

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**Desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de
microaglomerados de nanopartículas contendo alfa-bisabolol para o
tratamento de asma**

Greice de Oliveira Ferreira

Porto Alegre, junho de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de
microaglomerados de nanopartículas contendo alfa-bisabolol para o
tratamento de asma**

Greice de Oliveira Ferreira

Orientadora: Prof^o Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres

Coorientadora: Thatiana Ferreira Terroso

Porto Alegre, junho de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Anatomia e fisiologia do sistema respiratório.....	4
3.1.1. Pulmões.....	4
3.1.2. Vias aéreas.....	4
3.2 Asma.....	6
3.2.1 Conceito.....	6
3.2.2 Epidemiologia.....	6
3.2.3 Fisiopatologia.....	7
3.2.4 Diagnóstico.....	9
3.2.5 Classificação.....	10
3.2.6 Tratamento e manutenção.....	10
3.3 Formulações contendo microaglomerados de nanopartículas para administração pulmonar.....	13
3.4 α -Bisabolol.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Matérias-primas.....	18
4.2. Equipamentos.....	18
4.3. Preparação das nanocápsulas	20
4.4. Secagem e formação de microaglomerados por spray drying	20
4.5. Caracterização físico-química das formulações.....	21
4.5.1 Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das nanopartículas.....	21
4.5.2 Determinação do teor de α -bisabolol nas formulações e eficiência de encapsulação	22
4.5.3 Desaglomeração e recuperação das nanopartículas	23
4.5.4 Determinação das características de fluxo dos pós	23
4.5.5 Caracterização morfológica dos microaglomerados.....	24
4.6 Análises <i>in vitro</i>	24

4.6.1	Análise da dispersão e deposição de partículas por impactador em cascata de Andersen.....	24
4.6.2	Liberação <i>in vitro</i>	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1	Caracterização físico-química.....	27
5.1.1	Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das nanopartículas.....	27
5.1.2	Determinação do teor de α -bisabolol nas formulações.....	28
5.1.3	Desaglomeração e recuperação das nanopartículas.....	29
5.1.4	Determinação das características de fluxo dos pós.....	30
5.1.5	Características morfológica dos microaglomerados.....	32
5.2	Análises <i>in vitro</i>	34
5.2.1	Análise da dispersão e deposição de partículas por impactador de cascata de Andersen.....	34
5.2.2	Liberação <i>in vitro</i>	35
6.	CONCLUSÕES	37
7.	PERSPECTIVAS	38
8.	REFERÊNCIAS	39

RESUMO

A asma é considerada um problema de saúde pública. Formulações microparticuladas são opções interessantes no tratamento da asma, pois possuem tamanho adequado para entrega pulmonar profunda e podem carrear fármacos nanoencapsulados. O trabalho objetivou desenvolver um sistema microparticulado contendo nanocápsulas de α -bisabolol (α -B) para administração intrapulmonar. As Nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial do polímero pré-formado. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), lactose e leucina foram os adjuvantes escolhidos para a formação dos microaglomerados (MA), obtidos por *spray drying*. As formulações produzidas, MA α BLac (MA com lactose) e MA α BLeu (MA com leucina) foram caracterizadas quanto ao teor de fármaco presente em cada pó, desaglomeração e recuperação das nanopartículas, propriedade dos fluxos, análise da morfologia por microscópio eletrônico de varredura (MEV), análise do comportamento aerodinâmico via impactador de cascata de Andersen e liberação *in vitro* por diálise. MA α BLac e MA α BLeu obtiveram um teor de 51,85 μ g/mg e 56,11 μ g/mg de pó. Ambos os pós obtiveram um fluxo deficiente. Houve desaglomeração dos microaglomerados e recuperação das nanocápsulas dentro de um tempo de 10 minutos. As formulações apresentaram diferenças morfológicas evidentes quanto à forma e superfície. Na avaliação da deposição por impactador, os MA α BLeu (dose emitida de 1008 μ g e FPF de 51%) demonstraram ter um comportamento aerodinâmico mais adequado quando comparado aos MA α BLac (dose emitida de 276 μ g e FPF de 42%). Na diálise, o perfil de liberação foi modelado segundo a equação monoexponencial para ambas as formulações, tendo o MA α BLeu apresentado uma liberação do fármaco significativamente mais controlada ($p=0,0023$) que o MA α BLac. Concluindo, os microaglomerados desenvolvidos apresentaram características viáveis para administração intrapulmonar, entretanto, testes adicionais deverão ser realizados para confirmar os resultados obtidos nesse estudo.

Palavres chaves: asma, microaglomerado, nanocápsulas, α -bisabolol, *spray drying*

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma patologia mundialmente considerada como problema de saúde pública, devido à alta prevalência e custos socioeconômicos gerados com seus diversos tratamentos (WHO, 2008). Ela afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo, principalmente crianças. Esta doença se caracteriza pela inflamação crônica das vias aéreas devido à hiperresponsividade gerada frente a fatores específicos. Os sintomas relacionados são episódios recorrentes de sibilos (ruído característico nos pulmões), dispneia, opressão torácica e tosse, todos decorrentes da obstrução do fluxo aéreo, que pode ser reversível de maneira espontânea ou farmacológica. Outro aspecto que deve ser ressaltado é o remodelamento brônquico relacionado à inflamação brônquica e ao prognóstico da doença (Global Initiative for Asthma - GINA, 2014; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012).

A fim de avaliar a incidência e variações da asma em crianças e adolescentes (por acometer principalmente tal faixa etária), um estudo multicêntrico denominado *International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC)* foi realizado. Este estudo foi desenvolvido em diversos países com algumas variações (Fase I, Fase II) e utilizou metodologia padronizada objetivando: estabelecer e descrever a prevalência e a gravidade da asma; obter medidas de linha de base e fornecer um enquadramento da influência etiológica, genética, estilo de vida entre outros fatores que afetam a doença (Asher *et al*, 1995). Nos 56 países avaliados, houve uma prevalência média de 11,6% em crianças em idade escolar e 13,7% em adolescentes. Na lista dos países que mais apresentam essa patologia, o Brasil ocupa o 8º lugar, apresentando uma prevalência de 20% (Steering Committee ISAAC, 1995), sendo essa a quarta causa de internação em indivíduos adultos jovens (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012).

O tratamento da asma envolve medidas ambientais que objetivam evitar exposição à alérgenos e farmacoterapia ou imunoterapia, para redução da inflamação brônquica e sensibilidade alérgica. Os medicamentos são escolhidos segundo a gravidade da doença e são usados para alívio das crises e controle da patologia. Entre os medicamentos utilizados, encontram-se os corticoides (principalmente inalatórios), os broncodilatadores de longa duração, a aminofilina, os antileucotrienos e, mais raramente, o cromoglicato. Para o tratamento das

crises, utilizam-se os corticoides sistêmicos (via oral ou intramuscular), os broncodilatadores (via pulmonar) e as aminofilinas (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012). Entretanto, em casos mais graves de asma, o tratamento existente não é suficiente para que o indivíduo mantenha uma rotina normal com boa qualidade de vida. Além disso, estes medicamentos, quando usados cronicamente, podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis, como no caso dos corticoides. Entre eles, os mais comuns são aumento da pressão sanguínea, glaucoma, retenção de fluidos, ganho de peso, diabetes tipo II, osteoporose, aumento no risco de infecções, entre outros (Fuchs, 1998).

Entre as vias de administração utilizadas para o tratamento da asma (oral, pulmonar, intravenosa), a administração de fármacos pela via pulmonar apresenta muitas vantagens em relação às demais. Os pulmões apresentam grande superfície alveolar, pequena espessura epitelial e extensa vascularização. Além disso, possuem enzimas com atividade proteolítica limitada, que reduz a degradação de fármacos e aumenta sua disponibilidade (Courrier *et al*, 2002). Como os fármacos são entregues diretamente no órgão alvo, possibilita redução de dose e rápido início de ação. Paralelamente, evita o metabolismo de primeira passagem e efeitos secundários decorrentes da exposição a altas doses do medicamento.

Nesse contexto, muitos trabalhos na literatura apontam formulações microparticuladas como uma opção para o desenvolvimento de formas farmacêuticas para a administração pulmonar de fármacos. Através desses sistemas é possível obter um diâmetro aerodinâmico adequado para administração pulmonar (0,5 - 5 μm), adicionalmente, podem servir como veículo de transporte para administração de tecnologias farmacêuticas mais avançadas como as nanopartículas. Fármacos nanoencapsulados possuem uma liberação mais controlada, melhor biodisponibilidade e estabilidade, além disso, possuem uma melhor penetração no epitélio pulmonar e conseguem escapar dos mecanismos de defesa gerados perante a uma partícula estranha (Sung, *et al* 2007, Kleinstreuer *et al*, 2008).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta como objetivo desenvolver um sistema microparticulado (microaglomerados) contendo nanocápsulas de α -bisabolol para administração intrapulmonar, almejando o tratamento da asma.

3. REVISÃO

3.1 Anatomia e fisiologia do sistema respiratório

3.1.1 Pulmões

Os pulmões são dois órgãos localizados na caixa torácica (via aérea inferior) que tem como função primária a troca de gases, que consiste na entrada de oxigênio no organismo e remoção de gás carbônico e manutenção de homeostasia corporal. O pulmão direito localiza-se no hemitórax direito e possui três lobos (lobo superior direito, lobo médio direito e lobo inferior direito). O pulmão esquerdo tem um tamanho inferior devido à presença do coração, portanto, divide-se em dois lobos: lobo superior esquerdo (inclui língula e lobo homólogo do lado superior direito) e lobo inferior esquerdo. Ambos os pulmões são recobertos pela pleura visceral, enquanto a pleura parietal recobre hemitórax, diafragma e o mediastino (Berne *et al.*, 2004) .

3.1.2 Vias aéreas

O sistema respiratório é constituído por trato respiratório superior (vias aéreas superiores), o qual compreende todos os órgãos fora da caixa torácica ou acima da glote - nariz externo, cavidade nasal, faringe, laringe e parte superior da traqueia; e trato respiratório inferior (vias aéreas inferiores), que consiste em órgãos localizados na cavidade torácica - parte inferior da traqueia, brônquios, bronquíolos, alvéolos e pulmões (Figura 1).

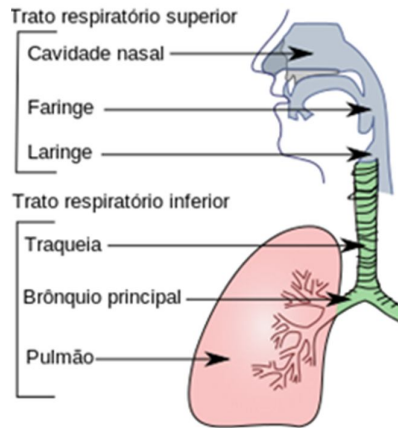


Figura 1: Divisão esquemática trato respiratório (Adaptado de Alcamo, 2003)

O sistema traqueobronquial inicia a partir da traqueia e, à medida que as vias aéreas se dividem e penetram mais profundamente no pulmão, tornam-se mais estreitas, curtas e numerosas. A traqueia se divide na carina (bifurcação da traqueia que se assemelha a uma “quilha” de barco) em brônquios principais direito e esquerdo, que originam brônquios lobulares e se ramificam em brônquios segmentares. A divisão continua seguindo um padrão dicotômico até formarem bronquíolos terminais, os quais se caracterizam por serem as menores vias aéreas sem alvéolo. Estes elementos formam a chamada zona de condução de ar. A zona respiratória (Figura 2) contém os bronquíolos respiratórios (terminação dos bronquíolos terminais) que se segmentam em dutos alveolares e alvéolos, também chamados de lóbulos ou ácinos pulmonares (Berne *et al*, 2004).

