column detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 750, p. 173-181, 2012.

PALMIERI, G. F. et al. Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 27, p. 195-204, 2001.

PARADKAR, A. et al. Characterization of curcumin–PVP solid dispersion obtained by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 271, p. 281-286, 2004.

PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 2, p. 44-47, 2009.

PEREIRA-FILHO, G. et al. Role of n-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 45, p. 156-162, 2008.

PEREIRA, L. F. F. Como administrar drogas por via inalatória na asma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 24, p. 133-144, 1998.

POYNER, E. A. et al. A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 35, p. 41-48, 1995.

RADHAKRISHNAN, R.; MIHALKO, P. J.; ABRA, R. M. Method and apparatus for administering dehydrated liposomes by inhalation. US4895719 A1, 1990.

RADOMSKA-LESNIEWSKA, D. M.; SKOPINSKI, P. N-acetylcysteine as an antioxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications. *Central European Journal of Immunology*, v. 37, p. 57-66, 2012.

RAFIYATH, S. M. et al. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Experimental Hematology and Oncology*, v. 1, p. 1-10, 2012.

RAMANA, L. N. et al. Investigation on the stability of saquinavir loaded liposomes: Implication on stealth, release characteristics and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 431, p. 120-129, 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, G. et al. N-acetylcysteine on oxidative damage in diabetic rats. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 34, p. 467-474, 2011.

RIEUTORD, A. et al. Stability and compatibility of an aerosol mixture including n-acetylcysteine, netilmicin and betamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 190, p. 103-107, 1999.

ROCO, M. C. Broader societal issues of nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 5, p. 181-189, 2003.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. *Ciência e Cultura*, v. 60, p. 54-57, 2008.

SADOWSKA, A. M.; MANUEL-Y-KEENOY, B.; DE BACKER, W. A. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in

vitro and in vivo dose-effects: A review. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 20, p. 9-22, 2007.

SALAMANCA-BUENTELLO, F. et al. Nanotechnology and the developing world. *Plos Medicine*, v. 2, p. 300-303, 2005.

SANSONE, F. et al. Physical characteristics and aerosol performance of naringin dry powders for pulmonary delivery prepared by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, p. 206-213, 2009.

SCHÄEFER-KORTING, M. Drug delivery. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, v. 197, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 56, p. 501-505, 2003b.

SCHREIER, H. Pulmonary applications of liposomes. *Medical Applications of Liposomes*, cap. 6.3, p. 473-486, 1998.

SEVILLE, P. C.; LI, H.; LEAROYD, T. P. Spray-dried powders for pulmonary drug delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 24, p. 307-360, 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

SINGH, R. HPLC method development and validation- an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 4, p. 26-33, 2013.

SOLLOHUB, S.; CAL, K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 587-597, 2010.

SOTOUDEH, A. et al. Effect of n-acetylcysteine on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion. Histopathological study in rat model. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 27, p. 168-171, 2012.

STEY, C. et al. The effect of oral n-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *European Respiratory Journal*, v. 16, p. 253-262, 2000.

SZOKA, F.; PAPAHDJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, p. 4194-4198, 1978.

TAM, J. et al. Nebulized and oral thiol derivatives for pulmonary disease in cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 7, doi: 10.1002/14651858, 2013.

TANG, L. et al. The determination of low molecular-mass thiols with 4-(hydroxymercuric)benzoic acid as a tag using HPLC coupled online with UV/HCOOH-induced cold vapor generation AFS. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 3428-3433, 2009.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 325, p. 63-74, 2006.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, p. 124-135, 2007.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA/THE NATIONAL FORMULARY. Pharmacopoeial convention Rockville, 2008.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis – IUPAC technical report. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, v. 9, p. 128-147, 2007.

TOUSSAINT, B. et al. Quantitative analysis of n-acetylcysteine and its pharmacopeial impurities in a pharmaceutical formulation by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 896, p. 191-199, 2000.

TRUBIANO, P. C.; KARRAS, A. Delivery system with increased bioavailability. US2004/0247658 A1, 2004.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). Guidance for industry, analytical procedures and methods validation, 2000.

USER MANUAL MASTERSIZER 2000 MALVERN. Integrated systems for particle sizing.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*, v. 25, p. 999-1022, 2008.

