



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019015735-6 A2



(22) Data do Depósito: 30/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 09/02/2021

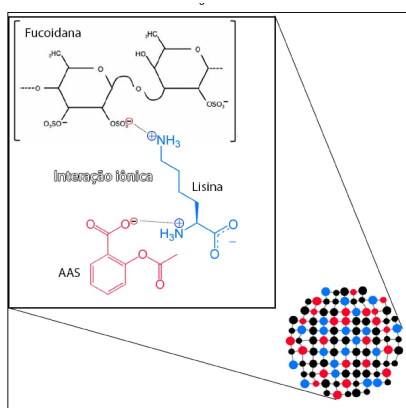
(54) **Título:** MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULA E USO DA COMPOSIÇÃO

(51) **Int. Cl.:** A61K 9/14; C07C 15/02; A61P 7/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** MAX SEIDY SAITO; KELLY CRISTINE ZATTA; SILVIA STANIÇUASKI GUTERRES; ADRIANA RAFFIN POHLMANN; MARKUS BERGER OLIVEIRA; PLÍNIO CUNHA SATHLER.

(57) **Resumo:** MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULA E USO DA COMPOSIÇÃO O presente invento aparece de forma inovadora ao associar um antiagregante plaquetário clássico utilizado na clínica médica (ácido acetilsalicílico - AAS) em conjunto com um polissacarídeo natural com ligação específica em plaquetas e locais com expressão de P-selectina (fucoidana extraída da espécie *Aschophyllum Nodosum*), um aminoácido ligante com atividade secundária de regeneração tecidual e anti-mucosite (L-lisina), e um promotor de liberação controlada (hidroxipropilmetilcelulose - HPMC), estruturados de forma organizacional como micropartículas bioadesivas de liberação prolongada, baseada nos conceitos de nanotecnologia. A associação destes, conforme observado nos resultados, acarretou em um aumento da atividade antiagregante plaquetária do AAS, devido principalmente à seletividade da fucoidana, quando comparado ao AAS puro nos ensaios in vivo, com manutenção dos efeitos antiagregantes por até 24 horas. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia e Medicina.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULA E USO DA COMPOSIÇÃO

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve método para a formulação de micropartículas contendo ácido acetilsalicílico e fucoidana. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia e Medicina.

Antecedentes da Invenção

[0002] Como definido por Oakley C. & Larjava H (2011) a hemostasia é um processo fisiológico que mantém a fluidez do sangue e limita a perda sanguínea preservando a perfusão local após injúria, estimulando os processos de reparo.

[0003] Entre as doenças trombóticas mais recorrentes destacam-se a aterotrombose e o tromboembolismo venoso (TEV) que são doenças causadas por quadros de trombose arterial e trombose venosa respectivamente. Esses quadros patológicos fazem parte das doenças cardiovasculares, que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018), representam uma das causas mais predominantes de morbidade e de mortalidade em todo o mundo. Nos Estados Unidos, mais de dois milhões de pessoas morrem todo ano de trombose arterial ou venosa ou de suas consequências. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde e artigos do campo, como de MANSUR & FAVARATO (2012), cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos é causada por doenças cardiovasculares.

[0004] O tratamento com anticoagulantes necessita de um acompanhamento médico próximo, de constantes modificações e um monitoramento contínuo (GEBUIS et al., 2011; MCGRATH et al., 2014). As complicações clínicas decorrentes de utilização indiscriminada dos anticoagulantes podem originar graves quadros hemorrágicos (WARKENTIN, 2010; AKWAA & SPYROPOULOS, 2013).

[0005] Nesse contexto, alguns medicamentos possíveis de serem utilizados para tratamento são os inibidores diretos reversíveis ou irreversíveis do FXa, como: apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban e edoxaban. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição direta do FXa, mesmo que ligado ao complexo protrombinase, sem necessidade da atuação de ATIII como mediador. São considerados de rápido início de efeito, descartando a necessidade de injeção intravenosa de anticoagulantes em quadros críticos e não interagem com enzimas do citocromo P450 ou com os alimentos, diferentemente dos anticoagulantes tradicionais. Como vantagem, apresentam eliminação por diversas vias, facilitando a utilização por pacientes que apresentam problemas renais e administração por via oral, sem necessidade de monitoramento frequente (KENNEDY et al., 2012; BACCHUS & CROWTHER, 2013; SCAGLIONE, 2013; MCGRATH et al., 2014).

[0006] Outra classe de medicamentos inibidores são os inibidores diretos da trombina, como a hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban e dabigatran, que inibem a coagulação por ação direta sobre a trombina. Esses inibidores podem se ligar na trombina em duas regiões: no sítio ativo ou exosítio I ou II. O exosítio I atua como um local de ancoragem para diversos peptídeos, incluindo a fibrina (FAREED; THETHI & HOPPENSTEADT, 2012; BACCHUS & CROWTHER, 2013; MCGRATH et al., 2014).

[0007] Em relação aos antiagregantes plaquetários, são apresentados alguns fármacos, como o clopidogrel. Este fármaco pertence ao grupo das tienopiridinas e é um pró-fármaco absorvido pelo intestino e metabolizado no fígado por isoformas da enzima P-450. Seu mecanismo de ação é a inibição irreversível dos receptores P2Y12 de adenosina difosfato (ADP), presentes nas plaquetas, exercendo sua ação através da formação de ligações disulfícas com dois resíduos de serina (SER-17, SER-270) da molécula receptora (BERNARD & LIONEL, 2013; QURESHI & HOBSON, 2013; AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; DELOUGHERY, 2015).

[0008] Outros antagonistas do receptor P2Y12 como cangrelor, ticagrelor e

elinogrel, não requerem ativação metabólica e ligam-se diretamente e reversivelmente ao P2Y₁₂, em contraste com o clopidogrel. Além disso, por serem antagonistas reversíveis, seus efeitos inibitórios decaem à medida que a concentração do fármaco diminui (KOHLI, 2012; AHLUWALIA & BHANWRA, 2014)

[0009] Considerando fármacos da classe de inibidores GP (glicoproteína) IIb/IIIa, os três representantes principais são o abciximab, a eptifibatida e o tirofiban. Suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas fornecem, em pouco tempo, uma alta inibição dos receptores GPIIb/IIIa das plaquetas para combater a trombose, que pode ocorrer em resposta ao rompimento mecânico de placas de ateroma durante e imediatamente após angioplastia coronária (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; DELOUGHERY, 2015).

[0010] Os antagonistas TXA₂R incluem o terutroban e a picotamida. O terutroban é um antagonista específico do receptor TXA₂. Essa inibição impede que o TXA₂ ligue-se ao seu receptor (TXA₂R), impedindo o acúmulo intracelular de cálcio e a consequente agregação plaquetária. Já a picotamida, além de bloquear o receptor TXA₂, inibe também a tromboxano sintase (TXS), responsável pela síntese do TXA₂ (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014).

[0011] O vorapaxar é um inibidor competitivo da trombina, que não afeta a agregação plaquetária mediada por outros agonistas e nem a conversão de fibrinogênio em fibrina (que é mediada pela trombina). Embora seja um antagonista reversível, dissocia-se lentamente de seu receptor, possuindo assim uma longa meia-vida (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014).

[0012] Já o atopaxar é um potente antagonista PAR-1 que inibe a agregação plaquetária mediada por trombina (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014). O dipiridamol é um derivado pirimido-pirimidina que possui atividade antiagregante plaquetária e propriedades vasodilatadoras, sendo seu mecanismo de ação resultante do bloqueio da PDE2. No entanto, estudos clínicos demonstraram resultados insatisfatórios, levando então a sua utilização em combinação com o AAS (DELOUGHERY, 2015).

[0013] Além do dipiridamol, outro fármaco inibidor da fosfodiesterase é o cilostazol, sendo este, um inibidor reversível da PDE3. A literatura relata efeitos antiagregantes plaquetários, vasodilatadores e antimitogênicos (DELOUGHERY, 2015)

[0014] O tratamento e prevenção de eventos trombóticos geralmente se dá pela administração do ácido acetilsalicílico (AAS), um antiagregante plaquetário clássico, associado ao clopidogrel ou outro agente antiagregante plaquetário (ALTMAN, 2004; ALTMAN; RIVAS & GONZALEZ, 2012, ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; CASADO-ARROYO; SOSTRES & LANAS, 2013 e ITTAMAN; VANWORMER & REZKALLA 2014). Contudo, os problemas inerentes ao uso crônico do AAS chamam atenção, pois está associado à maior risco de complicações gastrointestinais, como úlceras e sangramentos, o que levam a desistência do tratamento, conforme relatado anteriormente (ANGIOLILLO, 2013.; CHOI & KIM, 2013.; KUNADIAN, 2013 e EL-HAYEK, 2014).

[0015] Diversas formas farmacêuticas do AAS estão disponíveis no mercado, desde os comprimidos convencionais (SALLUM, 2014), e até mesmo formulações revestidas (HAASTRUP, GRØNLYKKE & JARBØL, 2015 e GOLDSTEIN, 2016) e de liberação controlada (BLIDEN, 2016) a fim de superar esses efeitos adversos que muitas vezes ocasionam uma alta taxa de desistência do tratamento, principalmente em pacientes que precisam de terapia contínua.

[0016] O ácido acetilsalicílico (AAS), um dos antiagregantes plaquetários mais antigos e, conseqüentemente, um dos poucos com estudos de toxicidade em longo prazo, apresenta uma ampla utilização e é listado pela organização mundial de saúde (OMS) como medicamento essencial, devido sua segurança e eficácia.

[0017] O risco atrelado ao seu uso relaciona-se diretamente com a administração crônica por via oral, já que pacientes com úlceras, gastrite e outros problemas gastrointestinais necessitam de acompanhamento médico ou

utilização de medicamentos mucoprotetores em conjunto.

[0018] Sørensen e colaboradores (2000) realizaram um estudo de corte sobre a utilização de AAS com e sem revestimento em baixas doses (100 ou 150 mg). Os resultados expressos demonstraram que o revestimento não foi eficaz quanto à prevenção de mucosites, com incidência de quadros hemorrágicos ligeiramente maiores, o que corrobora o estudo realizado por Kelly e colaboradores (1996), que evidenciou um aumento do risco hemorrágico em pacientes que fizeram uso do AAS revestido ou tamponado. Com isso, percebe-se a importância do desenvolvimento de uma formulação capaz de superar esses efeitos adversos.

[0019] Esses quadros hemorrágicos são a grande problemática associada ao tratamento/prevenção de eventos trombóticos em pacientes que utilizam AAS, levando a diversas sociedades regularem sua utilização, versando também sobre o tratamento recomendado.

[0020] Por exemplo, para eventos trombóticos primários, a American Heart/Stroke Association e American College of Chest Physicians recomendam doses de AAS apenas se o benefício superar os riscos dos efeitos adversos. Já a European Society of Cardiology recomenda apenas para pacientes com alto risco de apresentarem quadros trombóticos. Já a Canadian Cardiovascular Society não recomenda a sua utilização.

[0021] Em relação a eventos trombóticos secundários, todos entram no consenso de que é necessária a utilização de pequenas doses de AAS de forma regular (crônica). Diversos estudos clínicos, de 1988 a 2010 tentaram determinar a dose ótima para efeito antitrombótico do AAS sem danos no trato gastrointestinal, com variações de 75 a 500 mg/dia. Os resultados para doses menores que 100 mg/dia foram os mais satisfatórios, embora ainda tenha sido relatado desistência do tratamento devido, principalmente, à quadros hemorrágicos.

[0022] Diversas formas farmacêuticas do AAS estão disponíveis no mercado, como os comprimidos convencionais, comprimidos revestidos e formas

farmacêuticas de liberação controlada, todas desenvolvidas com o objetivo de ultrapassar os efeitos adversos inerentes ao fármaco que por vezes culminam em alta taxa de desistência do tratamento, principalmente em pacientes que precisam de terapia contínua.