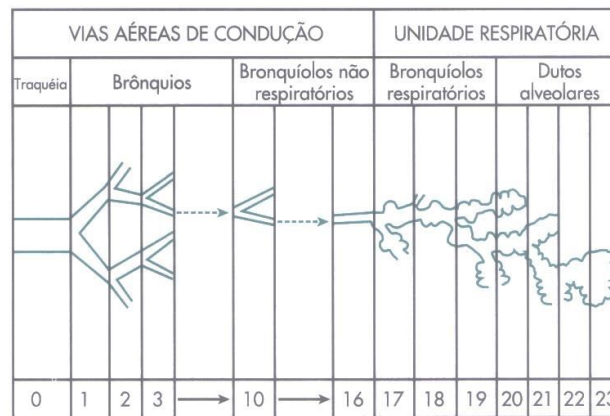


Figura 2: Ramificações das vias aéreas inferiores (Berne *et al*, 2004)

Os pulmões humanos contem aproximadamente 2300 km de vias aéreas e 500 milhões de alvéolos, que abrangem uma área superficial de aproximadamente 75 – 140 m² em indivíduos adultos (Yang *et al*, 2008). As vias aéreas são recobertas por epitélio pseudoestratificado cuja espessura varia conforme se avança na árvore traqueobrônquica. O epitélio pulmonar na traqueia tem de 50 a 60 µm de espessura e representa uma barreira na absorção de partículas para a corrente sanguínea. Essa espessura vai diminuindo, chegando a 0,5 a 1 µm nos alvéolos, tendo estes uma superfície entre 43 - 100 m², fornecendo uma extensão altamente vascularizada, permitindo acesso à circulação sistêmica. O contato íntimo entre alvéolos e capilares alveolares permite que a troca de gases entre ar e sangue ocorra efetivamente (Weibel, 1963; Weibel e Knight, 1964).

3.2 Asma

3.2.1 Conceito

A asma é, por definição, uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por hiperresponsividade brônquica e por limitação variável ao fluxo aéreo. Pode ser reversível espontaneamente ou por intervenção farmacológica e, o aumento de sua reatividade está associado a vários estímulos. Clinicamente esta doença manifesta-se por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Resulta de uma combinação entre fatores genéticos, exposição ambiental a alérgenos e irritantes, e outros fatores específicos que serão determinantes na fisiopatologia e no prognóstico da doença (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012).

3.2.2 Epidemiologia

A asma é um problema mundial de saúde e acomete mais de 334 milhões de pessoas no mundo (Global Initiative for Asthma - GINA, 2014), sendo no Brasil uma prevalência estimada de 20 milhões de asmáticos, ocupando 8º lugar no ranking mundial (Silva, 2008). Em 2011 foram registradas pelo Ministério da Saúde 160 mil hospitalizações, dado que colocou a asma como a quarta causa de internações no Brasil (Figura 3). A taxa média de mortalidade no país, entre 1998

e 2007, foi de 2,96/100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2007). O custo direto da asma, incluindo atendimentos na emergência e internações, é muito maior em paciente cuja doença não está controlada. Além disso, o custo aumenta conforme a severidade da doença. (Santos *et al*, 2007). Em um estudo realizado por Franco e colaboradores (2009), observou-se que, pacientes com a doença sob controle, obtiveram uma redução de 89% nos custos familiares (cálculo feito levando-se em consideração redução de faltas no trabalho, transporte e custos com intervenções terapêuticas).

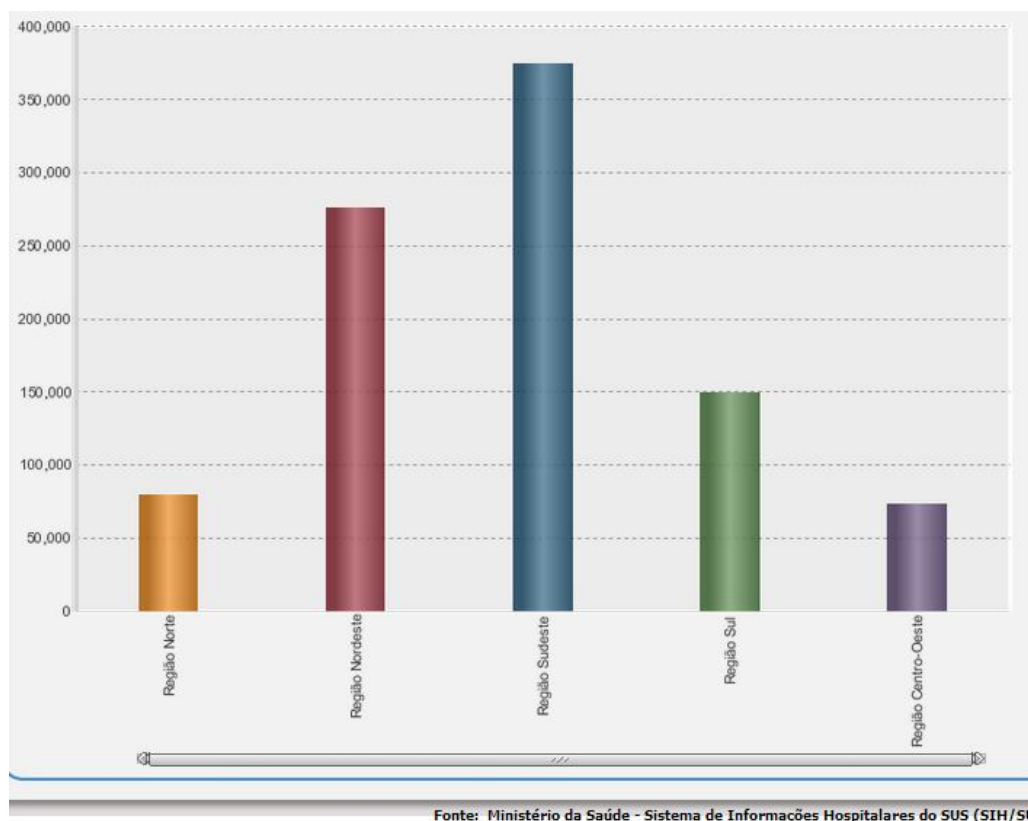


Figura 3: Gráfico representando taxa de internações devido à asma não controlada (Ministério da Saúde, 2007)

3.2.3 Fisiopatologia

Muitos fatores estão associados ao desenvolvimento de asma brônquica, sendo eles fatores ambientais (alérgenos inaláveis, poluentes – fumaça de cigarro e gases de combustão - e alguns vírus respiratórios, como vírus sincicial respiratório – VSR), ocupacionais (cerca de 300 substâncias identificadas como

responsáveis por 10% das asma iniciadas em idade adulta) e genéticos. Diversos genes candidatos, em diferentes níveis de associação e penetração, têm sido relacionados a fenótipos distintos de asma. Essa grande heterogeneidade fenotípica aliada aos diversos fatores externos podem produzir atuação sinérgica e provocar diferentes tipos de respostas inflamatórias (Silva, 2008).

Entre os genes já identificados como responsáveis à suscetibilidade no desenvolvimento da asma, encontram-se CD14, TLR2, 4, HLA DR (associados a imunidade inata), GATA-3 (associado a atopia e diferenciação Th2), CCL5/RANTES (associado ao epitélio), ADAM-33 (função pulmonar), entre outros. Também são determinantes características como sexo (mais prevalente em crianças do sexo masculino) e doenças de base (obesidade redobra o risco de desenvolver asma) (Silva, 2008).

A inflamação brônquica é a principal característica fisiopatogênica da asma. Oriunda de complexas interações entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas, este fenômeno ocorre em todos os tipos de asma (grave, de início recente e mesmo assintomáticas) (Sociedade Brasileira de Tisiologia e Pneumologia, 2012).

Na asma alérgica, que é a mais recorrente, a resposta inflamatória inicia através da apresentação de alérgenos ambientais aos linfócitos Th2 (Figura 4). Essa exposição provoca alterações imediatas e tardias, provocando inflamação da mucosa e tornando-a hiperreativa a diversos estímulos (Silva e Dias, 2013).

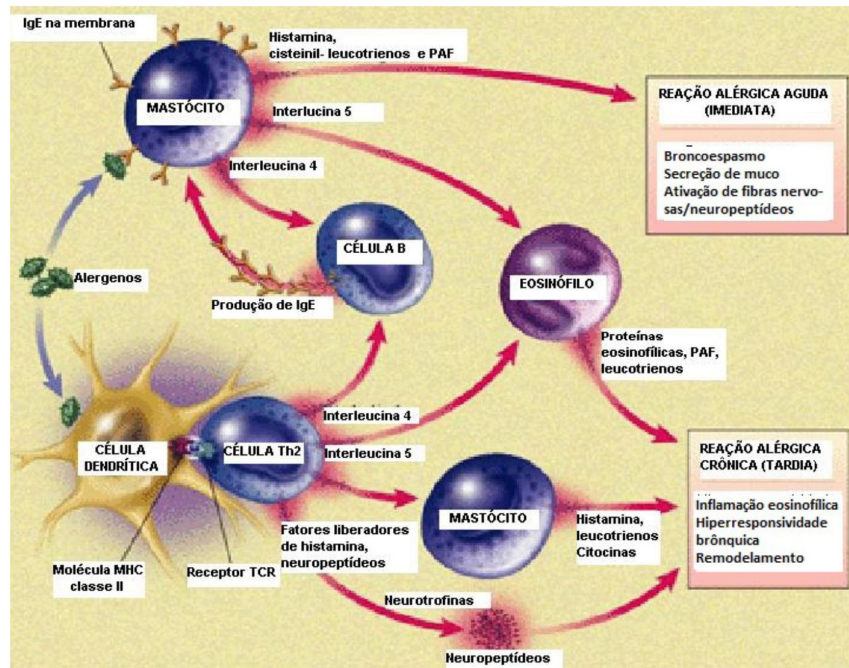


Figura 4: Cascata imunológica da resposta inflamatória na asma alérgica (Silva e Dias, 2013).

Os mediadores liberados pelas células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea, levando a hiperresponsividade brônquica. As lesões nas células epiteliais brônquicas induzem a produção de mediadores que ativam os fibroblastos. Estes se proliferam e sintetizam colágeno, levando a fibrose subepitelial. Adjacente à proliferação ocorre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Estes, junto às células epiteliais, se ativam e proliferam provocando deposição intersticial do colágeno e proteoglicanos na lâmina reticular da membrana basal, contribuindo para o espessamento da mesma (Silva e Dias, 2013; Todo-Bom e Pinto, 2006).

A fibrose subepitelial apresenta-se em todos os tipos de asmáticos, mesmo anterior aos primeiros sintomas, e está correlacionada com o grau de hiperreatividade brônquica a estímulos inespecíficos. Hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, aumento das glândulas e vasos sanguíneos submucosos e degradação dos componentes da matriz extracelular são alterações que podem levar à irreversibilidade da obstrução crônica. Todas as alterações citadas acima

contribuem para o progressivo espessamento da parede brônquica, levando ao remodelamento brônquico e à redução da reversibilidade da obstrução ao fluxo aéreo (Silva e Dias, 2013).

3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da asma inicialmente se dá pela presença de um ou mais sintomas característicos, tais como tosse crônica, sibilância, tosse crônica, opressão ou desconforto torácico, principalmente à noite ou nas primeiras horas da manhã. Variabilidade dos sintomas, agravamento e/ou desencadeamento de manifestações por irritantes inespecíficos (como exercícios físicos) ou alérgenos e melhora espontânea ou após tratamento farmacológico específico sugerem e reforçam esse diagnóstico. A presença de sibilos é indicativa de obstrução ao fluxo aéreo, mas não ocorre em todos os pacientes, o que torna o exame físico do asmático inespecífico (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012).

Apesar dos sintomas clássicos da asma, um método mais conciso deve ser realizado para fins confirmatórios. Os testes diagnósticos disponíveis na clínica incluem espirometria (antes e após o uso de broncodilatador), testes de broncoprovocação (com agentes broncoconstritores – metacolina, histamina e carbacol) e medidas seriadas de pico de fluxo expiratório (PFE) (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012).

A espirometria é o método de escolha porque, além de estabelecer o diagnóstico, permite monitoramento da doença. Através dela é possível obter medidas como medidas de limitação ao fluxo do ar nas vias aéreas: volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e capacidade vital forçada (CVF). Outro parâmetro obtido pela espirometria é a relação VEF1/CVF, também conhecida índice de *Tiffeneau* (Bártholo *et al*, 2013). Quando esta relação está baixa, significa que há limitação ao fluxo aéreo e sugere quadro de asma. O teste de broncoprovocação tem alto valor preditivo negativo e avalia hiperresponsividade brônquica através da inalação de substâncias com efeitos contráteis sobre a musculatura das vias aéreas. Já a avaliação do estado alérgico, se dá por cuidadosa anamnese, testes de sensibilidade cutâneos e medidas séricas de IgE específica (Silva, 2008).