VEHRING, R.; FOSS, W. R.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. *Aerosol Science*, v. 38, p. 728-746, 2007.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, v. 70, p. 95-111, 1995.

VOLLHARDT, J.; MALKAN, N.; MANZO, R. P. Process for producing cosmetic and pharmaceutical formulations, and products comprising same. US6387398 B1, 2002.

WEBB, W. R. Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl-cysteine. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 44, p. 330 -343, 1962.

WESSMAN, P.; EDWARDS, K.; MAHLIN, D. Structural effects caused by spray- and freeze-drying of liposomes and bilayer disks. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 2032-2048, 2010.

WIGGENHORN, M. et al. Liposome preparation by single-pass process. WO2008/055628 A1, 2008.

WILLIS, L.; HAYES JUNIOR, D.; MANSOUR, H. M. Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. *Lung*, v. 190, p. 251-262, 2012.

WU, W. et al. Separation and quantification of n-acetyl-L-cysteine and n-acetyl-cysteine-amide by HPLC with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, v. 20, p. 415-422, 2006.

YATVIN, M. B. Liposome drug delivery. WO2003/099261 A1, 2003.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of n-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 6-20, 2003.

ZHANG, L. et al. Biodistribution in mice and severity of damage in rat lungs following pulmonary delivery of 9-nitrocamptothecin liposomes. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 21, p. 239-246, 2008.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug with an interesting past and a fascinating future. *Respiration*, v. 50, p. 26-30, 1986.

ANEXO 1: Validação do método analítico por CLAE para doseamento de N-acetilcisteína nos lipossomas desenvolvidos

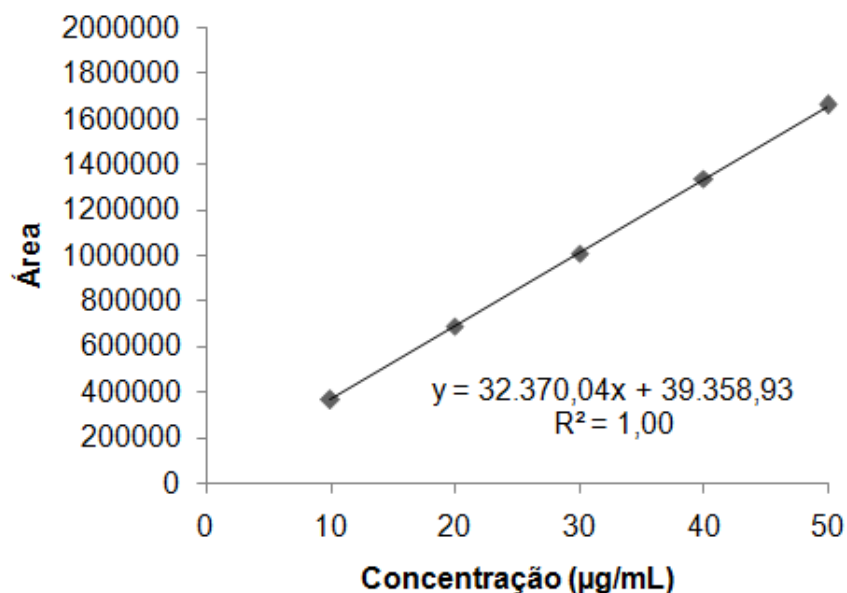
1) Linearidade:

Figura 1. Curva analítica média para quantificação de N-acetilcisteína.

Tabela 1. Regressão linear da curva de N-acetilcisteína (ANOVA).

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	4	3,14351E+12	7,85877E+11	5133,9165	3,48
Regressão linear	1	3,14346E+12	3,14346E+12	20535,3566	4,96
Desvio de linearidade	3	4,73E+07	15782418,72	0,1031	3,71
Resíduo	10	1530755685	153075568,5		
Total	14	3,14504E+12			