[0023] Em 2017, Lefrançais e colaboradores publicaram um artigo inédito evidenciando que os pulmões são os locais mais importantes de biogênese das plaquetas, refutando que a medula óssea era o principal órgão de produção.

[0024] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0025] O documento Clinical benefit of continuous nebulised Aztreonam Lysine for Inhalation (AZLI) in adults with cystic fibrosis—a retrospective cohort study, 2017 de Morton et al., revela a utilização de lisina como mediador biocompatível e biodegradável para interagir com os grupamentos iônicos do AAS e fucoidana. O documento se difere da presente invenção quanto ao uso pretendido e quanto a formulação.

[0026] O documento Aspirin desensitization in patients with aspirin-induced and aspirin-tolerant asthma: a double-blind study, 2014 de Swierczyńska-Krępa et al., revela o uso em conjunto de ácido acetilsalicílico e lisina por via pulmonar para diagnóstico de pacientes com hipersensibilidade a AAS (asma induzida). O documento se difere da presente invenção quanto ao uso pretendido e por não apresentar formulação farmacêutica.

[0027] O documento Macromolecular prodrugs of aspirin with HPMC: A nano particulate drug design, characterization, and pharmacokinetic studies, 2011 de Hussain et al., relata a síntese de um pró-fármaco macromolecular HPMC-ASP para a melhoria de diversos perfis de biodisponibilidade. O documento se difere da presente invenção quanto formulação farmacêutica e uso pretendido da composição.

[0028] O documento A promising oral fucoidan-based antithrombotic nanosystem: development, activity and safety, 2018 de Da Silvia et a., revela a produção de nanopartículas de quitosana e fucoidana observando o seu perfil

trombótico isolado. O documento se difere da presente invenção quanto a espécie de origem da fucoidana, quanto a formulação farmacêutica e quanto ao uso pretendido da composição.

[0029] O documento WO2016019253A9 revela a utilização de aspirina para tratamentos de quadros tromboembólicos através da via pulmonar, definindo doses, valores e modo de administração. O documento difere-se da presente invenção, pois embora utilize a mesma via (pulmonar), ele correlaciona uma formulação totalmente diferente, com diferentes concentrações de AAS, adjuvantes não citados, promotor de liberação prolongada e outro ativo farmacológico.

[0030] O documento US5576024A comenta o uso de aspirina e um promotor de liberação prolongada, entretanto, se difere da presente invenção pelo tamponamento da formulação com destino a administração oral.

[0031] AJUN, W. *et al.* Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydr. Polym.* 75(4): 566–574, 2009.

[0032] AKWAA, F.; SPYROPOULOS, A. C. Treatment of Bleeding Complications When Using Oral Anticoagulants for Prevention of Strokes. *Curr. Treat. Options*

[0033] AL-GOUSOUS, J.; LANGGUTH, P. A time-scaled convolution approach to construct IVIVC for enteric-coated acetylsalicylic acid tablets. *Pharm.- Int. J. Pharm. Sci.* 73(2): 67–69, 2018.

[0034] ALTMAN, R. *et al.* The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thromb. J.* 2(1): 1, 2004.

[0035] ALTMAN, R.; RIVAS, A. J.; GONZALEZ, C. D. Bleeding tendency in dual antiplatelet therapy with aspirin/clopidogrel: rescue of the template bleeding time in a single-center prospective study. *Thromb. J.* 10(1): 3, 2012.

[0036] ALTMAN, R.; RIVAS, A. J.; GONZALEZ, C. D. Bleeding tendency in dual antiplatelet therapy with aspirin/clopidogrel: rescue of the template bleeding time in a single-center prospective study. *Thromb. J.* 10(1): 3, 2012.

- [0037] ANGIOLILLO, D. J. *et al.* Impact of concomitant low-dose aspirin on the safety and tolerability of naproxen and esomeprazole magnesium delayed-release tablets in patients requiring chronic nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy: an analysis from 5 Phase III studies. *J. Thromb. Thrombolysis* 1–13, 2013.
- [0038] ANGIOLILLO, D. J.; FERREIRO, J. L. Antiplatelet and anticoagulant therapy for atherothrombotic disease: the role of current and emerging agents. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* 13(4): 233–250, 2013.
- [0039] AWTRY, E. H.; LOSCALZO, J. Aspirin. *Circulation* 101(10): 1206–1218, 2000.
- [0040] AWTRY, E. H.; LOSCALZO, J. Aspirin. *Circulation* 101(10): 1206–1218, 2000.
- [0041] AZOULAY, L. *et al.* The concurrent use of antithrombotic therapies and the risk of bleeding in patients with atrial fibrillation: *Thromb. Haemost.* 109(3): 431–439, 2013.
- [0042] BASSAND, J.-P. Current antithrombotic agents for acute coronary syndromes: Focus on bleeding risk. *Int. J. Cardiol.* 163(1): 5–18, 2013.
- [0043] BAUER, M. *et al.* Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility. *Macromol. Biosci.* 12(7): 986–998, 2012.
- [0044] BLIDEN, K. P. *et al.* Drug delivery and therapeutic impact of extended-release acetylsalicylic acid. *Future Cardiol.* 12(1): 45–58, 2016.
- [0045] BLIDEN, K. P. *et al.* Drug delivery and therapeutic impact of extended-release acetylsalicylic acid. *Future Cardiol.* 12(1): 45–58, 2016.
- [0046] BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol* 168(1): 178–195, 1963.
- [0047] CARE. Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals developed by APA's. (2012). at <<http://www.apa.org/science/anguide.html>>
- [0048] CARTER, B. W.; CHICHOINE, L. G.; NELIN, L. D. L-lysine decreases nitric oxide production and increases vascular resistance in lungs isolated from

lipopolysaccharide-treated neonatal pigs. *Pediatr Res.* 55(6): 979-87, 2004

[0049] CASADO-ARROYO, R.; SOSTRES, C.; LANAS, A. Optimizing the Use of Aspirin for Cardiovascular Prevention. *Drugs* 73(8): 803–814, 2013.

[0050] CASADO-ARROYO, R.; SOSTRES, C.; LANAS, A. Optimizing the Use of Aspirin for Cardiovascular Prevention. *Drugs* 73(8): 803–814, 2013.

[0051] CASADO-ARROYO, R.; SOSTRES, C.; LANAS, A. Optimizing the Use of Aspirin for Cardiovascular Prevention. *Drugs* 73(8): 803–814, 2013.

[0052] CHOI, J.-T.; KIM, K.-A. S. AND Y.-K. Prevalence of Aspirin Resistance and Clinical Characteristics in Patients with Cerebral Infarction. *Korean Soc. Biomed. Lab. Sci.* 3): 233–238, 2013.

[0053] CLELAND, J. G. For debate: preventing atherosclerotic events with aspirin. *BMJ* 324(7329): 103, 2002.

[0054] COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. (1991). at <Disponível em <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso: 01 de novembro 2018.>

[0055] COPELAND, C. A. *et al.* A Prospective Multicenter Assessment Of Aztreonam Lysine For Inhalation In The Treatment Of Lung Transplant Recipients With Chronic Lung Allograft Dysfunction AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE. Anais...AMER THORACIC SOC 25 BROADWAY, 18 FL, NEW YORK, NY 10004 USA, 2015

[0056] CRYER, B.; FELDMAN, M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. *Gastroenterology* 117(1): 17–25, 1999.

[0057] CRYER, B.; FELDMAN, M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. *Gastroenterology* 117(1): 17–25, 1999.

[0058] CUMASHI, A. *et al.* A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17(5): 541–552, 2007.

[0059] DA SILVA, L. C. R. P. *et al.* A promising oral fucoidan-based antithrombotic nanosystem: Development, activity and safety. *Nanotechnology.*

doi: 10.1088/1361-6528/aaae5b, 2018.

[0060] DE BERARDIS G *et al.* Association of aspirin use with major bleeding in patients with and without diabetes. *JAMA* 307(21): 2286–2294, 2012.

[0061] DHAND, C. *et al.* Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery. *RSC Adv.* 4(62): 32673–32689, 2014.

[0062] DHAND, C. *et al.* Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery. *RSC Adv.* 4(62): 32673–32689, 2014.

[0063] EL-HAYEK, G. *et al.* COMPETING RISK OF MAJOR ADVERSE CARDIAC EVENTS AND MAJOR BLEEDING IN THE ERA OF NEW ANTIPLA ET THERAPY: A META-ANALYSIS OF RANDOMIZED TRIALS. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63(12_S), 2014.

[0064] FAYON, M. *et al.* ePS06. 5 Post-hoc review of outcomes in patients switching from tobramycin for nebulization solution (TNS) to aztreonam lysine for inhalation (AZLI). *J. Cyst. Fibros.* 15(: S49, 2016.

[0065] FLODIN, N. W. The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine. *J Am Coll Nutr.* 16(1): 7-21, 1997.

[0066] FRANK, L. A. *et al.* Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* 9(: 3151, 2014.

[0067] FRATTANI, F. S. *et al.* Oral Antithrombotic Effects of Acylhydrazone Derivatives. *J. Atheroscler. Thromb.* 20(3): 287–295, 2013.

[0068] GARCÍA RODRÍGUEZ, L. A.; HERNÁNDEZ-DÍAZ, S.; ABAJO, F. J. DE. Association between aspirin and upper gastrointestinal complications: systematic review of epidemiologic studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52(5): 563–571, 2001.

[0069] GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Long-Term Safety of a Coordinated Delivery Tablet of Enteric-Coated Aspirin 325 mg and Immediate-Release Omeprazole 40 mg for Secondary Cardiovascular Disease Prevention in Patients at GI Risk. *Cardiovasc. Ther.* 34(2): 59–66, 2016.

- [0070] GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Long-Term Safety of a Coordinated Delivery Tablet of Enteric-Coated Aspirin 325 mg and Immediate-Release Omeprazole 40 mg for Secondary Cardiovascular Disease Prevention in Patients at GI Risk. *Cardiovasc. Ther.* 34(2): 59–66, 2016.
- [0071] GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Long-Term Safety of a Coordinated Delivery Tablet of Enteric-Coated Aspirin 325 mg and Immediate-Release Omeprazole 40 mg for Secondary Cardiovascular Disease Prevention in Patients at GI Risk. *Cardiovasc. Ther.* 34(2): 59–66, 2016.
- [0072] HAASTRUP, P. F.; GRØNLYKKE, T.; JARBØL, D. E. Enteric Coating Can Lead to Reduced Antiplatelet Effect of Low-Dose Acetylsalicylic Acid. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116(3): 212–215, 2015.
- [0073] HAASTRUP, P. F.; GRØNLYKKE, T.; JARBØL, D. E. Enteric Coating Can Lead to Reduced Antiplatelet Effect of Low-Dose Acetylsalicylic Acid. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116(3): 212–215, 2015.
- [0074] HAYDEN, M. *et al.* Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 136(2): 161–172, 2002.
- [0075] HEDBERG, J. *et al.* Low-dose acetylsalicylic acid and gastrointestinal ulcers or bleeding--a cohort study of the effects of proton pump inhibitor use patterns. *J. Intern. Med.* 274(4): 371–380, 2013.
- [0076] HEDBERG, J. *et al.* Low-dose acetylsalicylic acid and gastrointestinal ulcers or bleeding--a cohort study of the effects of proton pump inhibitor use patterns. *J. Intern. Med.* 274(4): 371–380, 2013.
- [0077] HUSSAIN, M. A. *et al.* Macromolecular prodrugs of aspirin with HPMC: A nano particulate drug design, characterization, and pharmacokinetic studies. *Macromol. Res.* 19(12): 1296–1302, 2011.
- [0078] ITTAMAN, S. V.; VANWORMER, J. J.; REZKALLA, S. H. The Role of Aspirin in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Clin. Med. Res.* 12(3–4): 147–154, 2014.
- [0079] ITTAMAN, S. V.; VANWORMER, J. J.; REZKALLA, S. H. The Role of

Aspirin in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Clin. Med. Res.* 12(3–4): 147–154, 2014.