3.2.5 Classificação

A classificação da gravidade tem como objetivo principal determinar a dose de medicamento suficiente para controlar a doença o mais rápido possível. Sua avaliação pode ser feita analisando a frequência e intensidade dos sintomas e pela função pulmonar. Na Tabela 1 estão representados os parâmetros utilizados para a classificação da gravidade da asma. Estima-se que 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou leves, 25-30% moderada e 5-10% grave.

Tabela 1: Classificação gravidade da asma

	Intermitente	Leve	Persistente moderada	Grave
Sintomas	raros	Semanais	diários	diários ou contínuos
Despertares noturnos	raros	Mensais	semanais	quase diários
Necessidade de beta-2	raros	Eventual	diária	Diária
Limitação atividades	nenhuma	presente em exacerbações	presente em exacerbações	Contínua
Exacerbações	raras	afetam atividades e sono	afetam atividades e sono	frequentes
VEF₁ e PFE	> 80% predito	> 80% predito	60-80% predito	<60% do predito
Variação VEF₁ ou PFE	<20%	<20-30%	>30%	>30%

3.2.6 Tratamento e Manutenção

Os tratamentos atualmente disponíveis visam o controle e prevenção de crises e devem ser iniciados conforme os critérios de gravidade apresentados anteriormente. Primeiramente os pacientes necessitam ter completo conhecimento da doença e, junto a seus familiares, ser orientados a respeito dos fatores desencadeantes e a maneira de contorná-los. O objetivo principal da terapia farmacológica é a redução da inflamação, promovendo controle e estabilidade da doença dentro da menor dose possível. A escolha do tratamento deve considerar os mecanismos gerais dos mesmos, a função da medicação, o dispositivo escolhido e a segurança. De acordo com os protocolos, o manejo das asma inicia com a administração de agonistas beta-2 de curta duração, eficaz para asma intermitente. Conforme o agravamento da doença se faz necessário o uso de corticóide, variando sua dose segundo a necessidade. Muitas vezes, o controle da asma só é atingido com a associação de corticoides com agonistas beta-2 de curta duração, beta-agonistas de ação prolongada, antileucotrienos, cromoglicatos, entre outros (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia,

2006). Abaixo estão citados os medicamentos mais prescritos no tratamento da asma.

a) Beta-2 agonistas inalatórios de curta duração (SABA)

São medicamentos usados para alívio dos sintomas agudos gerados em crises ou como terapia preventiva induzida por exercício, pois revertem rápida e eficazmente o broncoespasmo. Atuam em receptores beta-2 adrenérgicos e seu provável mecanismo de ação é através da modulação da adenílciclase, gerando monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e consequente ativação de proteínas quinases (Louie *et al.*, 2013). Como efeito desse mecanismo ocorre o relaxamento brônquico (provocam relaxamento do músculo liso) e a desobstrução do fluxo do ar nas vias aéreas. Também produzem depuração mucociliar e reforço da integridade vascular como efeito direto (Fuchs e Wannmacher, 1998). No Brasil encontram-se disponíveis o salbutamol, fenoterol e a terbutalina. Apresentam efeitos adversos pronunciados como tremores de extremidades, hipocalcemia e arritmias cardíacas (DIRETRIZES, 2006, Campos e Camargos, 2012).

b) Corticoides inalatórios (CI)

Os medicamentos incluídos nesse grupo são a beclometasona, budesonida, ciclesonida, flunisolida, fluticasona, mometasona e triancinolona. Sua ação se dá principalmente via mecanismos moleculares, ativando ou reprimindo a transcrição gênica em processos chamados trans-ativação e trans-repressão. A trans-ativação ocorre no gene receptor beta-2 adrenérgico, no da interleucina (IL-10) e no do inibidor de fator nuclear-kappa beta (NF- κ), com ação anti-inflamatória. Na trans-repressão, atenuam a ação dos fatores de transcrição AP1 e NF- κ , reduzindo a produção de mediadores inflamatórios através da inibição da acetilação das histonas (HAT). Acredita-se que este seja o principal mecanismo, pois na asma, a atividade de HAT está pronunciada e, paralelamente, a desacetilação das histonas diminuída (Rizzo e Solé, 2006).

Os corticóides ainda inibem a transcrição de várias citocinas e quimiocinas proeminentes em doenças pulmonares (IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-8 e eotaxina), não só pelo bloqueio de sua síntese, mas também de seus efeitos através da inativação de receptores (IL-2, por exemplo). Como efeito adjacente, observa-se também a diminuição da sobrevivência de eosinófilos e linfócitos T (Oliveira, 2006; Rizzo e Solé, 2006).

Utilizado tanto em adultos como em crianças, é o principal medicamento usado para manutenção, profilaxia e efeito anti-inflamatório e, além de reduzir frequência e gravidade das crises, diminui também o número de hospitalizações e atendimentos em serviços de emergência. Devido seu mecanismo de ação ser em nível molecular, leva em torno de duas semanas para ocorrer melhora da função pulmonar e controle dos sintomas. A reversão da hiperresponsividade brônquica pode ser melhorada com um uso contínuo e duração de meses a anos (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2006).

Apesar da melhora e reversão do quadro da asma, esses medicamentos apresentam efeitos colaterais sistêmicos quando altas doses são usadas por muito tempo. Entre os efeitos observados podemos citar a perda de massa óssea, inibição do eixo hipotálamo-hipófise, hipertensão, edema e déficit de crescimento, hipocalcemia, glaucoma e diabetes. Candidíase oral, disfonia e tosse crônica podem acometer indivíduos que utilizem qualquer dose de CI (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2006; Rizzo e Solé, 2006; Oliveira, 2006).

c) Beta-agonistas de ação prolongada (LABA)

Os LABAs atuam em receptores beta-2 adrenérgicos e seu provável mecanismo de ação é através da modulação da adenililciclase, gerando monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e consequente ativação de proteínas quinases (Louie *et al.*, 2013). Como efeito desse mecanismo ocorre o relaxamento brônquico (provocam relaxamento do músculo liso) e a desobstrução do fluxo do ar nas vias aéreas. Também produzem depuração mucociliar e reforço da integridade vascular como efeito direto (Fuchs e Wannmacher, 1998).

Os representantes desta classe disponíveis no Brasil são salmeterol e formoterol. São utilizados em associação aos CIs em pacientes acima de 4 anos com intuito de obter um controle mais rápido das crises de asma. A monoterapia deve ser evitada. Produz comumente efeitos adversos como estímulo cardiovascular, tremores de extremidades e hipocalcemia (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2006; Souza-Machado *et al.*, 2012).

d) Antileucotrienos

Os leucotrienos (LT) são sintetizados a partir do ácido araquidônico e podem ser divididos em dois grupos: ácidos dihidroxi (LTB₄), potente quimiotático de neutrófilos, e os cisteínicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄), potentes quimiotáticos de

eosinófilos e broncoconstrictores. Os antagonistas de receptores de leucotrienos agem bloqueando a ligação dos LT cisteínicos (zafirlucaste, montelukaste, pranlucaste) ou impedindo a síntese dos LTs através da inibição da 5-lipoxigenase (zileuton) (Campos, 2005). Dessa forma, a produção de LT por mastócitos, eosinófilos e basófilos fica prejudicada com conseguinte diminuição da broncoconstrição e secreção de muco. São usados na terapia de manutenção de asma leve ou associados aos CI. Raramente produzem efeitos adversos (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2006).

3.3 Formulações contendo microaglomerados de nanopartículas para administração pulmonar

A administração de medicamentos através da via pulmonar tem sido uma opção emergente no tratamento de doenças respiratórias por ser uma abordagem não invasiva que pode ter ação local e sistêmica. Esta via tem se tornado cada vez mais interessante porque apresenta vantagens como: a rápida deposição do fármaco no pulmão, evitando a circulação de altas doses na circulação sistêmica (Marianecchi *et al.* 2011); rápido início de ação do fármaco; diminuição de efeitos colaterais, devido a menor exposição sistêmica e eliminação do metabolismo de primeira passagem, visto que os pulmões possuem quantidades muito baixas das enzimas de metabolização (Yang *et al.*, 2008; Amaro *et al.*, 2011).

Um dos parâmetros mais importantes a ser considerado no desenvolvimento dessas formulações é o tamanho da partícula (Hinds, 1999; De Boer *et al.*, 2002). O destino da partícula também será definido por seu diâmetro aerodinâmico, que pode ser encontrado através da Equação 1, em que D_{geo} é o diâmetro geométrico da partícula, p é a densidade da partícula, e pa é a densidade da água ($1g/cm^3$) (Tsapis *et al.*, 2002; Pilcer e Amighi, 2010, Son *et al.*, 2013).

$$D_{ae} = D_{geo} \sqrt{p/pa} \quad \text{Equação 1}$$

Os principais mecanismos de deposição da partícula no trato respiratório são impacto inercial, sedimentação ou difusão browniana (Courrier *et al.*, 2012). Este processo também depende de outras características da partícula (como

tamanho, forma e densidade) e do padrão de respiração do indivíduo (determinará o tempo médio de permanência nas vias respiratórias (Heyder, 1985; De Boer *et al.*, 2002). A impactação ocorre em partículas maiores que 5 μm , principalmente na região extratorácia ou próximas à bifurcação onde a velocidade do fluxo é elevada e ocorrem variações na direção do fluxo de ar. Quando as partículas possuem um diâmetro médio entre 0,5 e 5 μm elas sofrem sedimentação gravitacional nas pequenas vias aéreas condutoras e bronquíolos, onde a velocidade do ar é baixa, logo não são ingeridas nem exaladas. Partículas submicrométricas (menores que 0,5 μm) alcançam a região alveolar e sofrem deposição por difusão browniana através do movimento aleatório das moléculas de ar. Entretanto, essas partículas são facilmente expelidas no momento da expiração (Pilcer e Amighi, 2010; Amaro *et al.*, 2011; Pilcer *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

Uma vez aspiradas e depositadas, as partículas precisam driblar os mecanismos de defesa dos pulmões para que não sejam removidas. Estes incluem barreiras mucosas e enzimas catabólicas na região traqueobrônquica e macrófagos na região alveolar. O *clearance* mucociliar é responsável por eliminar poeira e microorganismos do pulmão através do movimento rítmico e constante dos cílios, que movem o muco em direção às vias aéreas proximais, onde é deglutido ou expectorado. As partículas sedimentadas tem um tempo de residência de aproximadamente 24 horas (Schans, 2007). Após atingir os pulmões, as partículas devem se dissolver para que o fármaco atinja a corrente sanguínea. Entretanto, partículas muito grandes dissolvem-se muito lentamente e se sujeitam à fagocitose por macrófagos alveolares (Heyder, 1985; Patton e Byron, 2007). Em contrapartida, partículas nanométricas conseguem escapar do *clearance* mucociliar, provavelmente devido ao seu rápido deslocamento para o epitélio das vias respiratórias (Schurch *et al.*, 1990).

As nanopartículas podem ser definidas como sistemas coloidais que apresentam diâmetros inferiores a 1 μm e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural (nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, entre outros) (Schaffazick *et al.*, 2003; Guterres *et al.*, 2007). Além disso, ainda apresentam vantagens como liberação controlada do fármaco no tecido pulmonar, melhora da biodisponibilidade do fármaco pelo aumento da estabilidade deste nos fluídos biológicos e possibilidade de diminuição da dose. Conseqüentemente, o

nanoencapsulamento promove melhor adesão farmacológica e diminuição de efeitos adversos provocado pelo uso de doses excessivas do fármaco (Kumar, 2000; Couvreur *et al.*, 2002).

A fim de contornar a problemática da administração de nanopartículas via pulmonar (tamanho inadequado para uma entrega pulmonar profunda, entretanto, ideal para entrega de fármacos a nível local para tratamento de doenças respiratórias), têm-se utilizado como estratégia o desenvolvimento de sistemas microparticulados como veículo de transporte. Micropartículas são definidas como partículas inorgânicas, orgânicas ou mistas, com diâmetros que variam de 1 a 1000 μm . Apresentam como principais características a grande área superficial, uniformidade de conteúdo, tamanho e volume pequeno. Uma micropartícula com diâmetro aerodinâmico entre 1 e 5 μm apresenta melhores resultados nas propriedades de dispersão, evita sua expulsão pela respiração, entretanto, não é capaz de se difundir no epitélio pulmonar como as nanopartículas (Kumar, 2000; Sung *et al.*, 2007).