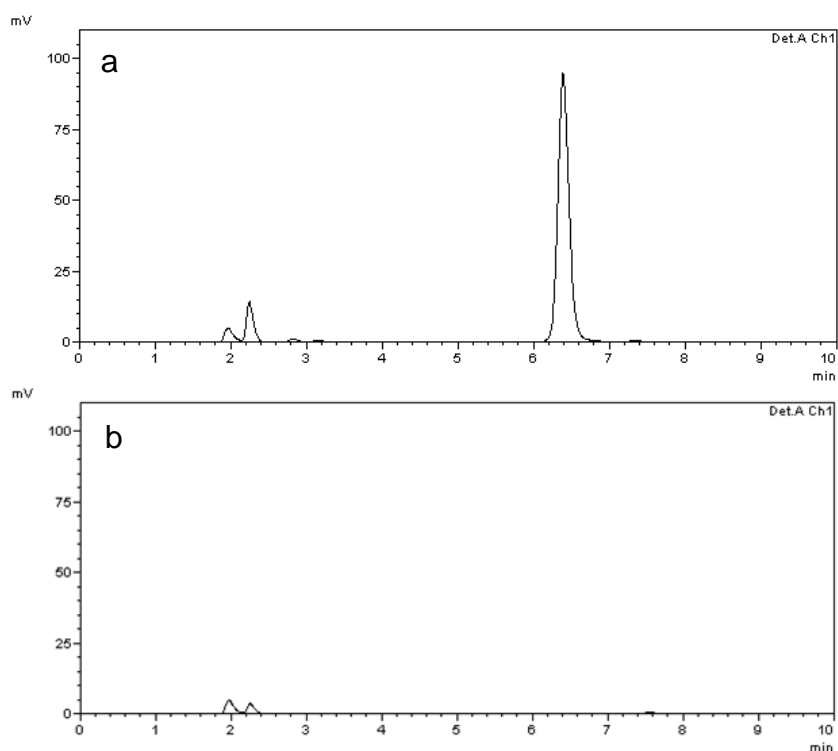
2) Especificidade:

Figura 2. Cromatogramas representativos das análises de amostras de lipossomas contendo N-acetilcisteína (a) e lipossomas sem fármaco (b).

3) Precisão:

Tabela 2. Repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) do método para quantificação de N-acetilcisteína nos lipossomas desenvolvidos.

Parâmetro	<i>N</i>	DPR (%)
Intra-dia	6	0,86
Inter-dia		
Dia 1	3	1,65
Dia 2	3	0,17
Dia 3	3	1,14
Dia1+2+3	9	1,24

ANEXO 2: Perfil de distribuição granulométrica por difração de laser dos lipossomas contendo N-acetilcisteína antes e após o processo de filtração em membranas de 0,45 μm e 0,22 μm

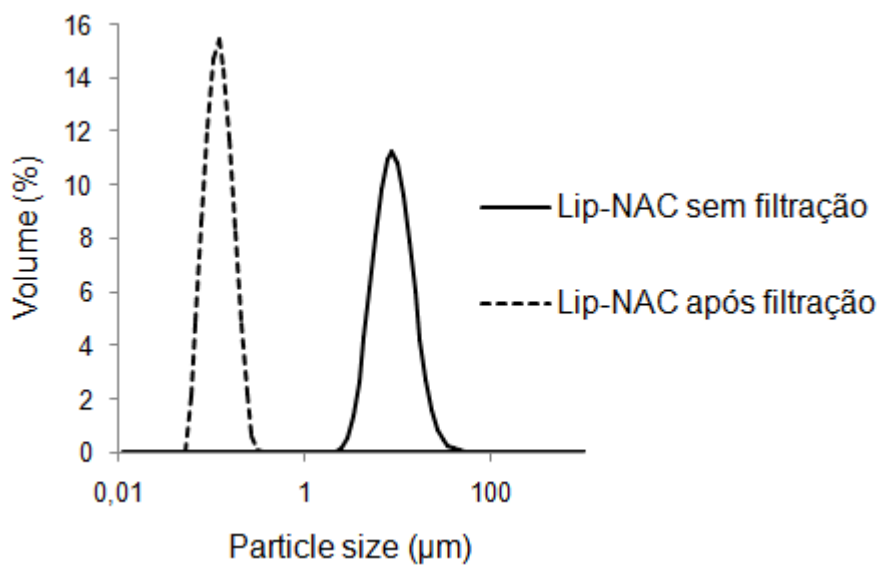


Figura 1. Representação gráfica do perfil granulométrico por difração de laser dos lipossomas contendo N-acetilcisteína (Lip-NAC) antes e após o processo de filtração seqüencial em membranas de poros de 0,45 μm e 0,22 μm .