[0080] IVEY, K. J.; PAONE, D. B.; KRAUSE, W. J. Acute effect of systemic aspirin on gastric mucosa in man. *Dig. Dis. Sci.* 25(2): 97–99, 1980.

[0081] IVEY, K. J.; PAONE, D. B.; KRAUSE, W. J. Acute effect of systemic aspirin on gastric mucosa in man. *Dig. Dis. Sci.* 25(2): 97–99, 1980.

[0082] JEFFREYS, D. Aspirin: The Remarkable Story of a Wonder Drug. [s.l.] Bloomsbury Publishing, 2008.

[0083] JIN, W. et al. A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans. *Carbohydr. Polym.* 91(1) :1-6, 2013.

[0084] KAMEL, P. Lysine. <Disponível em <<https://examine.com/supplements/lysine>>. Acesso: 01 de novembro 2018.>

[0085] KELLY, J. P. *et al.* Risk of aspirin-associated major upper-gastrointestinal bleeding with enteric-coated or buffered product. *Lancet Lond. Engl.* 348(9039): 1413–1416, 1996.

[0086] KOLBER, M. R.; KOROWNYK, C. An aspirin a day? Aspirin use across a spectrum of risk: cardiovascular disease, cancers and bleeds. *Expert Opin. Pharmacother.* 15(2): 153–157, 2014.

[0087] KOWALSKI, M. L. Aspirin-sensitive rhinosinusitis and asthma. *Clin Allergy Immunol.* 19: 147-75, 2007.

[0088] KUNADIAN, V. *et al.* Aspirin, Platelet P2Y12 Receptor Inhibitors, and Other Oral Antiplatelets: Comparative Pharmacology and Role in Elective PCI. *Interv. Cardiol. Clin.* 2(4): 527–535, 2013.

[0089] LEFRANÇAIS, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544(7648): 105–109, 2017.

[0090] LOURENÇO, A. L. *et al.* Synthesis and mechanistic evaluation of novel N'-benzylidene-carbohydrazide-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine derivatives as non-anionic antiplatelet agents. *Eur. J. Med. Chem.* 135(: 213–229, 2017. ALE, M. T.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction

methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar. Drugs* 9(10): 2106–2130, 2011a.

[0091] MARTÍN-MERINO, E. *et al.* Represcription of low-dose acetylsalicylic acid after discontinuation in patients receiving treatment for secondary cardiovascular disease prevention in the UK. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* 14(4): 319–326, 2014.

[0092] OAKLEY, C.; LARJAVA, H. Hemostasis, coagulation, and complications. *Endod. Top.* 24(1): 4–25, 2012.

[0093] Patent. Satish Gokhale, Subhas Balaram Bhowmick, Ashwin Bhujanga Rao, inventores, Sun Pharmaceutical Industries Limited, cessionária, Dry powder inhaler, World Intellectual Property Organization patent WO2004045487A2, 2002.

[0094] Patente. Anwar A. Hussain. Lewis W. Dittert, Thomas S. Foster, inventores, University of Kentucky Research Foundation, cessionária, Novel method of administering aspirin and dosage forms containing same, United States patent US4885287A, 1988.

[0095] Patente. Cynthia M. Blasé, Garnet E. Peck, inventores, Blase; Cynthia M. Peck, Garnet E. cessionários, Buffered matrix aspirin, United States patent US5576024A, 1991.

[0096] Patente. David A. Edwards, Robert S. Langer, Rita Vanbever, Jeffrey Mintzes, Jue Wang, Donghao Chen, inventores, Penn State Research Foundation, Massachusetts Institute of Technology, cessionários, Preparation of novel particles for inhalation, United States patent US6652837B1, 1996.

[0097] Patente. Farid Vaghefi, inventor, Vivorx Pharmaceuticals Inc, cessionária, Dry powder inhaler, United States patente US5875776A, 1996.

[0098] Patente. Kambiz YADIDI, inventor, OTITOPIC Inc, cessionário, Dry powder inhaler and methods of use, United States patent US20140174437A1, 2012.

[0099] Patente. Kambiz Yadidi, inventor, Otitopic Inc., cessionário. Dry powder formulations for inhalation, World Intellectual Property Organization patent

WO2016019253A9, 2014.

[0100] Patente. Kambiz Yadidi, inventor, Otitopic Inc., cessionário. Dry powder formulations of aspirin for inhalation, World Intellectual Property Organization patent WO2017100656A1, 2015.

[0101] Patente. Kambiz Yadidi, inventor, Otitopic Inc., cessionário. Dry powder inhaler and methods of use, World Intellectual Property Organization patent WO2014098945A1, 2012.

[0102] Patente. Masao Kitajima, Yoozi Tsuneoka, Asaji Kondo, inventores, Fujifilm Corp, cessionária, Method of producing micro-capsules enclosing acetylsalicylic acid therein, United States patent US3703576A, 1969.

[0103] Patente. Peter D. Hodson, Stephen W. Stein, Herbert C. Chiou, Zhaolin Wang, Thomas S. Robison, Michael K. Domroese, Blake D. Walburg, inventores, Adamis Pharmaceuticals Corp, cessionário, Dry powder inhalers, United States patent US8985102B2, 2009.

[0104] Patente. Scott Jenkins, Gary G. Liversidge, inventores, Elan Pharma International, Limited cessionária, Nanoparticulate clopidogrel and aspirin combination formulations, World Intellectual Property Organization patent WO2006138214A1, 2005.

[0105] Patente. Shouzhu HAO, inventor, Beijing Century Biocom Pharmaceutical Tech Co Ltd, cessionário, Methods of treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases with fucoidan, United States patent US20090170801A1, 2006.

[0106] A patente CN101874786A, de Qingping Jin; Bin Yu; Xudong Liu; Xing Tang, inventores, Zhejiang Jinhua Conba Bio Pharm Co Ltd, cessionário, Aspirin enteric-coated preparation prepared by solvent-free extrusion spheronization method, 2010.

[0107] A patente CN101491508B Jianqing Jiang; Junbi Zhou; Yufeng Li, inventores Shanghai Micro Pellets Pharmac cessionários, Preparation method of aspirin Intestine-soluble micro-pill capsules, 2009.

[0108] A patente CN104211763A Peng Shiqi; Zhao Ming; Wu Jianhui; Wang

Yuji; Ma Haiping inventores, Univ Capital Medical Sciences cessionário, Aspirin-Arg-Gly-Asp-Val conjugate, synthesis, nano structure, and application thereof as drug carrying system, Chinese patent, 2013.

[0109] A patente CN104188917A Li Jiansheng; Wang Lihua; Jia Hongyu inventores, Tianjin Vocational Inst cessionário, Preparation method of controlled-release aspirin powder, Chinese patent, 2011.

[0110] RAJAN, J. P. *et al.* Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: a meta-analysis of the literature. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135(3): 676–681, 2015.

[0111] ROSSI, S. *et al.* Drug release and washability of mucoadhesive gels based on sodium carboxymethylcellulose and polyacrylic acid. *Pharm. Dev. Technol.* 4(1): 55–63, 1999.

[0112] RUGE, C. A.; KIRCH, J.; LEHR, C.-M. Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers—therapeutic possibilities and technological challenges. *Lancet Respir. Med.* 1(5): 402–413, 2013.

[0113] SAITO, M. S. *et al.* Antiplatelet pyrazolopyridines derivatives: pharmacological, biochemical and toxicological characterization. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31(6): 1591–1601, 2016.

[0114] SALLUM, L. F. *et al.* Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 133(: 107–111, 2014.

[0115] SEO, P. J. *et al.* Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats. *Gut Liver* 6(2): 210–217, 2012.

[0116] SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64(: 163–174, 2012.

[0117] SMOLA, M.; VANDAMME, T.; SOKOLOWSKI, A. Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases. *Int. J. Nanomedicine* 3(1): 1–19, 2008.

- [0118] SØRENSEN, B. *et al.* The role of fibrinogen: a new paradigm in the treatment of coagulopathic bleeding. *Thromb. Res.* 128 Suppl 1(S13-16, 2011.
- [0119] SULAIMAN, I. *et al.* The impact of common inhaler errors on drug delivery: investigating critical errors with a dry powder inhaler. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 30(4): 247–255, 2017.
- [0120] ŚWIERCZYŃSKA-KRĘPA, M. *et al.* Aspirin desensitization in patients with aspirin-induced and aspirin-tolerant asthma: a double-blind study. *J Allergy Clin Immunol.* 134(4): 883-90, 2014.
- [0121] VOGEL, H. G.; VOGEL, W. H. *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays.* 2. ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1997.
- [0122] WANG, J. *et al.* Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol.* ;46(1): 6-12, 2010.
- [0123] ZATTA, K. C. *et al.* An Inhalable Powder Formulation Based on Micro- and Nanoparticles Containing 5-Fluorouracil for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Nanomaterials* 8(2): 75, 2018.
- [0124] ZELIKIN, A. N.; EHRHARDT, C.; HEALY, A. M. Materials and methods for delivery of biological drugs. *Nat. Chem.* 8(11): 997, 2016.
- [0125] ZHANG, Y. Apixaban for oral antithrombotic therapy: is a new era coming? *Mol. Cell. Ther.* 2(1): 4, 2014.
- [0126] ZHAO, X. *et al.* Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb. Res.* 144(: 46–52, 2016.
- [0127] GEBUIS, E. P. *et al.* Vitamin K1 supplementation to improve the stability of anticoagulation therapy with vitamin K antagonists: a dose-finding study. *haematologica* 96(4): 583–589, 2011.
- [0128] MCGRATH, E. R. *et al.* Novel oral anticoagulants: A focused review for stroke physicians. *Int. J. Stroke* 9(1): 71–78, 2014.
- [0129] WARKENTIN, T. E. Agents for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 24(4): 755–775, 2010.

- [0130] AKWAA, F.; SPYROPOULOS, A. C. Treatment of Bleeding Complications When Using Oral Anticoagulants for Prevention of Strokes. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 15(3): 288–298, 2013.
- [0131] KENNEDY, B. et al. Emerging anticoagulants. *Curr. Med. Chem.* 19(20): 3388–3416, 2012.
- [0132] BACCHUS, F. R.; CROWTHER, M. Thrombosis. *Essent. Cardiol.* 67–77, 2013.
- [0133] SCAGLIONE, F. New oral anticoagulants: comparative pharmacology with vitamin K antagonists. *Clin. Pharmacokinet.* 52(2): 69–82, 2013.
- [0134] MCGRATH, E. R. et al. Novel oral anticoagulants: A focused review for stroke physicians. *Int. J. Stroke* 9(1): 71–78, 2014.
- [0135] FAREED, J.; THETHI, I.; HOPPENSTEADT, D. Old Versus New Oral Anticoagulants: Focus on Pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52(1): 79–99, 2012.
- [0136] BERNARD, J.; LIONEL, H. Antithrombotic Agents: Platelet Inhibitors, Acute Anticoagulants, Fibrinolytics, and Chronic Anticoagulants. *Drugs Heart Expert Consult-Online Print* 2013.
- [0137] QURESHI, Z.; HOBSON, A. R. Clopidogrel “Resistance”: Where are We Now? *Cardiovasc. Ther.* 31(1): 3–11, 2013.
- [0138] AHLUWALIA, K.; BHANWRA, S. Antiplatelet therapy: present status and its future directions. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* 3(2): 260, 2014.
- [0139] DELOUGHERY, T. G. Antiplatelet Agents. In: DELOUGHERY, T. G. (Ed.). *Hemost. Thromb.* [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 133–137.
- [0140] KOHLI, S. Old and New Players in Oral Antiplatelet Therapy in Treatment of Acute Coronary Syndrome. *Nepal J. Med. Sci.* 1(1), 2012.
- [0141] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0142] Dessa forma, diante destas afirmações, visando à administração do medicamento por via pulmonar a fim de diminuir os efeitos adversos e com possível redução de dose, foi desenvolvida uma inovadora formulação farmacêutica de micropartículas de liberação controlada para tratamento crônico ou agudo de quadros trombóticos para administração pulmonar sítio-específico.