Nesse contexto, têm sido estudados sistemas para entrega de drogas via pulmonar que combinam vantagens de micropartículas, aliadas às nanopartículas, objetivando contornar as limitações apresentadas por ambas. A produção de um sistema de transporte refere-se à ideia de compostos nanoestruturados subjacentes se unindo para formar micropartículas. Este raciocínio de “aglomerados de nanopartículas”, originou o desenvolvimento de formulações de partículas de tamanho nanométrico (contendo fármacos veiculados em seu interior) inseridas em microaglomerados contendo diâmetro aerodinâmico desejado (El-Gendy *et al.*, 2011). Através de métodos como secagem por aspersão (*spray-drying*) - sob condições de processo controladas - é possível obter sistemas pulverizados (inaladores de pós secos – IPS) contendo aglomerados porosos de tamanho micrométrico, unidos às nanopartículas e mantidos juntos por forças físicas fracas, como a de *van der waals*. Os IPS estão entre as alternativas estudadas mais convenientes, pois dispensam o uso de propulsores (Courier *et al.*, 2002; Pilcer e Amighi, 2010).

Em geral, esse processo gera partículas micronizadas muito coesas e com fluxos deficientes. Em virtude disso, a matriz da micropartícula transportadora pode ser constituída apenas de nanopartículas ou, ainda, podem ser adicionados

excipientes farmacêuticos inertes (aminoácidos, açúcares, fosfolípidos, entre outros). Estudos indicam que o uso destes veículos é capaz de melhorar a estabilidade química e física, assim como propriedades aerodinâmicas e a mecânica de dissolução e permeação (Pilcer e Amighi, 2010).

Por fim, é importante ressaltar que estes agregados porosos de nanopartículas possuem as mesmas propriedades físicas de entrega de micropartículas. Contudo, após a deposição e exposição aos fluídos de revestimento do pulmão, a matriz se desassocia, desaglomerando-se e liberando as nanopartículas. As características das partículas nanométricas desaglomeradas, previamente descritas ao decorrer do texto, mantêm-se íntegras durante e após o processo, permitindo, dessa forma, a liberação do fármaco contido nas mesmas no local de ação desejado e a consequente ação farmacológica esperada.

Como já citado anteriormente, uma das técnicas disponíveis para a produção de micropartículas, encontra-se a secagem por pulverização (*spray drying*). Trata-se de um processo que ocorre em uma única operação onde um líquido é atomizado por uma corrente de gás inerte em um contato térmico para instantaneamente se obter um pó. As partículas secas são separadas através de um ciclone (Sham *et al.*, 2003; Pilcer e Amighi, 2010). As principais operações deste processo de secagem por aspersão são atomização – fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial; secagem – transferência de calor devido ao contato com corrente de ar aquecido; e separação – evaporação do solvente e formação da partícula sólida (Wang *et al.*, 2012). Nesta última etapa, o produto de secagem é transportado por uma corrente de ar para ser, posteriormente, coletado.

Muitos parâmetros podem influenciar o produto resultante antes e durante a operação. A escolha dos adjuvantes ideais, previamente à secagem garantem estabilidade química e diminuição da aderência das partículas na câmara de secagem (Oliveira e Petrovick, 2010). Durante a operação, as variáveis que devem ser consideradas são temperatura de entrada e saída, umidade, fluxo e tempo de permanência no ciclone (Pilcer e Amighi, 2010). Estes fatores serão determinantes no tamanho final da partícula, densidade e teor de solvente

residual (Amaro *et al*, 2011). Entre as vantagens apresentadas por esta técnica, destacam-se o controle da uniformidade e tamanho das partículas; rapidez; a produção de partículas com morfologia esférica (permitindo rápida dissolução devido à grande área superficial) e baixo custo (Oliveira e Petrovick, 2010). O controle destes parâmetros garante a otimização de características como forma, morfologia, densidade, capacidade de dispersão (Pilcer e Amighi, 2010).

3.4 Alfa-bisabolol

Isolado pela primeira vez de flores da camomila (*Matricaria chamomilla*), por Isaac e colaboradores, em 1951, o α -(-) bisabolol é um álcool sesquiterpênico monocíclico amplamente utilizado em formulações cosméticas (Kamatou e Viljoen, 2009). Também conhecido como levomenol, está presente em uma variedade de plantas, podendo ser obtido por hidrodestilação. Dentre as fontes deste óleo podemos citar a camomila alemã (*Matricaria chamomilla*) e a sálvia (*Salvia runcinata*) que contém entre 50 e 90% de α -bisabolol, respectivamente (Jakovlev *et al.*, 1969; Viljoen *et al.*, 2006). Outra fonte pouco explorada é a madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*) que pode apresentar até 85% do óleo (De Souza *et al.*, 2008).

O α -bisabolol, também conhecido como alfa 4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclo-hexeno-1-metanol (Figura 5), com a fórmula química $C_{15}H_{26}O$, tem fraco odor floral e adocicado. Ele é um líquido incolor de densidade relativamente baixa (0,93 mg/mL) e um ponto de ebulição de 153 °C a 12 Torr. Trata-se de uma substância praticamente insolúvel em água e muito solúvel em etanol (Madhavan, 1999).

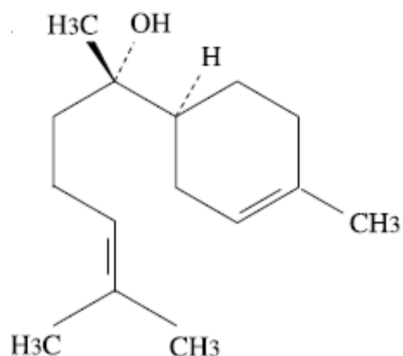


Figura 5: Estrutura molecular do alfa-bisabolol (Kamatou, *et al*, 2010)

É um composto altamente lipofílico com grande tendência à oxidação. Apresenta dois produtos principais de oxidação (dois óxidos de bisabolol) e, ambos apresentam reduzida atividade anti-inflamatória em relação ao α -bisabolol (Jakovlev *et al.*, 1979; Waleczek *et al.*, 2003).

Possui várias propriedades biológicas como atividade antibiótica, com ação comprovada em bactérias gram-positiva e *Candida albicans* (Duke *et al.*, 2002). Além disso, também é amplamente conhecido por sua ação anti-inflamatória (Jakovlev *et al.*, 1969) por provável inibição da síntese de leucotrienos (Berry, 1995) e por atuar inibindo a 5-lipoxigenase (5-LOX) (Baylac *et al.*, 2003).

Esse mecanismo de ação apresentado pelo alfa-bisabolol torna-se interessante para o uso no tratamento da asma. Nessa patologia um contato com o alérgeno induz a liberação de mediadores de inflamação como leucotrienos, os quais são eicosanoides derivados da via mediada pela enzima lipooxigenase. Em conjunto com granulócitos e monócitos ativam e atraem células inflamatórias à parede brônquica. Além disso, ocorre infiltração eosinofílica, lesão intersticial e epitelial das vias aéreas e ativação de linfócitos Th2 (que produz citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, entre outros), promovendo aumento e exacerbação do processo inflamatório (Abbas, 2007).

Devido a isso, algumas das estratégias de terapia medicamentosas visam o uso de agentes capazes de bloquear a ação dos leucotrienos, reduzindo a broncoconstrição e a secreção de muco. Logo, o alfa-bisabolol pode ser utilizado como um ativo natural com capacidade para redução da atividade inflamatória na asma.

Entre outros usos terapêuticos desse ativo, estudos ainda relatam sua capacidade de inibir a expressão gênica das tirosinases, diminuindo hiperpigmentação através da diminuição dos níveis de cAMP intracelular (Kim *et al.*, 2008). Além dessas características, o α -bisabolol ainda apresenta grande habilidade de melhorar a capacidade de permeação transdérmica de fármacos na pele (Kadir & Barry, 1991).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

- α -bisabolol (alfa-bisabolol natural – Fagron);

- Hidroxipropilmetilcelulose (methocel® k-100) (Colorcon);
- Lactose pulmonar (Lactohale – LH 201) (DFE pharma);
- Leucina (L-leucina USP) (Deg);
- Polissorbato 80 (Monooleato de sorbitano 20 moles de óxido de etileno, Tween 80®, EHL = 15,0) (Delaware).
- Poly(ϵ -caprolactona) (PCL) (Mw=65,000) (Aldrich);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60®, EHL = 4,7) (Sigma).

4.2 Equipamentos

- Balança analítica – Denver APX200;
- Mastersizer® 2000, Malvern
- Evaporador Rotatório – Büchi;
- Volúmetro de compactação (Eberhard Bauer D-7300) (Esslinger)
- Microscópio eletrônico de varredura *Jeol Scanning Microscope JSM-6060*, Tóquio, Japão
- Mini Spray Dryer – Buchi B-290
- Impactador de Andersen (ACI-DPI, Apparatus D European Pharmacopoeia, Copley Scientific Limited, Germany)

Os demais reagentes e solventes utilizados apresentavam grau analítico ou farmacêutico.

4.3 Preparação das Nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado conforme método proposto por Fessi e colaboradores (1989). Inicialmente solubilizou-se o polímero Poli(ϵ -caprolactona) e o monoestearato de sorbitano em acetona sob agitação magnética constante e temperatura de 40°C. Após solubilização completa adicionou-se o α -bisabolol (cuja concentração final da formulação foi de 16 mg/mL), previamente pesado em ependorfe e transferido solubilizando-o em etanol. Separadamente, pesou-se o polissorbato 80 e adicionou-se água ultrapura. Após a solubilização de ambas as fases, verteu-se a fase orgânica sobre a fase aquosa através de um funil, mantendo agitação constante. Em seguida, procedeu-se à evaporação da suspensão em evaporador rotatório, eliminando a acetona e o excesso de água à

pressão reduzida. O volume final foi ajustado a 25 mL. As quantidades de matéria-prima utilizada encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Composição da formulação de nanocápsula polimérica

Fase orgânica	
Poli(ϵ -caprolactona)	0,25g
Monoestearato de sorbitano	0,095g
α -bisabolol	0,4g
Acetona	60mL
Etanol	7,5mL
Fase Aquosa	
Polissorbato 80	0,1925g
Água	133mL

4.4 Secagem e formação dos microaglomerados por *spray drying*

Foram preparados quatro tipos de microaglomerados que se diferenciavam pela presença de fármaco encapsulado ou livre e quanto à escolha do segundo adjuvante de secagem usado. Os adjuvantes de secagem escolhidos foram a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), que foi mantida em todas as formulações, em combinação com lactose ou leucina. Estes foram usados em uma proporção de 3:1 (3 g de HPMC e 1g de lactose ou leucina). Os pós produzidos foram nomeadas como MA α BLac (microaglomerado de lactose contendo alfa-bisabolol nanoparticulado), MA α BLEu (microaglomerado de leucina contendo alfa-bisabolol nanoparticulado), MA α BLacLivre (microaglomerado de lactose contendo alfa-bisabolol livre) e MA α BLEuLivre (microaglomerado de leucina contendo alfa-bisabolol livre).

Para a produção dos microaglomerados pesou-se 3 g de HPMC e solubilizou-se em 200 mL de água gelada com auxílio de agitador em hélice. Reservou-se esta dispersão em geladeira por aproximadamente 24 horas. Para preparação tanto de leucina quanto lactose, pesou-se 1 g de cada e solubilizou-se em aproximadamente 20 mL de água. Como a leucina é um adjuvante de difícil solubilização, também foi mantida sob constante agitação em agitador de hélice até completa solubilização.

Para dar início ao processo, misturou-se a formulação de nanocápsulas de α -bisabolol (25 mL), a solução de HPMC e a solução de lactose ou leucina, para fins comparativos. Utilizou-se o Mini Spray Dryer – Buchi B-290, e os parâmetros usados para realização da operação de secagem foram: temperatura de entrada do ar de 120 °C, aspiração de 100%, fluxo da bomba de 15%. O pó resultante foi coletado e armazenado para posterior caracterização.

Para fins comparativos, preparou-se, também, pós contendo os mesmos adjuvantes, porém com fármaco livre. Para isso foi feita uma emulsão contendo as mesmas quantidades de alfa-bisabolol (0,4 g) e polissorbato 80 (0,4 g) em 25 mL de água. Essa mistura foi vigorosamente agitada e misturada aos demais componentes (adjuvantes de secagem que foram usados na mesma proporção citada anteriormente).