[0143] As partículas foram desenvolvidas utilizando hidroxipropilmetilcelulose (HPMC F4M) como polímero, um promotor de bioadesão e liberação prolongada, contendo o AAS, como antiagregante plaquetário, associado à fucoidana extraída da espécie *Aschophyllum Nodosum*, tornando a partícula alvo-específico e com atividade nos processos de adesão e agregação plaquetária, pois a mesma possui seletividade para P-selectina (expressa em locais altamente trombogênicos, por exemplo, lesão endotelial e plaquetas ativadas).

[0144] A presente invenção apresenta diversas vantagens como: a microestruturação das partículas de AAS baseada nos conceitos de nanotecnologia: resultados relacionados ao aumento do tempo de meia-vida, capacidade de retenção e permeação mucosal, propriedades bioadesivas e de liberação prolongada, que poderão favorecer a redução e frequência da dose administrada.

[0145] Outra vantagem da presente invenção se refere a modificação da via de administração que causa a redução dos efeitos de primeira passagem, maior aceitação de pacientes crônicos, ação no local de biogênese e reservatório de plaquetas. Recentemente foi realizado um estudo (LEFRANÇAIS *et al.* 2017) onde evidenciava os pulmões como os locais mais importantes de biogênese das plaquetas, refutando que a medula óssea era o principal órgão de produção. Com isso, além da via pulmonar ser um local de acesso sistêmico para fármacos, a inibição das plaquetas no pulmão pode ser uma terapia de grande valor.

[0146] A associação com um polissacarídeo natural (Fucoídano extraída da espécie *Aschophyllum Nodosum*) pode ser benéfica no que tange o perfil antitrombótico, devido à atividade da mesma nos processos de adesão e agregação plaquetária.

[0147] Inclusão da L-lisina na estruturação da partícula: este aminoácido é particularmente importante para a interação AAS-fucoídano, e tem atividade secundária de aumentar a resistência vascular, regeneração tecidual, aumentar imunidade e potencial atividade anti-mucosite.

[0148] Considerando esses pontos, é possível perceber que, se trata de uma terapia inovadora para tratamento de quadros trombóticos pela via pulmonar, excluindo assim todos os efeitos indesejados causados pela administração por via oral (quadros hemorrágicos e piora de úlceras), diminuindo a taxa de desistência relacionada com tratamentos mais prolongados.

[0149] Ainda, relacionado à via oral, o efeito de primeira passagem no fígado faz com que seja necessária uma dose maior de fármaco administrado, diferente do que ocorre no pulmão, no qual este mecanismo é reduzido.

[0150] Relacionado à facilidade de administração, o proposto pode ser utilizado com diversos dispositivos já disponíveis no mercado e de fácil aceitação.

[0151] Ainda, é possível a utilização da micropartícula com vários tipos de medicamentos anticoagulantes na micropartícula, como o apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban, edoxaban, hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban, dabigatran e misturas destes. Além disso, sendo possível a utilização de diversos fármacos antiagregantes plaquetários além do AAS, em conjunto ou não, como o clopidogrel, cangrelor, ticagrelor, elinogrel, abciximab, eptifibatida, tirofiban, terutroban, picotamida, vorapaxar, atopaxar, dipiridamol e Cilostazol. Os fármacos citados são apenas exemplos e pode-se estender a presente formulação para qualquer fármaco anticoagulante ou antiagregante plaquetária disponível.

[0152] Tratamento de quadros trombóticos arteriais, primários ou secundários,

agudo ou crônico (múltiplas administrações) caso o fármaco de escolha for um antiagregante plaquetário como o AAS e, no caso da utilização de anticoagulantes, quadros trombóticos venosos.

[0153] O *escale up* industrial pode ser facilmente realizado, sendo passível de comercialização.

[0154] A presente invenção apresenta como conceito inventivo os seguintes objetos:

[0155] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta a micropartícula que compreende medicamento antiagregante e/ou anticoagulante, polímero, aminoácido e polissacarídeo natural.

[0156] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica, que compreende a micropartícula conforme aqui descrita e a composição estar na forma pulverulenta.

[0157] A presente invenção apresenta como terceiro objeto o processo de preparação de micropartícula compreendendo as etapas de:

a) misturar solução de L-lisina, água ultrapura e propilenoglicol 2% sob agitação magnética moderada (solução A);

b) solubilizar o ácido acetilsalicílico (AAS) em água ultrapura e acetona com auxílio de um vórtex (solução B);

c) adição da solução B em A lentamente, sob agitação magnética;

d) adição de solução de fucoidana à mistura sob agitação;

e) secagem da mistura por aspensão; e

f) adição da dispersão de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), previamente preparada, à mistura.

[0158] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição farmacêutica, para preparar um medicamento para tratar a trombose.

[0159] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0160] São apresentadas as seguintes figuras:

[0161] A Figura 1 apresenta uma estrutura ilustrativa, que se acredita ser da micropartícula. As cores das micropartículas estão esquematizadas como da foto, onde os círculos pretos representam fucoidana, os círculos azuis a lisina e os círculos vermelhos o AAS.

[0162] A Figura 2 apresenta uma ilustração do processo para a produção da formulação MP/F4M. Abreviaturas: AAS= ácido acetilsalicílico, g = gramas; UP = ultrapura e MP = micropartículas.

[0163] A Figura 3 apresenta imagens, por microscopia de varredura, das formulações após processo de secagem em aumentos de 5000 e 10000x.

[0164] A Figura 4 apresenta um gráfico sobre a recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M avaliado nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 (n = 3).

[0165] A Figura 5 apresenta um gráfico sobre o perfil de liberação *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro. Abreviaturas: AAS = ácido acetilsalicílico; FPS = Fluido Pulmonar Simulado; FLA = Fluido Lisossomal Artificial; FGS = Fluido Gástrico Simulado e FIS = Fluido Intestinal Simulado.

[0166] A Figura 6 apresenta o desempenho de deposição do AAS em cada estágio do Impactador em Cascata de Andersen para a formulação MP/F4M e AAS puro e * = p < 0,05. Abreviaturas: FR = fração respirável.

[0167] A Figura 7 apresenta o perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando fluido pulmonar simulado como meio receptor. Abreviaturas: AAS = ácido acetilsalicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

[0168] A Figura 8 apresenta o perfil de permeação em mucosa esofágica suína *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando fluido pulmonar simulado como meio receptor. Abreviaturas: AAS = ácido acetilsalicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

[0169] A Figura 9 apresenta a avaliação da atividade anticoagulante de fucoidana em diversas concentrações através dos ensaios de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e * = p <

0,05.

[0170] A Figura 10 apresenta a avaliação da atividade anticoagulante das formulações MP/F4M e MP/Leu através dos ensaios de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT).

[0171] A Figura 11 apresenta a avaliação da atividade pró-agregante plaquetária da fucoidana em diversas concentrações através do ensaio de agregação e * = $p < 0,05$.

[0172] A Figura 12 apresenta a avaliação da atividade antiagregante plaquetária através do ensaio de agregação plaquetária e * = $p < 0,05$.

[0173] A Figura 13 apresenta a avaliação da ligação das plaquetas com diferentes concentrações de fucoidana com proteína recombinante PSGL através do ensaio de adesão plaquetária in vitro. * = $p < 0,05$.

[0174] A Figura 14 apresenta a avaliação da ligação das plaquetas com diferentes concentrações da formulação com e sem proteína recombinante PSGL através do ensaio de adesão plaquetária in vitro. * = $p < 0,05$.

[0175] A Figura 15 apresenta a avaliação da atividade hemolítica in vitro das formulações MP/F4M e MP/F4M B * = $p < 0,05$.

[0176] A Figura 16 apresenta a avaliação da antiagregante plaquetária ex vivo do fármaco puro (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando como agonista plaquetária o ADP. * = $p < 0,05$

[0177] A Figura 17 apresenta a avaliação da antiagregante plaquetária ex vivo do fármaco puro (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando como agonista plaquetária o colágeno. * = $p < 0,05$

[0178] A Figura 18 apresenta a avaliação do perfil antitrombótico in vivo do fármaco puro (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 6, 24 e 72 horas através da trombose arterial. * = $p < 0,05$

[0179] A Figura 19 apresenta a avaliação do tempo de sangramento in vivo do fármaco puro (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M no tempo de três dias, com uma administração por dia * = $p < 0,05$

[0180] A Figura 20 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do

coração dos animais provenientes do tempo de sangramento, evidenciando os cardiomiócitos e as fibras musculares com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. Abreviaturas: Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar; MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar; AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.

[0181] A Figura 21 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do estômago dos animais provenientes do tempo de sangramento, evidenciando as vilosidades com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

[0182] A Figura 22 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do intestino dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

[0183] A Figura 23 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do fígado dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

[0184] A Figura 24 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do rim dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos glomérulos renais e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

[0185] A Figura 25 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estruturados alvéolos e espaços alveolares e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

[0186] A Figura 26 apresenta fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estruturados alvéolos e espaços alveolares e ausência de hiperemia e hemorragia. (*) = locais de espessamento do septo alveolar com presença de células inflamatórias (fibroblastos, macrófagos ou neutrófilos).

Descrição Detalhada da Invenção

[0187] A presente invenção provê micropartículas contendo ácido acetilsalicílico, fucoidana, L-lisina e um promotor de liberação controlada para administração em via respiratória, diminuindo os riscos de aparecimento ou agravamento de úlceras, gastrites e outros problemas gastrointestinais.

[0188] As micropartículas são, ainda, para uso em eventos trombóticos.

[0189] Os materiais não definidos como ativos farmacológicos, ou seja, inertes, não apresentam nenhuma atividade relacionada com o tratamento de quadros trombóticos. Contudo, a L-lisina, além de agir como ligante para a formação da partícula é um aminoácido essencial que está presente na formulação com atividade secundária de aumentar a resistência vascular, regeneração tecidual, aumentar a imunidade e potencial atividade anti-mucosite.

[0190] A fim de melhor se definir os termos da presente invenção, a solubilidade do fármaco apresentada nas realizações do presente pedido está definida na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira, publicada pela Fiocruz em 2010:

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

[0191] A presente invenção apresenta os seguintes objetos e concretizações:

[0192] Em um primeiro objeto a invenção apresenta micropartícula compreendendo medicamento antiagregantes e/ou anticoagulante, polímero, aminoácido e polissacarídeo natural.

[0193] Em uma realização, os medicamentos antiagregantes possíveis de serem utilizados são: ácido acetilsalicílico, clopidogrel, cangrelor, ticagrelor, elinogrel, abciximab, eptifibatida, tirofiban, terutroban, picotamida, vorapaxar , atopaxar , dipiridamol, cilostazol ou misturas destes.

[0194] Em uma realização, os medicamentos anticoagulantes possíveis de serem utilizados são: ácido acetilsalicílico, apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban, edoxaban, hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban, dabigatran ou misturas destes.

[0195] Em uma realização, o medicamento é ácido acetilsalicílico.

[0196] Em uma realização, os possíveis polímeros a serem utilizados são: leucina (aminoácidos), a quitosana (polissacarídeos), co-polímero de polioxipropileno e polioxoetileno (polaxameros) e HPMC (celulose) ou misturas destes, preferencialmente o polímero é o HPMC.

[0197] Em uma realização, o aminoácido a ser utilizado é a L-lisina.

[0198] Em uma realização, o polissacarídeo natural a ser utilizado é a fucoidana, extraído de polissacarídeo sulfatado extraído de qualquer alga que apresente inibição da P-selectina.

[0199] Em uma realização, o polissacarídeo natural é extraído de *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata*, *Fucus evanescens*, *Fucus serratus*, *Fucus distichus*, *Fucus spiralis*, ou *Ascophyllum nodosum*, mais preferencialmente extraída de alga sem efeito anticoagulante e/ou proagregante acentuado.

[0200] Em uma realização, a fucoidana é extraída de *Ascophyllum nodosum*.

[0201] Em uma concretização a micropartícula compreende um diâmetro de partícula de 1 a 5 μm .

[0202] Em uma realização, a micropartícula compreende medicamento antiagregante ou anticoagulante na faixa de 15 a 30% dos sólidos totais da

micropartícula.

[0203] Em uma concretização a micropartícula compreende 18 a 24% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 35 a 42% dos sólidos totais de L-Lisina, 35 a 42% dos sólidos totais de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e 0,5 a 3% dos sólidos totais de fucoidana.

[0204] Em uma concretização a micropartícula compreende 0,15g ou 19,87% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 0,3g ou 39,74% dos sólidos totais de L-Lisina, 0,3g ou 39,74% dos sólidos totais de HPMC e 0,005g ou 0,66% dos sólidos totais de fucoidana.

[0205] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica, que compreende a micropartícula conforme aqui descrita e a composição estar na forma pulverulenta.

[0206] Em um terceiro objeto a presente invenção revela o processo de preparação de micropartícula compreendendo as etapas de:

a) misturar solução de L-lisina, água ultrapura e propilenoglicol 2% sob agitação magnética moderada (solução A);

b) solubilizar o ácido acetilsalicílico (AAS) em água ultrapura e acetona com auxílio de um vórtex (solução B);

c) adição da solução B em A lentamente, sob agitação magnética;

d) adição de solução de fucoidana à mistura sob agitação;

e) secagem da mistura por aspersão; e

f) adição da dispersão de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), previamente preparada, à mistura.

[0207] Em uma realização do processo, a etapa a compreende:

- L-Lisina na faixa de 35 a 42%, preferencialmente 39,74%;

- água ultrapura na faixa de 50 a 70 mL, mais preferencialmente 60 mL

- propilenoglicol 2% na faixa de 3 a 6 mL, mais preferencialmente de 4 mL

- a agitação ser de 34 a 40°C por 40 a 80 minutos, mais preferencialmente a 37°C por 60 minutos;

em que o propilenoglicol é um agente estabilizante à presença de ácido

acetilsalicílico e que pode ser excluído caso o fármaco utilizado seja mais estável.

[0208] Em uma realização do processo a etapa b compreende:

- AAS na faixa de 18 a 24%, mais preferencialmente 19,87%;
- água ultrapura na faixa de 1 a 5 mL, mais preferencialmente 2 mL;
- acetona na faixa de 1 a 5 mL, mais preferencialmente 2 mL;
- a etapa ocorrendo no tempo de 1 minuto;

em que, se o fármaco de escolha for ligeiramente solúvel, solúvel, facilmente solúvel ou muito solúvel em água, o uso da acetona é dispensável, sendo a quantidade de água ultrapura então adicionada na faixa de 2 a 8 mL, mais preferencialmente 4 mL.

[0209] Em uma realização do processo a etapa c compreende agitação por 3 a 10 minutos, mais preferencialmente a 5 minutos.

[0210] Em uma realização do processo a etapa d compreender agitação por 3 a 10 minutos, mais preferivelmente por 5 minutos e fucoidana na faixa de 0,5 a 3%, mais preferivelmente 0,66%.

[0211] Em uma realização do processo, a etapa e compreende:

- a. tamanho do bico atomizador de 5 a 10 μm , mais preferencialmente a 7 μm ;
- b. temperatura de saída do bico atomizador de 100 a 140 °C, mais preferencialmente a 120 °C;
- c. temperatura no ciclone de coleta do produto pulverulenta de 60 a 80 °C, mais preferencialmente a 70 °C;
- d. Velocidade do fluxo de 10 a 20%, mais preferencialmente a 15% e
- e. Velocidade de aspiração de 80 a 100%, mais preferencialmente a 100%.

[0212] Em uma realização do processo, a etapa f compreender preparação da dispersão de HPMC, em que se adiciona HPMC em água ultrapura sob agitação magnética moderada, posteriormente mantida refrigerada durante a noite (temperatura de 2 a 10 °C, mais preferencialmente a 4°C).

[0213] Em uma realização do processo, compreende-se:

- HPMC na faixa de 35 a 42%, mais preferivelmente 39,74%;

- água ultrapura na faixa de 30 a 40 mL, mais preferivelmente 37 mL;
- a agitação ser de 34 a 40°C por 40 a 80 minutos, mais preferencialmente a 37°C por 60 minutos.

[0214] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição farmacêutica, para preparar um medicamento para tratar a trombose.

[0215] Em uma realização do uso, compreende-se pelos eventos trombóticos serem quadros trombóticos arteriais primários ou secundários, agudo ou crônico e quadros trombóticos venosos.

[0216] Em uma realização, os eventos trombóticos são preferencialmente trombose arterial.

[0217] Em uma realização do uso, compreende-se aplicação para administração nasal e/ou pulmonar.

[0218] Em uma realização, o uso compreende ser na forma pulverulenta.

[0219] Em uma realização do uso, compreende-se a administração da composição em pó envolver uso de aparato e/ou dispositivo.

[0220] A fim de se obter melhor clareza e compreensão dos termos e definições aqui usados para descrever a presente invenção, segue uma breve descrição dessas definições e particularidades para assim poder evitar possíveis dúvidas de interpretação:

Secagem por aspersão

[0221] A secagem por aspersão é muito utilizada devido a sua relativa rapidez, por geralmente ser realizado em uma única etapa, apresentar baixo custo e capacidade de ser transponível para escala industrial, sendo uma das técnicas mais utilizadas para obtenção de micropartículas (CAL & SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB & CAL, 2010).

[0222] A secagem por aspersão pode ser dividida em três etapas: (1) atomização; (2) contato líquido-ar aquecido e consequente evaporação do solvente e (3) separação sólido-ar (CAL & SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB & CAL, 2010).

[0223] A atomização consiste na diminuição do tamanho de gotícula de suspensão ou soluções líquidas misturadas a um fluxo de ar aquecido. Então, há uma troca de calor entre as gotículas atomizadas e o ar, evaporando o solvente em segundos. Logo após, ocorre a separação das partículas sólidas do ar, possibilitando a coleta do pó formado (VEHRING, 2008; CAL & SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB & CAL, 2010).

[0224] Esse processo ocorre em um equipamento denominado mini spray Dryer, que possibilita a inserção e modificações de diversos parâmetros de secagem, como o tamanho do bico atomizador para diferentes tamanhos de partícula, temperatura de saída do vapor, temperatura na torre de coleta, velocidade de fluxo de secagem e velocidade de aspiração.

Trombose arterial primária e secundária

[0225] O trombo arterial se forma sob condições de alta força de cisalhamento, sendo constituído basicamente por plaquetas agregadas, envolvidas em rede de fibrina (HAGEDORN et al., 2010). Geralmente, os trombos arteriais são formados sobre placas de ateroma instáveis. Em situações de hipercoagulabilidade, os trombos podem se desenvolver até mesmo em superfícies endoteliais aparentemente normais (SILVESTRI et al., 2014).

[0226] A aterosclerose é uma doença inflamatória multifatorial, que acomete principalmente a camada íntima das artérias de médio e grande calibre. Inicia-se com uma lesão no endotélio relacionado, principalmente, com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e hipertensão. Com isso, a permeabilidade da camada íntima para lipoproteínas plasmáticas carregadas com colesterol é aumentada.

[0227] A retenção destas lipoproteínas no local ocasiona a oxidação e recrutamento de monócitos e linfócitos. Os monócitos, ao migrarem para o espaço subendotelial diferenciam-se em macrófagos e capturam as LDL oxidadas (sendo denominadas então de células espumosas) (JACKSON, 2011). Além disso, macrófagos entram em apoptose, promovendo o desenvolvimento das placas necróticas (também chamadas de placas

lipídicas), ocasionando a liberação de lipídeos (em sua maioria colesterol) e incorporação dos mesmos à placa aterosclerótica (SEIMON & TABAS, 2009).

[0228] A principal causa da formação do trombo arterial é a ruptura da placa aterosclerótica, causando uma completa ou parcial oclusão do vaso (TURPIE & ESMON, 2011; ULRICHTS et al., 2011). Quando essa ruptura ocorre, os lipídios aderidos são expostos ao sangue circulante no lúmen arterial. Esses lipídios contêm FT (fator tecidual) e fragmentos de colágeno, que são altamente trombogênicos (DAVIES, 2000). Pacientes com doenças cardiovasculares apresentam maior risco, por exibirem maior quantidade de FT circulante (MACKMAN, 2012; GALANAUD; LAROCHE & RIGHINI, 2013; SILVESTRI et al., 2014).

[0229] Finalmente, os eventos trombóticos arteriais podem ser divididos em primários e secundários. Os quadros primários são estabelecidos quando o paciente não apresentou quadro de trombose arterial prévio, sendo a primeira vez de ocorrência. Já os quadros secundários são definidos em todos os pacientes que já apresentaram trombose arterial prévia, tratada ou não.

Trombose venosa

[0230] O tromboembolismo venoso compreende a trombose venosa profunda e o embolismo pulmonar. Quando parte do trombo se rompe, ele pode se deslocar até os pulmões e interromper ou dificultar a passagem de sangue em uma artéria pulmonar ou um de seus ramos (MACKMAN, 2012; ERIKSSON et al., 2014).

[0231] Em 1856, Rudolph Virchow propôs uma tríade de causas do tromboembolismo venoso: estase venosa (reduzida circulação sanguínea nas veias), injúria no endotélio vascular e hipercoagulabilidade do sangue (TURPIE & ESMON, 2011; GALANAUD; LAROCHE & RIGHINI, 2013).

[0232] A estase venosa, que pode ser causada por inúmeros fatores, como imobilidade local, cirurgias ortopédicas e aumento da pressão venosa, promove a formação do trombo por não conseguir remover os fatores de coagulação ativados do local de injúria vascular (REYES et al., 2013; KUDERER, 2015).

Evidências ainda sugerem que o fator tecidual (FT) circulante, ligado a microvesículas, apresenta um papel fundamental na formação do trombo venoso, assim como as plaquetas na formação do trombo arterial (TURPIE & ESMON, 2011; KUDERER, 2015). Essas microvesículas ligam-se às células endoteliais ativadas e transferem o FT para elas, iniciando a cascata de coagulação e a formação do coágulo. Isso justifica o fato da maior parte dos trombos venosos serem formados em regiões com circulação sanguínea lenta ou deficiente (KROEGEL & REISSIG, 2003; KUDERER, 2015).

[0233] Assim, a principal causa da formação do trombo venoso é a ativação da cascata de coagulação, que precede a ativação plaquetária e sua agregação, consistindo principalmente de um agregado de eritrócitos e grande quantidade de fibrina. (TURPIE & ESMON, 2011; KUDERER, 2015).

Exemplos

[0234] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1

[0235] O desenvolvimento da formulação MP/F4M leva em consideração as concentrações definidas, os ativos farmacológicos (AAS e Fucoïdana), os adjuvantes (L-Lisina e hidroxipropilmetilcelulose – HPMC) e os solventes (água e acetona) nas concentrações demonstradas e na forma de preparação. Uma ilustração esquemática do que acreditamos ser a estrutura da micropartícula é apresentada na Figura 1.

[0236] A razão para os constituintes pode ser modificada, sem que gere prejuízo aos efeitos desejados no produto final.

[0237] Considerando AAS igual a 19,80 a 20% dos sólidos totais, então a L-Lisina seria igual a 39,5 a 40% dos sólidos totais, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) igual a 39,5 a 40% dos sólidos totais e fucoïdana igual a 0,5 a 1% dos sólidos totais.

[0238] A título de exemplo, uma maior quantidade de AAS pode ser utilizada,

sendo que a razão dos outros constituintes precisariam ser modificada, assim como os solventes. Toda e qualquer modificação precisa levar em consideração os ensaios posteriores, visto que, foram realizadas com as concentrações e a formulação aqui descrita, sem nenhuma modificação quando não indicada.