4.5 Caracterização físico-química

4.5.1 Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das nanopartículas

O diâmetro das suspensões de nanocápsulas e a polidispersão destas foram determinados por difratometria de laser (Mastersizer® 2000, Malvern) e espalhamento luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS, Malvern).

Para análises de difratometria de laser, as amostras foram acondicionadas no compartimento de dispersão de líquidos, contendo água destilada, a temperatura ambiente até obtenção da obscuração necessária. Previamente às análises foi realizada a medida de fundo (*backscattering*) apenas com água. Realizou-se uma média de três leituras repetidas, usando um espectro compreendido entre 0,02 e 2000 μm . O parâmetro utilizado para esta medida foi o diâmetro médio baseado no volume (D[4,3]). Realizou-se as medidas dos diâmetros de partículas que correspondessem a 10%, 50% e 90% da população [d (0.1), d (0.5) e d(0.9), respectivamente]. Com esses valores foi possível determinar a dispersão granulométrica (*Span*), encontrado pela Equação 3 (Fontana *et al*, 2013).

$$Span = \frac{(d_{0,9} - d_{0,1})}{d_{0,5}} \quad \text{Equação 3}$$

Para as análises por espalhamento de luz dinâmico, as amostras foram preparadas diluindo-se 20 µL da formulação em 10 mL de água ultrapura (diluição de 500 vezes) previamente filtrada em filtro 0,45 µm (Millipore Millex-HP). Através desta técnica foram determinados o diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI).

4.5.2 Determinação do teor de α -bisabolol nas formulações e eficiência de encapsulação

Para a quantificação do α -bisabolol, pesou-se 10 mg de cada pó e solubilizou-se em 10 mL de acetonitrila, deixando por 40 minutos em ultrassom. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e diluiu-se em mais 10 mL de acetonitrila. Filtrou-se a solução final (Millipore® 0,45 µm) e injetou-se em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). A fase móvel utilizada foi de acetonitrila/água (60:40 v/v) com pH 4,5. Utilizou-se um fluxo de 1,0 mL/min, comprimento de onda de 207 nm e uma coluna Nova-Pak C-18 (150 mm, 4.9 mm, 4 µm– Waters). O tempo de retenção para detecção do fármaco foi de 11 minutos. Realizaram-se curvas padrão de α -bisabolol em acetonitrila com concentrações variando de 2 – 25 µg/mL, com coeficientes de correlação linear maiores que 0,99. O método em HPLC foi previamente validado de acordo com o ICH (2005).

O teor de alfa-bisabolol presente no pó foi expresso em µg/mg (micrograma de fármaco por miligrama do pó formado). A eficiência de encapsulação (EE) do fármaco foi calculada através da Equação 2.

$$EE = \frac{\text{Concentração do fármaco presente no pó}}{\text{Concentração teórica do pó}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.5.3 Desaglomeração e recuperação das nanopartículas

A fim de observar o processo de desaglomeração das partículas primárias e a liberação das nanocápsulas dos microaglomerados, avaliou-se ao longo do tempo o diâmetro de partícula e a polidispersão (*Span*) das formulações. Para isso, utilizou-se a técnica de difratometria de laser por via úmida (em água) (Malvern Instruments, Reino Unido).

Para esta análise, as amostras foram adicionadas em quantidade suficiente para atingir uma obscuração entre 2 e 8% no equipamento. Utilizou-se o mesmo parâmetro, D[4,30], para conferir o diâmetro antes e após o processo e o span, já mencionado anteriormente, para análise da distribuição granulométrica.

4.5.4 Determinação das características de fluxo dos pós

A densidade dos pós foi medida em volúmetro de compactação (Eberherd Bauer D-7300, Esslinger). Inicialmente pesou-se o pó de HPMC e lactose e o pó de HPMC e leucina, anotando-se os respectivos pesos. Transferiram-se os mesmos para uma proveta que foi inserida no equipamento e submetida a repetidas séries de 10, 500 e 1250 batidas, anotando-se o volume final. Com os valores obtidos, calculou-se a densidade compactada (volume obtido após 1250 batidas/massa), assim como o Fator de Hausner (FH) e o Índice de Compressibilidade de Carr (IC) conforme as Equações 4 e 5, respectivamente.

$$FH = \frac{\text{Densidade compactada } (Dc)}{\text{Densidade bruta } (Db)} \quad \text{Equação 4}$$

$$IC = \{Dc - Db\} / Dc \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.5.5 Caracterização morfológica dos microaglomerados

A análise morfológica das partículas foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol Scanning Microscope JSM-6060). A amostra foi depositada sobre *stubs* de alumínio com 12,5 mm de diâmetro, com auxílio de fita adesiva dupla face de

carbono. Procedeu-se a metalização com ouro das partículas (metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN) e analisou-se em diferentes aumentos.

4.6 Análises de performance *in vitro*

4.6.1 Análise da dispersão e deposição de partículas por impactador em cascata de Andersen

A análise do comportamento aerodinâmico de partículas em impactador em cascata de Andersen é considerada como uma das principais técnicas para testes inalatórios. Trata-se de um sistema *in vitro* em que é possível estimar a fração respirável de pós secos e prever como será a deposição das partículas conforme seu diâmetro aerodinâmico (de Boer *et al.*, 2002).

A distribuição do tamanho de partícula afeta a deposição do fármaco no trato respiratório. Partículas menores sofrem com uma força de coesão intensa, resultando em um aumento da adesão entre as partículas levando a propriedades deficientes de fluxo, impossibilitando a distribuição a estágios mais profundos (Pilcer e Amighi, 2010). Devido à sua natureza altamente coesiva, aumenta a tendência de ficarem retidas no dispositivo inalatório, durante o processo de inalação, resultando em uma dose emitida baixa e não confiável (Pilcer *et al.*, 2012).

Os métodos de avaliação aerodinâmica de partículas finas permitem determinar a fração de partículas finas (FPF), que é a porcentagem de partículas que carregam o fármaco com diâmetro menor que 5 μm em relação à dose total de fármaco contida no dispositivo (Kleinstreuer *et al.*, 2008). A FPF também pode estar relacionada com a dose emitida (DE), que representa apenas a massa de fármaco que sai do dispositivo após inalação. A dose emitida indica a capacidade do pó ser dispersado através do fluxo de ar produzido na inalação (Pilcer *et al.*, 2012; Kou *et al.*, 2012).

O perfil de deposição pulmonar dos pós MA α BLac e MA α BLeu foram analisados utilizando um modelo pulmonar *in vitro*, o impactador em cascata de Andersen (ACI-DPI, Aparelho D da Farmacopeia Europeia, Copley Scientific Limited, Alemanha). Esse equipamento é dividido em 8 estágios que simulam o trato respiratório superior e inferior. Cada um desses estágios possuem um disco

e uma placa capaz de reter partículas com tamanhos específicos. Através de um fluxo de ar aplicado sobre a amostra, as partículas irão acomodar-se e depositar-se conforme sua distribuição de tamanho. Cada disco contém poros com tamanhos específicos (*cut off*).

Todos os estágios são correlacionados com partes do sistema respiratório e permitem a deposição de partículas conforme o tamanho da abertura de seus poros. O estágio “zero” e “um” simulam a cavidade oral e tem diâmetros de 9 - 10 μm e 5,8 - 9 μm respectivamente. O estágio “dois” representa a faringe com poros de tamanho entre 4,7 – 5,8 μm . O estágio “três”, a traqueia e brônquios primários (3,3 – 4,7 μm). O estágio “quatro” refere-se aos brônquios secundários (2,1 – 3,3 μm), o “cinco” os bronquíolos terminais (1,1 – 2,1 μm). E, finalmente os estágios “seis” e “sete” (0,7 – 1,1 μm e 0,7 – 1,1 μm , respectivamente) e filtro (0,4 μm) representam os alvéolos (Kleinstreuer *et al.*, 2008).

Para realização deste experimento, adicionou-se 30 mg de cada um dos pós em uma cápsula gelatinosa de tamanho “três”. Esta foi acondicionada em dispositivo inalatório, o qual auxiliou o seu prévio rompimento para possibilitar a dispersão do pó no equipamento. Aplicou-se fluxo de ar de $28,3 \pm 2$ L/min (correspondente a uma pressão de 4 KPa) durante todo o processo e um tempo total de 4 segundos. Esse fluxo simula um volume de ar de 2L.

A quantidade de pó retida em cada estágio foi recuperada separadamente mediante extração com acetonitrila em balões volumétricos (10 mL), com posterior quantificação do alfa-bisabolol em CLAE. A dose emitida (ED) para ACI-DPI foi determinada como sendo a proporção da quantidade total de fármaco recuperado em todos os estágios da cascata em relação à quantidade de fármaco contida na cápsula. A porcentagem cumulativa da massa de pó encontrada em cada etapa foi plotada *versus* cada estágio. A fração de partículas respiráveis ou fração de partículas finas (FPF) foi calculada em termos de porcentagem e pode ser conceituada como sendo a fração de fármaco emitido a partir do dispositivo inalatório com um tamanho de partícula menor do que 5,8 μm ou a fração do fármaco depositado nas etapas 2 a 7, além do filtro (Son *et al.*, 2013; Fontana *et al.*, 2014).

4.6.2 Liberação *in vitro*

A liberação de fármacos de sistemas nanocarreadores se dá por diferentes processos. O fármaco pode se difundir pela matriz ou parede polimérica (perturbação no equilíbrio de partição); solvente penetra na micropartícula e dissolve o fármaco, que é transportado para a solução receptora; ou o carreador pode ser degradado ou dissolvido pelo meio. Na prática, o perfil de liberação pode envolver uma combinação destes mecanismos (Washington, 1990).

A liberação *in vitro* do α -bisabolol foi avaliada pelo método do saco de diálise. O experimento procedeu-se a partir da avaliação de triplicatas de lote (3 lotes de MA α BLac e 3 de MA α BLeu). Utilizou-se membrana de acetato de celulose 25 mm (1,0 in) (Sigma[®]) previamente hidratada com água destilada a 32 °C durante 30 minutos. A condição *sink* no compartimento receptor foi obtida com meio constituído de uma mistura etanol:água (1:1, v/v) previamente filtrada e sonicada.

Para a avaliação, adicionou-se no saco 100 mg de cada amostra de pó, solubilizado em 5mL de água ultrapura gelada (vórtex por 5 minutos). Os sacos de diálise foram introduzidos em béqueres contendo 150 mL do meio (ficando completamente submersos). Esses, por sua vez, foram mantidos em banho a 37 °C, sob suave agitação. Coletou-se 1,5 mL em intervalos de tempos pré-determinados (10, 30, 60, 180, 360, 480, 600, 1440 e 1880 min) com reposição imediata do volume de meio. Após 30 horas de diálise, analisaram-se as amostras coletadas do meio receptor (previamente filtradas, filtro 0,45 μ m) utilizando a metodologia de CLAE-UV descrita anteriormente. Os perfis de fármaco dialisado foram matematicamente modelados através dos modelos mono e biexponencial, a fim de avaliar e comparar a influência da composição qualitativa da formulação na liberação do α -bisabolol (Micro MathScientist[®], version 2.01, St. Louis, MO, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química

5.1.1 Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das nanopartículas

As suspensões de Nanocápsulas apresentaram aspecto leitoso, sem precipitação ou separação de fases.

A Tabela 3 apresenta valores de diâmetro médio [D(4,3)] e o *span* da formulação medida por difratometria de laser, assim como o diâmetro médio e o índice de polidispersão medido por espalhamento de luz dinâmico. O diâmetro médio baseado no volume (D[4,3]) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho médio das partículas e o *span* como representativo da distribuição granulométrica. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes. A formulação apresentou distribuição monomodal com presença exclusiva de população nanométrica, conforme pode ser observado na Figura 5. Valores de *span*, próximos de 1 indicam uma distribuição estreita de tamanho, logo, o valor encontrado confirma a homogeneidade do tamanho de partícula (Venturini, *et al*, 2011). Na avaliação por espalhamento de luz dinâmico, os dados resultantes corroboram com a difratometria de laser, tendo as formulações apresentando diâmetro nanométrico e baixo índice de polidispersão.