[0239] As análises cromatográficas, quando necessária quantificação de AAS, foram realizadas por HPLC-UV com auxílio de um cromatógrafo Perkin Elmer[®], coluna Waters Nova-Pak[®] (C18, 4 µm, 3,9 x 150 mm) e pré-coluna do mesmo fabricante. A fase móvel utilizada consistiu em mistura de água ultrapura, acetonitrila e ácido fosfórico na proporção 40: 60: 0,2 (v:v). As condições cromatográficas foram: volume de injeção 10 µL, fluxo de 0,8 mL/min, detecção em UV 237 nm e tempo de análise de 3 minutos, com método já descrito em literatura.

[0240] Inicialmente, desenvolvemos uma formulação de pó inalável para *delivery* pulmonar de AAS associado à fucoidana, através da técnica de secagem por aspersão (Mini Spray Dryer B-290[®], BÜCHI Labortechnik AG[®]). As condições do processo de secagem consideraram a metodologia previamente descrita por Zatta e colaboradores (2018) com modificações no fluxo da bomba e temperatura de entrada e saída.

[0241] O rendimento do processo de secagem foi calculado para cada formulação considerando a massa total coletada em função da massa total de sólidos inicial de cada formulação (n = 3) (Tabela 1).

Tabela 1 – Condições do processo de secagem (Mini Spray-Dryer B-290[®])

Spray Mesh – Tamanho do bico (µm)	7
Entrada °C	120
Saída °C	68
Velocidade de aspiração %	100
Fluxo da bomba %	15
Limpador de bico	1
Modo	Aberto
Spray Mesh – Tamanho do bico (µm)	7

[0242] A formulação constituiu em misturas de diversos componentes, como segue:

[0243] Solução de L-Lisina (0,3 g) + H₂O + propilenoglicol 2% mantida sob agitação magnética moderada a 37 °C por 60 minutos (Solução A).

[0244] Após, em um recipiente separado, foi solubilizado o AAS (0,15 g) em água e acetona com auxílio de vortex por um minuto (Solução B).

[0245] A solução B foi lentamente adicionada à solução A, utilizando uma pipeta Pasteur e permanecendo sob agitação magnética por mais cinco minutos. Então, com o auxílio de um funil, uma solução de fucoidana (100 µg/mL) previamente preparada foi adicionada. A agitação continuou por mais cinco minutos (solução MP) e seguindo para secagem por aspersão (MP).

[0246] Por fim, foi preparada uma dispersão de HPMC (0,3 g) em água ultrapura (UP) sob agitação magnética moderada a 37 °C por 60 minutos, posteriormente mantida sob refrigeração *overnight* (4 °C ± 1), na qual foi vertida na solução MP com auxílio de um funil, sendo denominada, a título de exemplo, de MP/F4M (Formulação final) (Figura 2).

Diâmetro médio da partícula e Distribuição Granulométrica

[0247] Foi utilizada a técnica de difração de laser através da via seca com auxílio do equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments[®], Reino Unido), em associação à unidade Scirocco[®] 2000 *dry powder feeder* (Malvern Instruments[®], Reino Unido), na qual o meio dispersante é constituído por uma corrente de ar comprimido para determinar o diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica.

[0248] O índice de refração (IR) utilizado considerou o material em maior quantidade na partícula: HPMC (1,336). As análises foram realizadas com obscuração mínima do laser a 2% e os resultados apresentados como a média ± DP de três lotes diferentes, permitindo avaliar parâmetros de homogeneidade e reprodutibilidade. A partir da análise por volume, foram obtidos os valores de d₁₀, d₅₀ e d₉₀, que correspondem a 10, 50 e 90% da população total de partículas, respectivamente, D_[4,3] (média ponderada do tamanho das

partículas) e SPAN (distribuição do tamanho médio das partículas, calculado como $(d_{10} - d_{90}) / d_{50}$), demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica

Amostra	Rendimento		Tamanho de partícula			
	%	D ₁₀ µm	D ₅₀ µm	D ₉₀ µm	D _[4,3] µm	SPAN
MP/F4M	55 ± 5	1,464 ±	2,390 ±	3,750 ±	2,512 ±	0,957 ±
		0,010	0,030	0,026	0,022	0,012

[0249] A morfologia de superfície das partículas foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (EVO MA10). A análise foi realizada em diferentes ampliações a 7 kV seguida da espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS). Como resultado, as partículas da formulação MP/F4M apresentaram uma morfologia irregular com a presença de concavidades (colabadas) e de morfologia rugosa (Figura 3). Em relação à análise do EDS, foi constatada uma pequena porcentagem de enxofre proveniente da fucoidana, o que garante sua presença nas diferentes preparações. Também foi demonstrada a presença de cloro, o qual é decorrente da L-lisina e resíduos de água (Tabela 3).

Tabela 32 – Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) com identificação de diferentes elementos presentes em cada formulação

Elemento (%)	MP/F4M
Carbono	69,33
Nitrogênio	16,75
Oxigênio	3,84
Cloro	9,07
Sódio	-----
Enxofre	1,01
Massa total	100

Estabilidade do Sistema

[0250] Para determinar a estabilidade do sistema (Figura 4), as mesmas

formulações foram analisadas quanto ao teor durante 28 dias, com intervalos de 7 dias, onde os resultados apontaram baixa degradação do AAS (Dia 0 = $76,13 \pm 0,02\%$ e dia 28 = $72,5 \pm 0,02\%$), com conseqüente pequeno aumento do AS ao longo dos dias (Dia 0 = $3,63\% \pm 0,000\%$ e dia 28 = $7,50 \pm 0,001\%$). Adicionalmente, a mesma formulação foi reavaliada após 90 dias (AAS = $66,20 \pm 0,02\%$ e AS = $11,10 \pm 0,006\%$), confirmando a estabilidade deste sistema.

[0251] Ainda, foi determinada a pureza de pico cromatográfico. Os resultados apresentados revelaram fator de pureza de 999,923 para o AAS presente na formulação MP/F4M e 999,974 para o AAS puro, respectivamente, indicando ausência de impurezas na corrida analítica.

Perfil de liberação do fármaco

[0252] Para observar o perfil de liberação do fármaco em diferentes meios simulados, foram realizados ensaios de dissolução *in vitro*, onde foi utilizado um compressor automático de pós (força de 6400 N) (TA.XT *plus Texture Analyzer* - Stable Micro Systems®) para obter o pó coeso utilizado no ensaio.

[0253] O recipiente de dissolução foi mantido em banho a 37 ± 1 °C, sob agitação constante a 100 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas, filtradas (0.45 µm, Millipore, USA) e analisadas por HPLC-UV. As coletas foram realizadas nos intervalos de tempos de 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos (ou até atingir 100% de liberação), sendo o meio de dissolução repostado após cada coleta (2 mL).

[0254] Os ensaios de liberação foram feitos em Fluido Pulmonar Simulado (FPS, pH 7,4); Fluido Lisossomal Artificial (FLA, pH 4,5); Ringer (pH 7.4); Fluido Gástrico Simulado (FGS, pH 1,2) e Fluido Intestinal Simulado (FIS, pH 6,8) (Figura 5).

[0255] Foi possível perceber que o AAS puro coeso foi liberado rapidamente, apresentando 100% da concentração disponível em menos de 3 minutos em todos os meios testados. Por outro lado, quando associado às micropartículas, foi percebido com êxito o controle da liberação do AAS (FPS = 60 min; Ringer, FGS e FLA = 120 min e FIS = 150 min).

[0256] O perfil de liberação do fármaco a partir das partículas foi avaliado ajustando os dados experimentais aos modelos matemáticos com o auxílio do programa Micromath Scientist[®] (versão 2.0, Micromath[®] Inc., EUA) e a adequabilidade dos modelos determinada pelos valores de critério de seleção (MSC), coeficiente de correlação (r) e melhor ajuste gráfico utilizando equação de primeira ordem e de segunda ordem (Equação 1 e 2).

$$\text{Equação 1: } \text{Conc} = 100e^{-kt}$$

$$\text{Equação 2: } \text{Conc} = 100(1 - A^{-\alpha t} + B^{-\beta t})$$

onde, k , α e β são constantes de velocidade e A é o percentual liberado na etapa rápida e B o percentual liberado na etapa lenta.

[0257] Também foi utilizado o modelo da Lei da Potência aos perfis de liberação para obtenção dos parâmetros a e n , para caracterização do sistema de forma estrutural e geométrica, além do mecanismo de liberação do fármaco (Equação 3).

Equação 3:

$$ft = at^n$$

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

Tabela 3 – Perfis de liberação de primeira ordem ou segunda ordem

Liberação de primeira ordem					
	Ringer	FPS	FGS	FIS	FLA
R ²	0,864 ± 0,008	0,913 ± 0,003	0,883 ± 0,009	0,936 ± 0,005	0,883 ± 0,004
r	0,909 ± 0,009	0,936 ± 0,005	0,932 ± 0,009	0,962 ± 0,003	0,937 ± 0,003
k	0,002 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000
MSC	0,453 ± 0,076	0,815 ± 0,041	0,680 ± 0,095	1,483 ± 0,099	0,355 ± 0,031
Liberação de segunda ordem					
	Ringer	FPS	FGS	FIS	FLA
R ²	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000

r	0,998 ± 0,000	0,998 ± 0,001	0,998 ± 0,001	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000
MSC	4,916 ± 0,144	5,015 ± 0,440	4,751 ± 0,094	5,645 ± 0,258	5,369 ± 0,374
A	10,975 ± 0,767	9,451 ± 1,494	11,652 ± 1,311	87,289 ± 3,317*	14,933 ± 1,672
α	0,050 ± 0,004	0,083 ± 0,007	0,0423 ± 0,004	0,0004 ± 0,000	0,035 ± 0,003
B	89,417 ± 0,792*	90,274 ± 1,483*	87,559 ± 1,303*	12,370 ± 3,220	83,720 ± 1,367*
β	0,0003 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,0004 ± 0,000	0,031 ± 0,009	0,0002 ± 0,000

Abreviaturas: FPS = Fluido Pulmonar Simulado; FLA = Fluido Lisossomal Artificial; FGS = Fluido Gástrico Simulado; FIS = Fluido Intestinal Simulado; r = coeficiente de correlação; k = constante de velocidade; A = percentual liberado na etapa rápida; α = velocidade de A; B = percentual liberado na etapa lenta e β = velocidade de B.

[0258] O melhor ajuste foi determinado pela equação de segunda ordem, caracterizada por duas etapas de liberação (A = rápida e B = lenta) para todos os meios. Por fim, a análise do perfil de liberação pela Lei das Potências, adequada a formulações contendo HPMC (SIEPMANN & PEPPAS, 2012) demonstrou mecanismo de liberação do tipo transporte anômalo ($0,43 < n < 0,85$) em todos os meios.

[0259] Zatta e colaboradores (2018) e Siepmann e Peppas (2012), relataram que o HPMC, ao entrar em contato com o meio de dissolução ou solução aquosa, sofre relaxamento da cadeia polimérica e expansão de volume, caracterizado pelo intumescimento, erosão e dissolução do gel formado, levando finalmente, à liberação do fármaco.

[0260] Sendo assim, no presente estudo foi possível perceber um perfil de liberação de segunda ordem com duas etapas (rápida e lenta) do tipo transporte anômalo, tendo como mecanismos governantes a ação da difusão *Fickiana* e do intumescimento e consequente relaxamento das cadeias do HPMC.

Desempenho aerodinâmico

[0261] O desempenho aerodinâmico *in vitro* foi determinado em Impactador em Cascata de Andersen[®] (do inglês *Dry Powder Inhaler Andersen Cascade Impactor – ACI-DPI, Apparatus D, European Pharmacopeia, Copley Scientific Limited[®]*, Alemanha), o qual mimetiza o trato respiratório humano através de diferentes estágios, permitindo avaliar o perfil de deposição *in vitro* das

partículas.

[0262] Este equipamento é composto por oito estágios (zero a sete), em que as porções 0-1 são a porção orofaríngea, porções 2-7 são as porções de partículas respiráveis, porção 2 mimetiza os estágios iniciais e porção 7 mimetiza os estágios profundos do pulmão. Ainda, o equipamento apresenta placas de impactação rotativas conectadas a um controlador de fluxo de ar e bomba de vácuo.

[0263] Amostras da formulação MP/F4M (20 mg, correspondendo a 5 mg de AAS) e do fármaco AAS puro (5 mg) foram pesadas e transferidas para cápsulas de gelatina dura (Nº 3) antes de iniciar o experimento. Em seguida, foram inseridas em inalador (Aerolizer[®], Novartis), perfuradas duas vezes, e iniciado o ensaio (fluxo de ar 28,3 L/min, por 4 segundos) (ZATTA *et al.*, 2018). A partir desta análise foi possível avaliar parâmetros de uniformidade e fluxo dos pós, bem como performance aerodinâmica de acordo com as propriedades de Fração de Partículas Finas (FPF), Fração Respirável (FR) e Dose Emitida (DE).

[0264] Na análise dos valores foi possível detectar e quantificar o AAS em todos os estágios, sendo que aproximadamente 50% da concentração total do fármaco ($50,02 \pm 0,21\%$) ficou depositada nos estágios 2-7, os quais, representam a fração de partículas respiráveis (FR), enquanto que para o AAS puro, cerca de 90% do fármaco ficou depositado na porção orofaríngea (estágios 0-1).

[0265] A análise estatística apresentou diferenças significativas quanto a fração de partículas finas (FPF) e fração respirável (FR) da formulação MP/F4M em relação ao AAS puro ($p < 0,05$), indicando que a associação do AAS ao sistema carreador resultou em propriedades aerodinâmicas adequadas para administração pulmonar visando deposição média a profunda (ZATTA *et al.* 2018) (Figura 6 e Tabela 4).

Tabela 4 – Propriedades aerodinâmicas determinadas pelo Impactador em Cascata de Andersen.

	DE (%)	FPF (%)	FR (%)
MP/F4M	95,25 ± 0,20	37,60 ± 1,32*	50,02 ± 0,21*
AAS puro	92,31 ± 0,12	4,23 ± 1,23	4,16 ± 1,09

* = p < 0,05

Abreviaturas: MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; DE = dose emitida; FPF = fração de partículas finas e FR = fração respirável

[0266] O desempenho aerodinâmico associado aos resultados de diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica da formulação MP/F4M mostraram que a formulação desenvolvida apresentou características desejáveis para administração pela via pulmonar, os quais evidenciam que o diâmetro de partícula ótimo para esta via é de 1 a 5 µm, além de uma deposição em estágios mais profundos do impactador em cascata.

[0267] Com isso, foi possível concluir que esta formulação, devido a suas características aerodinâmicas, provavelmente sofre impactação inercial e sedimentação gravitacional, tendo capacidade de alcançar os ramos mais profundos do pulmão, como os alvéolos e atingir a circulação sistêmica.

Ensaio de Lavabilidade e Permeação da mucosa

[0268] Foi realizado ensaio de lavabilidade em célula de Franz modificada, com canal de entrada e saída de solução de lavagem, acoplada a uma bomba de fluxo, para avaliar a capacidade mucoadesiva da formulação no que se refere à resistência ao fluxo de lavagem, mimetizando o clearance pulmonar e permanecer aderida a mucosa, parâmetro este que está diretamente relacionado com o tempo de permanência das partículas no trato respiratório.

[0269] Neste estudo foi utilizado como meio receptor o Fluido Pulmonar Simulado (FPS, pH 7,4) e mucosa esofágica de suíno como membrana modelo. Sobre a mucosa, foi adicionada 20 mg da formulação MP/F4M (que corresponde a 5 mg de AAS) ou AAS puro na mesma concentração, e então iniciado o fluxo de lavagem (0,2 mL/min) simulando a ação do fluxo de *clearance* pulmonar. A célula foi mantida em banho termostaticado a 37 ± 1 °C sob agitação moderada durante o período de experimento. Amostras foram

coletadas a partir do canal de saída nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 270 e 300 minutos.

[0270] A formulação MP/F4M ficou visivelmente aderida à mucosa suína, mostrando um lento perfil de lavabilidade. Após 180 minutos decorridos, a concentração de fármaco (AAS) lavado entrou em estado de equilíbrio, obtendo-se $91,08 \pm 4,79$ % de fármaco recuperado do total administrado. Este resultado confirma a capacidade bioadesiva da formulação, possivelmente relacionado à utilização do HPMC conforme descrito por Zatta e colaboradores.

[0271] O AAS puro foi analisado como controle, apresentando baixa concentração de fármaco no fluido lavado, entrando em estado de equilíbrio após 60 minutos de experimento com apenas 80% de recuperação da concentração total ($83,09 \pm 1,97$ %) (Figura 7). Ao final do experimento, o meio receptor (FPS), assim como a mucosa utilizada foram quantificados em relação à concentração de fármaco permeado e retido, respectivamente. A quantificação no meio receptor demonstrou $4,30 \pm 0,13$ % e $1,12 \pm 0,30$ % para o AAS presente na formulação e para o AAS puro, respectivamente. Além disso, foi observada concentração de $1,11 \pm 0,13$ % (AAS presente na formulação) e $0,42 \pm 0,20$ % (AAS puro) na mucosa.

[0272] Além disso, o ensaio de permeação foi realizado em célula de difusão automática de Franz, utilizando como membrana a mucosa esofágica de suíno, com o objetivo de avaliar a capacidade da formulação em penetrar e permear através de membranas biológicas (por exemplo, os alvéolos pulmonares). A célula que foi utilizada possui área de $3,1 \text{ cm}^2$ e comporta cerca de 7 mL de meio no compartimento receptor.

[0273] Os cortes da mucosa foram utilizados como interfaces dos meios acceptor e receptor da célula de Franz. Coletas do meio receptor foram realizadas, em tempos previamente determinados (30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos), e analisados por CLAE-UV, a fim de avaliar o perfil de permeação. A dose de amostra utilizada foi de 20 mg de formulação MP/F4M (cerca de 5 mg de AAS), quantidade de pó necessário para cobrir toda área de

mucosa em contato com o meio receptor, mantendo regime de dose infinita e condição *Sink*. A formulação foi pesada em balança analítica e disposta na face superior da mucosa, então o sistema foi fechado e dado início ao experimento, o qual foi conduzido sob constante agitação e temperatura controlada de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

[0274] A concentração de fármaco permeado a partir da formulação MP/F4M (máximo $232,97 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de AAS) foi significativamente superior quando comparada ao fármaco puro (máximo $76,26 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de AAS) (Figura 8).

[0275] Consideração que a mucoadesão é um fenômeno essencial para a retenção da formulação na via pulmonar e posterior liberação do fármaco, visando ação local ou sistêmica (ZATTA *et al.*, 2018), o ensaio preliminar de lavabilidade evidenciou o potencial mucoadesivo da MP/F4M à mucosa e provável resistência ao *clearance* pulmonar, que poderá levar a uma liberação gradual e prolongada do AAS, conforme evidenciado no ensaio de dissolução (descrito anteriormente).

[0276] O conjunto de resultados obtidos a partir dos experimentos de dissolução, lavabilidade e permeação mucosal nos fornece indícios confiáveis e atraentes no que se refere ao potencial da formulação MP/F4M para administração via pulmonar visando ação local e/ou sistêmica, com benefício de provável diminuição de dose e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais adversos relacionados ao AAS puro. Além disso, a capacidade de liberação gradual do fármaco influencia diretamente na proteção do AAS contra a hidrólise que leva à formação do ácido salicílico (AS), um produto de degradação que não possui atividade antitrombótica, e assim, aumentando o seu tempo de meia-vida.

Perfil Antihemostático

[0277] Os experimentos utilizando sangue humano foram avaliados por comitê de ética em pesquisa humana e iniciados após parecer favorável.

[0278] Para o perfil antihemostático *in vitro*, foram realizados ensaios de tempo de coagulação e agregação plaquetária, assim como atividade hemolítica (lise

eritrocitária) *in vitro*.

[0279] Nos ensaios de coagulação plasmática, nos tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e de tempo de protrombina (PT), foram formados pools com amostras de plasma citratado de seis doadores que não apresentavam distúrbios no sistema hemostático expresso pelo INR (razão normalizada internacional) igual ou inferior a 1,3. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando um analisador de coagulação CoagLab[®] IV (Beijing Shining SunTechnology Co. [®], China), de acordo com as instruções do fabricante (WAMA Diagnostics[®]) segundo o protocolo proposto por Saito e colaboradores.

[0280] No ensaio de aPTT, 97 µL de PPP juntamente com 3 µL da formulação MP/F4M, fucoidana pura ou controles, foram previamente incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, por 2 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de cefalina (1,2 mg/mL), sendo incubados por dois minutos e a reação foi disparada com 100 µL de CaCl₂ 0,025 M, em um volume final de 300 µL, sendo determinado e monitorado o tempo de coagulação do plasma em segundos a 37 °C. Para o ensaio de PT foi mantido o mesmo protocolo, sendo que ao final, a reação foi disparada com 100 µL de tromboplastina cálcica (2,5 mg/mL).

[0281] Diversas concentrações de fucoidana (25, 50, 100, 200, 250, 300, 350 e 400 µg/mL) foram utilizadas a fim de analisar seu perfil anticoagulante descrito na literatura (Figura 9). Foi possível perceber que no PT, a fucoidana dobrava o tempo de coagulação na concentração de 200 µg/mL, exibindo este mesmo perfil no aPTT na concentração de 25 µg/mL.

[0282] Com isso, procedeu-se os ensaios de coagulação plasmática *in vitro* utilizando a formulação MP/F4M (0,5 mg/mL). De forma interessante, embora a formulação apresentasse 33 µg/mL de fucoidana em sua constituição, ela não mostrou atividade anticoagulante no PT ou aPTT, diferindo dos resultados observados anteriormente para a fucoidana pura no ensaio do aPTT (Figura 10).

[0283] A agregação plaquetária foi monitorada utilizando-se um agregômetro

Pack-4[®] (Helena Laboratories[®], USA) seguindo o método turbidimétrico de Born e Cross (BORN & CROSS, 1963; SAITO *et al.*, 2016; LOURENÇO *et al.*, 2017) e foi iniciada adicionando-se 10 µL de ácido araquidônico (ARA - 500 µM) à cubetas contendo 287 µL de PRP e 3 µL da formulação MP/F4M, AAS ou fucoidana pura, previamente incubados por 2 minutos a 37°C. Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em triplicata em um total de seis experimentos independentes e os dados obtidos foram descritos em porcentagem de agregação ± desvio padrão.

[0284] Devido ao potencial pró-agregante da fucoidana relatado por Manne e colaboradores (2013), foram realizados ensaios utilizando a fucoidana como agonista plaquetário em diferentes concentrações (800, 600, 400, 200, 100, 50, 25 e 20 µg/mL). Como controles positivos foram utilizados ADP (3 µM) e colágeno (5 µg/mL) e água como controle negativo.

[0285] Através da análise dos resultados apresentados na Figura 11, é possível perceber que a fucoidana na concentração de 400 µg/mL exibe atividade agregante plaquetária, podendo ser definida como um agonista plaquetário.

[0286] Os ensaios de agregação plaquetária *in vitro* foram realizados utilizando a formulação MP/F4M concentração de 0,5 mg/mL (concentração de AAS e fucoidana no sistema iguais a 100 µg/mL e 33 µg/mL, respectivamente), e o ácido araquidônico (ARA - 500 µM) como agonista plaquetário devido a sua interação com o mesmo sítio de ligação do AAS. A partir deste ensaio foi possível observar inibição da agregação plaquetária (Figura 12).

[0287] A fim de corroborar os achados anteriores sobre a estabilidade do fármaco nas formulações, o ensaio foi repetido para MP/F4M após 28 dias, para a qual obteve-se $3,40 \pm 0,24$ % de agregação plaquetária. Por fim, a fucoidana foi analisada utilizando a mesma concentração presente nas formulações (33 µg/mL), a qual, não exibiu atividade antiagregante plaquetária (Figura 12).