Tabela 3: Diâmetro médio das partículas (D[4,3]) e distribuição granulométrica (*span*) ($\pm dp$) medidos pela técnica de difratometria de laser e diâmetro e índice de polidispersão ($\pm dp$) medidos por espalhamento de luz dinâmico

D(4,3) nm	Span	Diâmetro (nm)	PDI
152 \pm 6,40	1,32 \pm 0,091	159 \pm 2,15	0,065 \pm 0,014

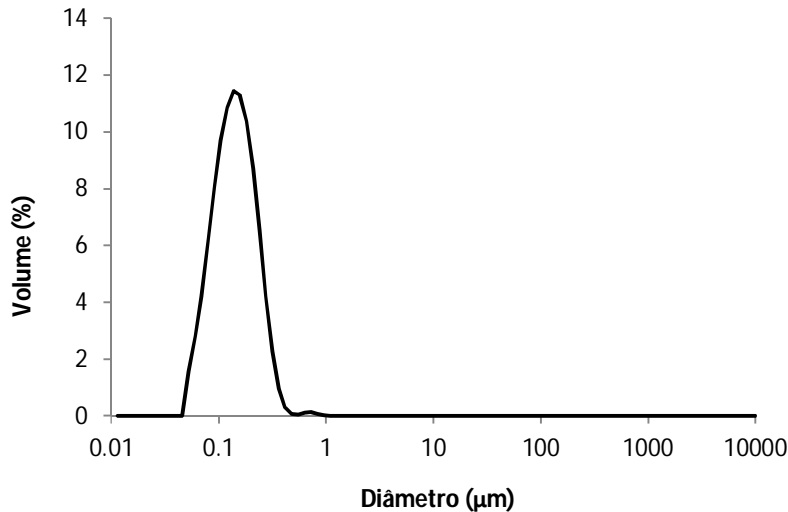


Figura 6: Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser da suspensão contendo nanocápsulas de alfa-bisabolol

5.1.2 Determinação do teor de α -bisabolol nas formulações

O teor de α -bisabolol presente nas formulações MA α BLac e MA α BLEu foram em média 52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de pó, respectivamente. Os pós contendo fármaco livre obtiveram um teor de 22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (MA α BLacLivre) para o microaglomerado contendo lactose e HPMC e 31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (MA α BLEuLivre) para o microaglomerado contendo leucina e HPMC. A partir da soma das massas de cada componente adicionado às formulações, MA α BLac e MA α BLEu deveriam apresentar um teor próximo a 80 $\mu\text{g}/\text{mg}$, bem como os MA α BLacLivre e MA α BLEuLivre deveriam obter valor teórico de 87 $\mu\text{g}/\text{mg}$. A partir destes dados, observa-se uma recuperação média de 64% para os MA α BLac 69% para os MA α BLEu.

Através da análise desses primeiros dados, pode-se observar que as formulações contendo fármaco livre apresentaram maiores perdas de alfa-bisabolol quando comparadas com as contendo o fármaco nanoencapsulado. O MA α BLacLivre teve uma perda 2,52 vezes maior que o MA α BLac e o MA α BLEuLivre perdeu 1,92 vezes mais fármaco que o MA α BLEu.

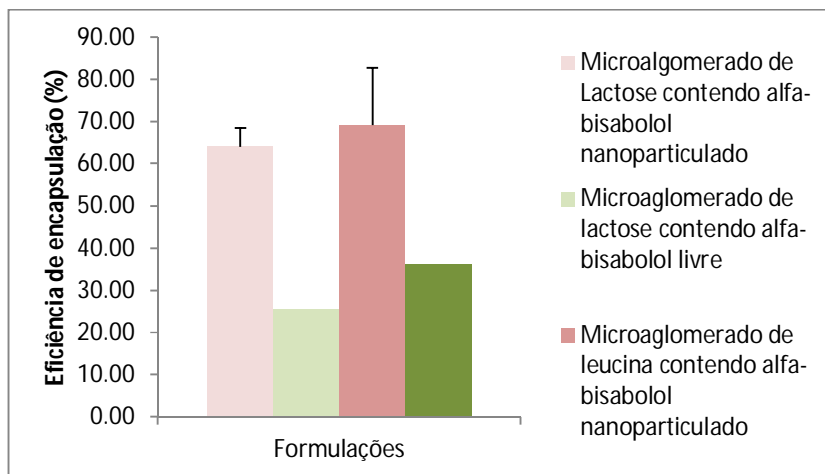


Figure 7: Eficiência de encapsulação das formulações desenvolvidas

Na Figura 6 estão representadas as taxas de encapsulação de cada microaglomerado. Através dela é possível constatar que ocorre uma perda de fármaco em todas as formulações. Entretanto, há uma perda maior dos pós contendo alfa-bisabolol não encapsulado, tendo em vista que o mesmo não se encontra protegido por uma parede polimérica, o que acarreta uma maior volatilização ou degradação no processo de atomização via *spray drying*. Sendo o α -bisabolol um óleo com alta volatilidade, o fato de ele permanecer no ciclone por certo tempo em contato com o ar à temperatura de 120°C, poderia explicar sua perda e/ou degradação.

5.1.3 Desaglomeração e recuperação das nanopartículas

Nos ensaios de desaglomeração, observou-se que houve a dissolução do pó em água com recuperação das nanopartículas dentro de um tempo de 10 minutos. Na Figura 7 temos ilustrada o perfil de desaglomeração dos pós MA α BLac (A) e MA α BLEu (B) em que nota-se que as formulações preparadas com lactose desaglomeram quase que instantaneamente e permitem uma recuperação praticamente total das nanocápsulas. Já nas formulações contendo leucina, este processo é mais lento e, no mesmo tempo de 10min, apresentou uma recuperação apenas parcial das nanopartículas. Essa diferença na reconstituição das nanocápsulas ocorre devido à baixa solubilidade da leucina em água (≈ 25 mg/mL) (Wang *et al*, 2012). Por tratar-se de um adjuvante hidrofóbico, ela reduz o

ângulo de molhabilidade das partículas, o que provoca um retardamento da dissolução das pontes intersticiais (Cheow *et al*, 2011) e, conseqüentemente, leva um maior tempo para desaglomeração total das nanocápsulas.

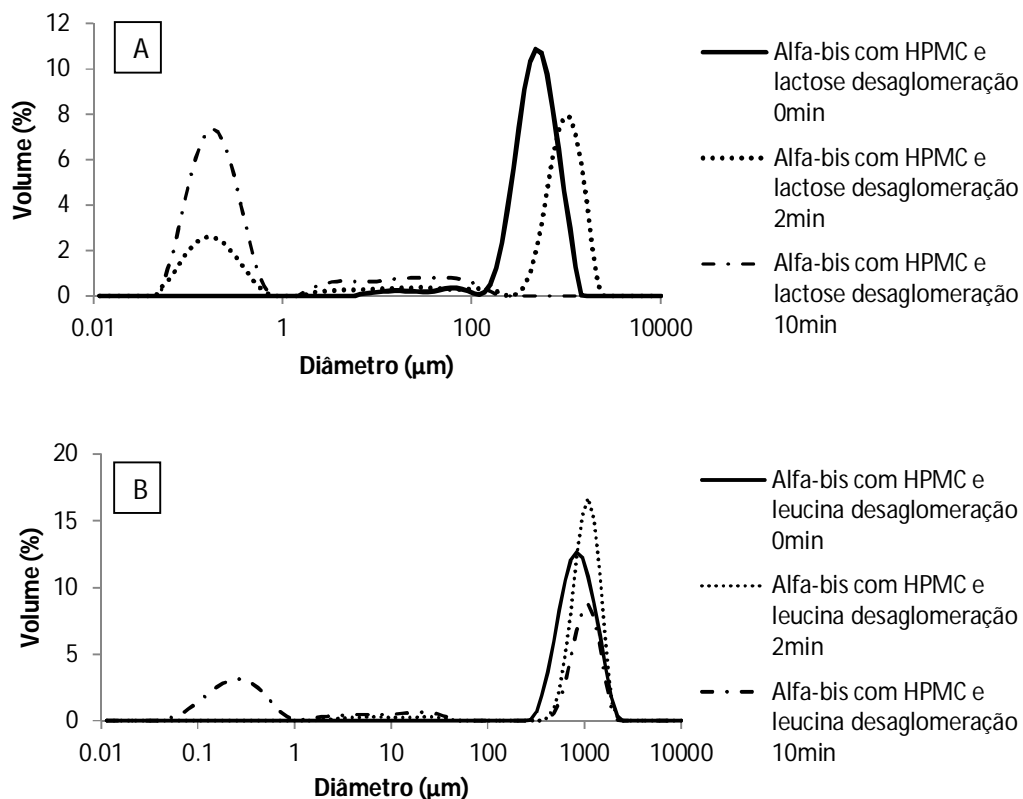


Figura 8: Perfil de desaglomeração da MAαBLac (A) e MAαBLEu (B)

5.1.4 Determinação das características de fluxo dos pós

Para caracterizar os fluxos dos microaglomerados produzidos, procedeu-se a determinação das densidades de MAαBLac e MAαBLEu que foram $0,29 \text{ g/cm}^3$ e $0,22 \text{ g/cm}^3$, respectivamente, conforme consta na Tabela 4. A partir dos dados de densidade, calculou-se o índice de compressibilidade de Carr e Fator de Hausner, que também estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4: Densidade de compactação (Dc), Índice de Compressibilidade de Carr e Fator de Hausner dos pós produzidos

	MAαBLac	MAαBLeu
Dc (g/ml)	0,29	0,22
IC (%)	33,08	28,36
FH	1,51	1,40

O Fator de Hausner (FH), assim como o Índice de Compressibilidade de Carr, é usado numa grande variedade de indústrias como indicativo da fluidez de pós. Conforme a Farmacopéia Americana (v. 29, 2007), um pó tem um fluxo considerado adequado quando apresenta um FH menor ou igual a 1,25 e/ou IC entre 16 e 20%. Sendo assim, os pós desenvolvidos apresentaram um fluxo pobre ou inadequado. O pó contendo lactose como adjuvante, MA α BLac, classifica-se como muito ruim, enquanto o pó contendo leucina, MA α BLeu, apesar de subir um degrau na escala, ainda é considerado deficiente de fluidez.

Tabela 5: Classificação do fluxo de pós de acordo com índice de Carr (IC) e Fator de Hausner, de acordo com a Farmacopeia USP (v. 29, 2007)

IC (%)	Fluxo	FH
≤ 10	Excelente	1,00-1,11
11-15	Bom	1,12-1,18
16-20	Adequado	1,19-1,25
21-25	Razoável	1,26-1,34
26-31	Ruim	1,35-1,45
32-37	Muito ruim	1,46-1,59
>38	Péssimo	>1,60

A baixa fluidez das formulações pode ser explicada pela forma das partículas, alta umidade presente e baixa coesão entre os aglomerados micrométricos (Freeman, 2007). Alta umidade relativa do ar aumenta a magnitude das forças de adesão entre as partículas, intensificando a interação eletrostática,

e, conseqüentemente, prejudicando a dispersão e fluidez dos pós (Pilcer *et al*, 2012). A adição de outros excipientes em uma formulação de tamanho micrométrico pode melhorar as propriedades de fluxo, além de fornecer maiores quantidades de produto final, permitindo facilidade de manuseio, distribuição e obtenção de medidas (Pilcer e Amighi, 2010).

Portanto, para melhorar a dispersão do fluxo, outros adjuvantes ainda poderiam ser incorporados a uma formulação a fim de se aderirem a mistura por forças mecânicas, eletrostáticas ou de *van der waals*, provocando melhor uniformidade na distribuição do fármaco e melhora na fluidez do pó (De Boer, et al 2012). Para isto, esses excipientes devem apresentar estabilidade físico-química, perfil toxicológico seguro, compatibilidade e baixo custo. A lactose é o representante mais selecionado desta classe (Pilcer *et al*, 2012). Contudo, tendo em vista a baixa fluidez ainda apresentada pela formulação de lactose, alternativas para melhorar a fluidez desta seriam: maior controle da umidade (manter amostras sempre em dessecador) e/ou a adição de um terceiro adjuvante à formulação, já que tanto a lactose quanto leucina não foram suficientes para reverter este aspecto.

5.1.5 Caracterização morfológica dos microaglomerados

As Figuras 9 e 10 representam as micrografias eletrônicas das formulações MA α BLac e MA α BLEu. As formulações contendo lactose como adjuvante (MA α BLac) apresentaram superfície e formato mais irregular, enquanto que as formulações contendo leucina (MA α BLEu) apresentaram forma mais arredondada com superfície mais regular.

A morfologia é um dos fatores que influenciam na dispersão de um pó (De Boer *et al*, 2012). Quanto mais rugosa a superfície de partículas carreadoras das nanopartículas, menor a força de adesão (Kou *et al*, 2012), pois quanto mais irregular uma superfície, menos contato o transportador tem com a nanopartícula o que facilita o desprendimento destas para o meio.

As formulações contendo lactose apresentaram forma bicôncava e superfície com rugosidades evidenciada. Apesar de apresentar morfologia adequado, não demonstrou melhores resultados de fluidez como esperado, quando comparada à leucina, provavelmente devido suas altas propriedades

higroscópicas (Grenha et al, 2005). As formulações contendo leucina também apresentam superfície rugosa, entretanto, seu formato é mais esférico e uniforme.

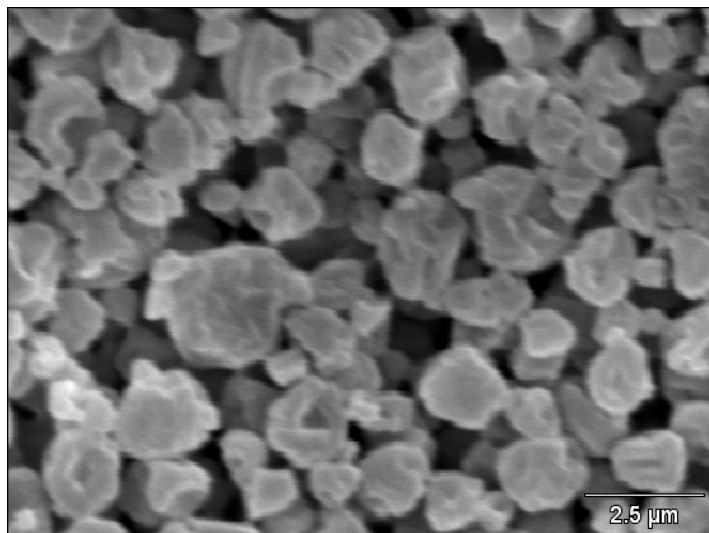


Figura 9: Micrografia eletrônica dos MAαBLac

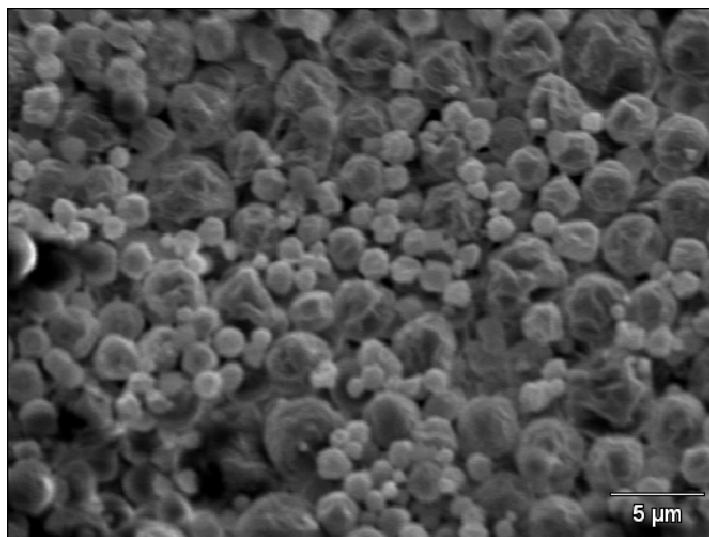


Figura 10: Micrografia eletrônica dos e MAαBLEu

5.2 Análises *in vitro*

5.2.1 Análise da dispersão e deposição de partículas por impactador em cascata de Andersen

O MA α BLac apresentou uma dose emitida (DE) de 276 μ g e uma fração de partículas respiráveis de 42%. Enquanto o MA α BLEu obteve uma DE de 1008 μ g e um FPF de 51%. A porcentagem de α -bisabolol depositada em cada estágio, utilizando-se como 100% o valor da DE, está representada na Figura 11.

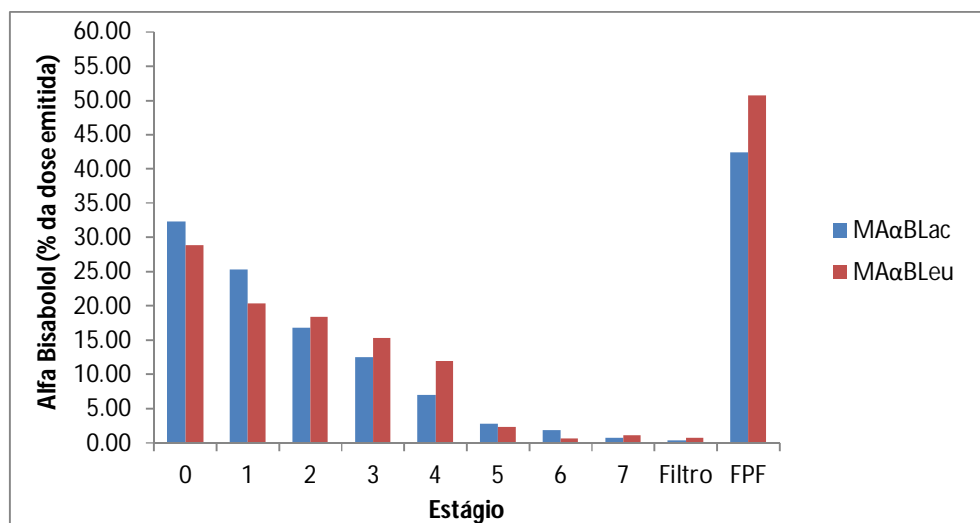


Figura 11: Deposição dos pós MA α BLac e MA α BLEu em impactador de cascata de Andersen

Embora os perfis sejam bastante similares, a dose de alfa-bisabolol que atinge cada estágio, a partir das diferentes formulações é bastante diferente. Uma vez que a formulação de leucina apresentou uma dose emitida 3,5 vezes maior que a de lactose, a dose de fármaco do FPF de cada formulação é 117 μ g de alfa-bisabolol para a formulação de lactose e 512 μ g para a formulação de leucina. Dessa forma, esse resultado aponta um possível melhor desempenho para uma administração de microaglomerados de nanopartículas preparado com leucina.

Os dados da Figura 11 sugerem um perfil de deposição *in vitro* mais adequado para o pó contendo leucina (MA α BLEu), tendo em vista que, além de apresentar uma DE maior, esse ainda apresentou uma tendência a ter uma maior porcentagem do alfa-bisabolol nos estágios mais profundos (melhor FPF). Entretanto, a quantidade que atingiu os estágios referentes aos alvéolos

pulmonares (estágio 6, 7 e filtro) foi baixa em ambas as formulações. Contudo, para afirmar que realmente existem essas diferenças (sendo elas significativas) entre as formulações, ainda se faz necessária a avaliação de mais lotes de cada formulação.

5.2.2 Liberação *in vitro*

A avaliação do perfil de liberação utilizando a técnica do saco de diálise é uma metodologia simples de ser aplicada. Entretanto, devido às barreiras de difusão, a cinética de liberação do fármaco pode ser mais lenta não refletindo como será o comportamento exato dessas formulações quando administradas em organismos vivos. Contudo, o método do saco de diálise é bastante útil na comparação de diferentes sistemas (Bautista e Tam, 2011).

A partir da avaliação dos perfis (Figura 12), pode-se observar uma liberação do alfa-bisabolol sustentada por 48 horas para ambas as formulações. A Tabela 6 apresenta os valores da constante de velocidade de liberação k (min^{-1}), tempo de meia vida $T_{1/2}$ (h), critério de seleção do modelo (MSC) e coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 6: Valores do coeficiente de determinação (R^2), critério de seleção do modelo (MSC), velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) expressos em média \pm dp.

	MAαBLac	MAαBLeu
R	0,9964 \pm 0,0010	0,9982 \pm 0,0005
MSC	4,20 \pm 0,26	4,81 \pm 0,37
K (min^{-1})	0,0048 \pm 0,0001	0,003967 \pm 0,00006667
$T_{1/2}$ (h)	2,41 \pm 0,092	2,92 \pm 0,0866

Em ambos os perfis analisados, realizou-se modelagem matemática, utilizando equações monoexponencial e biexponencial. O modelo escolhido foi o monoexponencial. O tempo de meia vida foi calculado utilizando a Equação 6.

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

Equação 6

As formulações apresentaram valores de velocidade de liberação e tempo de meia-vida próximos, mas houve diferenças estatísticas significativas quando comparados os valores obtidos para os dois tipos de formulação ($p=0.0023$). A partir dos resultados pode-se observar que a formulação que utiliza leucina como adjuvante apresenta uma liberação mais lenta com um tempo de meia vida 1,2 vezes maior. Isto pode acontecer devido ao fato da leucina apresentar uma solubilização mais lenta em veículos hidrofílicos.

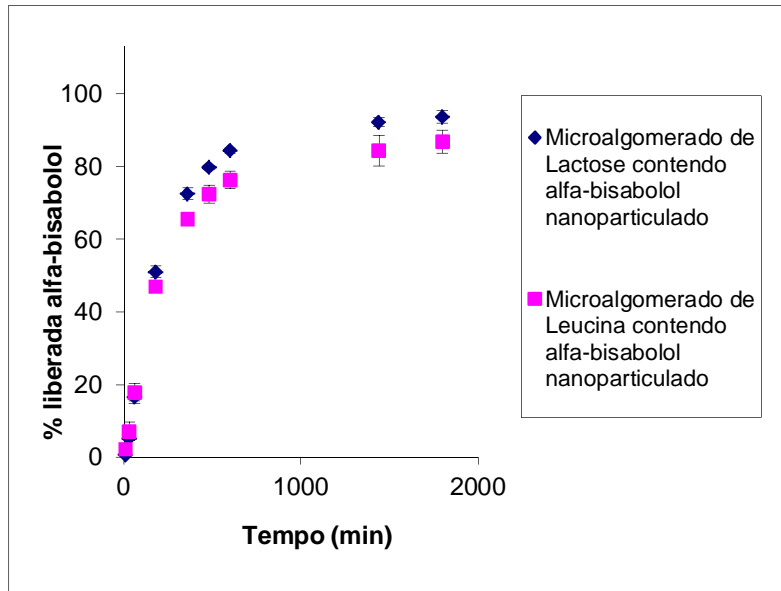


Figura 12: Perfis de liberação in vitro a partir das formulações MA α BLac e MA α BLeu utilizando o método do saco de diálise (n=3)

Esse resultado, contudo pode ser mais interessante quando o objetivo é uma formulação capaz de sustentar por mais tempo a liberação de um fármaco no tecido alvo. Essa estratégia permite uma liberação mais constante no local alvo e conseqüentemente a possibilidade de uma reaplicação de dose em intervalos maiores. Levando-se em consideração a dose (μg) de alfa-bisabolol do FPF determinado para cada formulação (117 μg para lactose e 512 μg para leucina),

bem como o tempo de meia vida de cada formulação, após 24 horas de liberação dessas partículas, para a formulação de lactose restariam aproximadamente 0,12 µg a serem liberados e para a formulação de leucina ainda restariam 2,0 µg a serem liberados. Ou seja, esse resultado demonstra que se a formulação de lactose estivesse adequada para uma reaplicação a cada 24 h, a formulação de leucina estaria apta a uma reaplicação a cada 36 h, o que proporciona um maior conforto para o paciente e uma chance de desencadeamento de crise asmática menor no caso de um atraso na reaplicação da medicação.

Contudo, ainda não foi possível avaliar a real influência das nanopartículas na formulação devido a ausência dos perfis de liberação de microaglomerados contendo o alfa-bisabolol não nanoencapsulado. Dessa forma a diálise de um microaglomerado contendo fármaco não-encapsulado se faz necessária para fins comparativos e confirmatórios.

6. CONCLUSÕES

Ambas as formulações obtiveram uma boa recuperação do α -bisabolol quando formado os microaglomerados, mesmo com as altas temperaturas de secagem. Tanto o MA α BLac quanto o MA α BLeu apresentaram um bom perfil de desaglomeração, permitindo que as nanocápsulas se liberem rápido o suficiente para não serem expelidas pelo *clearance* mucociliar. Mesmo a leucina, não tendo uma dissolução tão rápida, por não ser tão solúvel em água quanto a lactose, a formulação MA α BLeu demonstrou uma liberação de grande parte da população nanométrica em um tempo de 10 minutos na análise por difratometria de laser.

Quanto ao mecanismo de deposição, as duas formulações sofrem impactação, sedimentação e difusão Browniana, já que ambas conseguem atingir até os últimos estágios do Impactador de Cascata de Andersen. Além disso, apresentaram um FPF considerado bom para inalação, embora o fluxo desses pós tenha apresentado resultados considerados insuficientes para permitir total dispersão desses pós do dispositivo inalatório.

Os resultados apontam que as formulações contendo o aminoácido leucina como adjuvante tendem a ter um melhor perfil aerodinâmico e melhores características de fluidez. Além disso, o perfil de liberação *in vitro* demonstrou

uma liberação mais controlado para essa formulação, o que pode permitir um intervalo de doses maior, proporcionando mais conforto e segurança para os pacientes. Logo, esse adjuvante aparenta ser mais eficiente quanto à finalidade desejada quando comparado à lactose.

Dessa forma, os resultados sugerem que as formulações desenvolvidas apresentam bom potencial para continuidade dos estudos e, embora ainda possam vir a sofrer alguns ajustes para a melhora de seu desempenho, estão aptas para fase de avaliação *in vivo*, de eficácia e segurança.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliação da influência do tempo de secagem no teor final do fármaco;
- Avaliação do diâmetro utilizando difratometria de laser por via seca em Mastersizer[®] 2000 acoplado a um dispersor de pó seco “Scirocco 2000”;
- Avaliação da liberação e do perfil de deposição em diferentes estágios pulmonares *in vitro* dos microaglomerados contendo fármaco livre;
- Realização dos experimentos de deposição em diferentes estágios pulmonares *in vitro* em triplicata para posterior análise estatística dos mesmos;
- Análise da bioadesão das formulações através da lavabilidade em célula de Franz modificada, utilizando pulmões de ratos como membrana;
- Avaliação da toxicidade pulmonar das partículas *in vitro*;
- Avaliação da eficácia da melhor formulação em modelos *in vivo* de asma.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Básica*. 2 ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Elsevier, p. 91-98, 2007.

ALCAMO, I. E. *Anatomy Coloring Workbook*. 2 ed. New York, NY: Editora Princeton, p. 244, 2003.

AMARO, M. I.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporous microparticles (NPMPs) intended for inhalation. *Int J Pharm [S.I.]*, v. 421, n. 1, p. 99-109, 2011.

ASHER, M.I., KEIL U., ANDERSON, H.R., BEASLEY, R., CRANE, J., MARTINEZ, F., MITCHELL, E.A., PEARCE, N., SIBBALD, B., STEWART, A.W., STRACHAN, D., WEILAND, S.K., WILLIAMS, H.C. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. *European Respiratory Journal*, v.8, p. 483–491, 1995.

ASHER, M.I.; MONTEFORT, S.; BJORKSTEN, B.;LAI, C. K.; STRACHAN D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H.; ISAAC, Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, v 368, p.733-43, 2006.

BAUTISTA, M. G.; TAM, K. C., Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* v. 389, p. 299– 303, 2011.

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy* v. 13 p. 138-142, 2003.

BÁRTHOLO, T.P.; FARIA, A.C.; LOPES, A.J. Definições funcionais de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista HUPE, RJ*. v.12, n.2, 2013.

BERNE, R. S.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Fisiologia*.5.ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Elsevier, p. 471-488, 2004.

BERRY, M. Herbal products. Part 6 Chamomiles. *The Pharmaceutical Journal*,v. 254, p.191-193, 1995.

CAMPOS, H.S.; CAMARGOS, P. A. M. Broncodilatadores. *Pulmão RJv.* 21, n. 2, p. 60-64, 2012.

CHEOW, S. W., NG., M. L. L., KHO, K., HADINOTO, K., Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: Effect of freeze-drying adjuvants, *International Journal of Pharmaceutics* v. 404, p. 289–300, 2011

COURRIER, H. M.; BUTZ, N.; VANDAMME, T. F. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* v. 19, p. 425–498, 2002.

DE BOER, A. H.; GJALTEMA, D.; HAGEDOORN, P.; FRIJNLINK, H. W. Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laserdiffraction technique. *Int. J. Pharm.* v. 249, p. 219–231, 2002.

DE BOER, A. H.; WISSINK, J.; HAGEDOORN, P.; HESKAMP, I.; DE KRUIJF, W.; BÜNDER, R.; ZANEN, P.; MUNNIK, P.; VAN RIJN, C.; FRIJLINK, H. W. In vitro performance testing of the novel Medspray wet aerosol inhaler based on the principle of Rayleigh break-up. *Pharm Res [S.I.]*, v. 25, n. 5, p. 1186-92, 2008.

DE BOER, A. H.; CHAN, H. K.; PRICE, R. A critical view on lactose-based drug formulation and device studies for dry powder inhalation: Which are relevant and what interactions to expect? *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 257-274, 2012

DIRETRIZES, SBPT - Sociedade Brasileira De Pneumologia e Tisiologia. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, p. S447-S474, 2006.

DIRETRIZES, SBPT - Sociedade Brasileira De Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 38, p. S1-S46, 2012.

DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; DUCCELLIER, J.; DUKE, P. A. K. *Handbook of medicinal herbs*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, 2002.

FONTANA, C.C; DURLI, T.A; POHLMAN, A.R; GUTERRES, S.S; BECK, R.C. R. Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: One-step preparation and in vitro lung deposition, *Powder Technology*, v 258, p 49–59, 2014.

FREEMAN, R. Measuring the flow properties of consolidated, conditioned and aerated powders — A comparative study using a powder rheometer and a rotational shear cell, *Powder Technology*, v 174, p 25-33, 2007

FRANCO, R.; NASCIMENTO, H.F.; CRUZ, A.A.; SANTOS, A.C.; SOUZA-MACHADO, C.; PONTE, E.V.; SOUZA-MACHADO, A.; RODRIGUES, L.C.; BARRETO, M.L. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy*, n. 64, p. 478–483, 2009.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. *Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 510-520, 1998

GINA, Global Initiative for Asthma. Apresenta texto sobre a asma. Disponível em: <http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2010.pdf> Acesso em: 10 mai 2014.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [S.I.], v. 25, n. 4–5, p. 427-437, 2005.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 147–157, 2007.

HEYDER, J.; GEBHART, J.; RUDOLF, G.; SCHILLER, C. F.; STAHLHOFEN, W. Deposition of Particles in the Human Respiratory Tract in the Size Range 0.005 - 15 µm, *Journal of Aerosol Science*, v. 17, n. 5, pp. 811-825, 1985.

HINDS, W.C. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles* (2nd edn), Wiley, 1999.

ISAAC, STEERING COMMITTEE. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC – The international study of asthma and allergies in childhood. *Lancet*, v. 351, p.1225-32, 1998

JAKOVLEV, V.; ISAAC, O.; THIEMER, K.; KUNDE, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of α -bisabolol and bisabolol oxides, *Planta Med.* v. 35, p. 125-140, 1979.

JAKOVLEV, V.; SCHLICHTEGROLL, A. V. On the inflammation inhibitory effect of α -bisabolol, an essential component of chamomilla oil, *Arzneimittelforschung* 19, p. 615–616, 1969.

KIM, S.; LEE, J.; JUNG, E.; HUH, S.; PARK, J.O.; LEE, J. W.; BYUN, S. Y.; PARK, D. Mechanisms of depigmentation by α -bisabolol. *J Dermatol Sci* v. 52, p.219-222, 2008.

KLEINSTREUER, C., ZHANG, Z., DONOHUE, J.F. Targeted Drug-Aerosol Delivery in the Human Respiratory System. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 10, n. 1, p. 195-220, 2008.

KOU, X.; CHAN, L. W.; STECKEL, H., HENG, W. W. Physico-chemical aspects of lactose for inhalation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 220–232, 2012.

LOUIE, S.; ZEKI, A. A.; SCHIVO, M.; CHAN, A. L.; YONEDA, K. Y.; AVDALOVIC, M.; MORRISSEY, B. M.; ALBERTSON, T. E. The asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome: pharmacotherapeutic considerations. *Expert Rev Clin Pharmacol*, v. 6, n. 2, p. 197-219, 2013.

MADHAVAN, B. N. Final report on the safety assessment of bisabolol. *International Journal of Toxicology* 18, p. 33-40, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, DATASUS. Taxa de Mortalidade. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>>. Acessado em: 02 jun. 2014.

OLIVEIRA, O. W; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: Delivering drugs to the body through the lungs. *Nature Reviews Drug Discovery* v.6, n.1, p. 67-74, 2007.

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

PILCER, G.; WAUTHOZ, N.; AMIGHI, K. Lactose characteristics and the generation of the aerosol. *Adv Drug Deliv Rev* [S.I.], v. 64, n. 3, p. 233-56, 2012.

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

RIZZO, M. C. V.; SOLÉ, D. Corticosteróides inalados no tratamento da alergia respiratória: segurança versus eficácia. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n.5, p. 198-205, 2006.

SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, M.A.; FARESIN, S.M.; SANTORO, L.L.; FERNANDES, A.L.G. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 7, n. 40, p. 943-948, 2007.

SBPT - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. DPOC e Saúde Pública: Atendendo às necessidades dos pacientes. SBPT, p.18, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v.26, p.726-737, 2003.

SCHANS, C. P. V. Bronchial Mucus Transport, *Respiratory Care*, Vol. 52, No. 9, p. 1150-1158, 2007.

SILVA, E.C.F. Asma Brônquica. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*. n.7, p. 33-57, 2008.

SILVA, E.C.F.; DIAS, G.A.C. Patogenia da asma. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*. v.12, n.2, p. 31-40, 2013.

SON, Y.; LONGEST, P.W.; HINDLE, M. Aerosolization characteristics of dry powder inhaler formulations for the excipient enhanced growth (EEG) application: effect of spray drying process conditions on aerosol performance, *Int. J. Pharm.* 443, p. 137–145, 2013.

SOUZA, A. T.; BENAZZI, T. L.; GRINGS, M. B.; CABRAL, V.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* v. 47, p.182-187, 2008.

SOUZA-MACHADO, A.; SOUZA-MACHADO, C.; COSTA, E.; RIZZO, J. A.; FRANÇA, A. T.; SANO, F.; WANDALSEN, G. F.; AUN, M. V.; BIANCHI, J. G.; TEBYRIÇÁ, J. N.; SOLÉ, D. Beta-2 agonistas de ultra longa duração para o tratamento da asma: há espaço? *Revista Brasileira de alergia e imunopatologia*. v. 35, n. 1, p. 9-15, 2012.

SUNG, J.C.; PULLIAM, B. L.; EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *TRENDS in Biotechnology*, v.25, n.12, 2007.

TODO-BOM, A.; PINTO, A. M. Fisiopatologia da Asma Grave. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v. 29, n. 3, p. 113 - 115, 2006

U. S. PHARMACOPEIA. USP29 NF24, p. 3017, 2007. Disponível em: <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1174.html>. Acessado em: 15 abr. 2014.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*, v. 375, n. 1-3, p. 200-208, 2011.

VILJOEN, A. M.; GONO-BWALYA, A. B.; KAMATOU, G. P. P.; BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The essential oil composition and chemotaxonomy of *Salvia stenophylla* and its allies *S. repens* and *S. runcinata*. *J Essent Oil Res* 18, p.37-45, 2006.

YANG, W.; PETERS, J.I.; WILLIAM, R.O.III. Inhaled Nanoparticles - A Current Review, *International Journal of Pharmaceutics*, V. 356, n.1-2, p. 239- 247, 2008.

WALECZEK, K. J.; MARQUES, H. M.; HEMPEL, B.; SCHMIDT, P. C. Phase solubility studies of pure (2)- α -bisabolol and chamomile essential oil with β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 55, p. 247-251, 2003.

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

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58, p. 1-12, 1990.

WEIBEL, E.R.; KINGHT, B.W.A. Morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier, *The Journal of cell biology*, v. 21, n 3, p. 367-384, 1964.

WHO, World Health Organization. Apresenta texto sobre a asma e outras doenças respiratórias crônicas. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 11 abr. 2014.