[0288] No ensaio de adesão plaquetária, específico para observar possível

interação da fucoidana com a P-selectina, que pode ser expressa em diversos locais altamente trombogênicos, a fucoidana inibiu a ligação das plaquetas à proteína recombinante PSGL-1 (receptor da P-selectina), provavelmente por impedir a interação da P-selectina nas plaquetas, conforme observado na Figura 13. Duas concentrações apresentaram interação com a P-selectina das plaquetas ativadas (50 µg/mL e 25 µg/mL). Concentrações abaixo de 25 µg/mL (10 e 1 µg/mL) não apresentaram impedimento da ligação das plaquetas à proteína recombinante PSGL-1.

[0289] Adicionalmente, a formulação MP/F4M nas concentrações 10, 5 e 2,5 mg/mL inibiram a ligação das plaquetas com a P-selectina, devido à fucoidana da formulação. Apenas na concentração de 1 mg/mL não houve diferença comparada ao controle (Figura 14).

[0290] Para verificar a hemocompatibilidade da formulação e seus componentes, optamos por avaliar o grau de lise eritrocitária, através da mensuração da hemoglobina livre após um período de incubação de 3 horas com auxílio de um espectrofotômetro SpectraMax 190[®] e o *software* SoftMax Pro 6[®] (Molecular Devices[®], USA).

[0291] Para tal, a metodologia, com algumas modificações, proposta por Bauer e colaboradores (BAUER *et al.*, 2012) foi empregada, na qual a liberação da hemoglobina oriunda de células eritrocitárias danificadas é medida em uma placa de 96 poços, com fundo chato, em um comprimento de onda de 540 nm. Água e Triton X-100 foram utilizados como controle negativo e controle positivo, respectivamente.

[0292] Os eritrócitos foram lavados com 1,5 mL de PBS e centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. Então, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido duas vezes. Após a lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em 5 mL de PBS. Em seguida, 540 µL da solução concentrada de eritrócitos foram adicionados a um microtubo contendo 60 µL da formulação (MP/F4M) e também da formulação branca (MP/F4M B) sob diferentes concentrações e incubadas a 37°C por um período de três horas. Após este período as

amostras foram centrifugadas a 2500 rpm e o sobrenadante foi avaliado, em triplicata, por espectrofotometria a 540nm em placa 96 poços.

[0293] Nenhuma concentração da formulação testada (0,5 e 1 mg/mL) apresentou atividade hemolítica, assim como a formulação branca (HPMC/F4M B), corroborando com o caráter biocompatível do fármaco e dos ativos da formulação (Figura 15).

Testes *in vivo*

[0294] Os experimentos envolvendo animais foram realizados utilizando ratos Wistar machos e fêmeas (250-300g). Todos os ensaios envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) (COBEA, 1991), Vogel e Vogel (VOGEL & VOGEL, 1997) e Committee on Animal Research and Ethics (CARE, 2012). Os animais foram mantidos em condições de higiene adequada, com ração e água *ad libitum* em sala projetada para o mesmo.

[0295] Nos ensaios *in vivo*, ratos Wistar machos e fêmeas (250-300 g) foram mantidos em jejum por um período de 1 hora e então anestesiados com uma solução de quetamina/xilazina por injeção intraperitoneal para início do ensaio. A formulação ou controles foram administrados por via intratraqueal. Os grupos de tratamento foram:

- (I) controle (insuflação de 2 mL de ar),
- (II) MP/F4M (11 mg/kg),
- (III) MP/F4M branca (ausência de AAS), e
- (IV) fármaco AAS puro (3,5 mg/kg).

[0296] O tratamento foi administrado com auxílio de uma cânula e otoscópio, com introdução de cateter modificado e posterior administração intratraqueal, com um total de cinco animais por grupo.

[0297] Diante dos resultados, foi possível perceber que não houve alteração significativa na agregação plaquetária induzida por ADP para o controle (2 mL de ar), formulação branca (MP/F4M B) e AAS (3,5 mg/kg). Além disso, também foi observado modificação na agregação plaquetária dos grupos que foram

tratados com a formulação MP/F4M (11 mg/kg) após 6 horas (agregação de $79 \pm 9\%$) (Figura 16).

[0298] Conforme representado na Figura 17, os resultados apresentaram-se mais expressivos na agregação plaquetária induzida por colágeno. A solução de AAS puro (3,5 mg/kg = mesma concentração de AAS na formulação MP/F4M, administrada na dose de 11 mg de pó/kg) não apresentou atividade em nenhum dos tempos testados e a formulação MP/F4M demonstrou maior atividade antiagregante plaquetária nos tempos 4 e 6 horas (agregação de $40 \pm 7\%$ e $60 \pm 6\%$, respectivamente). Após 24 horas do tratamento único, foi verificado agregação de $68 \pm 8\%$, resultado semelhante ao início do tratamento (2 horas; agregação de $67 \pm 7\%$) (Figura 17).

[0299] Para fins de comparação, foi realizado um ensaio com o grupo que recebeu AAS puro (3,5 mg/kg) por gavagem com coleta após 6 horas, apresentando resultados de agregação de $71 \pm 4\%$ para agregação induzida por colágeno e agregação de $78 \pm 2\%$ induzida por ADP (Figura 17 e Figura 16, respectivamente).

[0300] Em relação ao ensaio de trombose arterial *in vivo*, o AAS (3,5 mg/kg) na mesma concentração presente na formulação, administrado pela via pulmonar, assim como a formulação branca (MP/F4M B) não aumentaram o tempo de oclusão. Apenas o AAS em alta concentração (10 mg/kg) por gavagem demonstrou inibição da formação do trombo arterial (Figura 18). Foram realizados ensaios de 6 e 24 horas após a administração.

[0301] Os ensaios de 72 horas relacionam-se com uma administração diária, durante três dias, mimetizando um ensaio crônico.

[0302] De forma interessante, a formulação MP/F4M na concentração de 11 mg/kg apresentou um discreto aumento no tempo de oclusão. Com isso, houve necessidade do aumento de 0,5 mg/kg na concentração da formulação (de 11 para 11,5 mg/kg), levando a um perfil muito satisfatório de inibição da trombose (60 minutos, que é fim do experimento) (Figura 18).

[0303] Finalmente, para o tempo de sangramento *in vivo*, foi possível observar

que apenas uma alta concentração de ácido acetilsalicílico (10 mg/kg), por gavagem ou por via pulmonar aumentou a concentração de hemoglobina perdida durante 30 minutos. A formulação, com fármaco ou branca, pela via pulmonar, não influenciou essa quantidade, sendo equiparável ao controle (Figura 19).

[0304] Por fim, foram observados o pulmão, coração, fígado, rim, estômago e intestino delgado dos animais provenientes do ensaio do tempo de sangramento.

[0305] Foi observada a estrutura de cada órgão, considerando a sua arquitetura (cardiomiócitos para o coração; hepatócitos para o fígado; glomérulos renais para o rim; vilosidades para estômago e intestino delgado e alvéolos e espaços alveolares para o pulmão). Adicionalmente, foram analisados quanto a presença de hemorragias, hiperemia, inflamação ou qualquer outro quadro que modificasse a estrutura do órgão, em menor e maior aumento. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias (1D3D).

[0306] Não foram observadas modificações estruturais no coração (Figura 20); estômago (Figura 21); intestino delgado (Figura 22); fígado (Figura 23); rim (Figura 24).

[0307] Os grupos controle, MP/F4M B, MP/F4M e AAS Gavagem não apresentaram modificações estruturais, hemorragias, hiperemia ou inflamação (Figura 25). Para o grupo AAS Pulmonar, foi possível perceber espessamento do septo alveolar com presença de células inflamatórias (fibroblastos, macrófagos ou neutrófilos (Figura 26). No entanto, é importante ressaltar que a grande quantidade de AAS administrado (10 mg/kg) pela via pulmonar não apresenta estudos na literatura e, podem ocasionar danos severos na arquitetura pulmonar. Considerando um animal do grupo AAS pulmonar (10 mg/kg) que morreu após a terceira administração, o mesmo apresentou dificuldade para respirar logo após a terceira e última administração (no terceiro dia). Na análise do pulmão deste animal (Figura 26 – AAS Pulmonar 02), foi

possível observar locais de inflamação, provavelmente associados à grande quantidade de fármaco administrado (Figura 26).

[0308] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Micropartícula, **caracterizada** por compreender medicamento antiagregante e/ou anticoagulante, polímero, aminoácido e polissacarídeo natural, em que o aminoácido utilizado é a L-lisina.

2. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelos medicamentos antiagregantes compreenderem ácido acetilsalicílico, clopidogrel, cangrelor, ticagrelor, elinogrel, abciximab, eptifibatida, tirofiban, terutroban, picotamida, vorapaxar, atopaxar, dipiridamol, cilostazol ou misturas destes, e

em que os medicamentos anticoagulantes compreendem ácido acetilsalicílico, apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban, edoxaban, hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban, dabigatran ou misturas destes.

3. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo medicamento ser ácido acetilsalicílico.

4. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelos polímeros serem selecionados do grupo que compreende leucina (aminoácidos), a quitosana (polissacarídeos), co-polímero de polioxipropileno e polioxoetileno (polaxameros) e HPMC (celulose) ou misturas destes, mais preferencialmente o polímero é HPMC.

5. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo polissacarídeo natural ser extraído de *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata*, *Fucus evanescens*, *Fucus serratus*, *Fucus distichus*, *Fucus spiralis*, ou *Ascophyllum nodosum*, mais preferencialmente extraída de alga sem efeito anticoagulante e/ou proagregante acentuado, mais preferencialmente o polissacarídeo é extraído de *Ascophyllum nodosum*.

6. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender diâmetro de partícula de 1 a 5 µm.

7. Micropartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6,

caracterizada por compreender 18 a 24% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 35 a 42% dos sólidos totais de L-Lisina, 35 a 42% dos sólidos totais de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e 0,5 a 3% dos sólidos totais de fucoidana.

8. Composição farmacêutica, **caracterizada** por compreender micropartícula, conforme definida em qualquer uma das reivindicações anteriores e por estar na forma pulverulenta.

9. Processo de preparação da micropartícula, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por compreender as etapas:

a) misturar solução de L-lisina, água ultrapura e propilenoglicol 2% sob agitação magnética moderada (solução A);

b) solubilizar o ácido acetilsalicílico (AAS) em água ultrapura e acetona com auxílio de um vórtex (solução B);

c) adição da solução B em A lentamente, sob agitação magnética;

d) adição de solução de fucoidana à mistura sob agitação;

e) secagem da mistura por aspersão; e

f) adição da dispersão de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), previamente preparada, à mistura.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pela etapa (a) compreender:

- L-Lisina na faixa de 35 a 42%, preferencialmente 39,74%;

- água ultrapura na faixa de 50 a 70mL, mais preferencialmente 60mL

- propilenoglicol 2% na faixa de 3 a 6mL, mais preferencialmente de 4mL

- a agitação ser de 34 a 40°C por 40 a 80 minutos, mais preferencialmente a 37°C por 60 minutos;

em que o propilenoglicol é um agente estabilizante à presença de ácido acetilsalicílico e que pode ser excluído, caso o fármaco utilizado seja mais estável.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pela etapa

(b) compreender:

- AAS na faixa de 18 a 24%, mais preferencialmente 19,87%;
- água ultrapura na faixa de 1 a 5 mL, mais preferencialmente 2 mL;
- acetona na faixa de 1 a 5 mL, mais preferencialmente 2 mL;
- a etapa ocorrendo no tempo de 1 minuto;

em que, se o fármaco de escolha for ligeiramente solúvel, solúvel, facilmente solúvel ou muito solúvel em água, o uso da acetona é dispensável, sendo a quantidade de água ultrapura então adicionada na faixa de 2 a 8 mL, mais preferencialmente 4 mL.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pela etapa (c) compreender agitação por 3 a 10 minutos, mais preferencialmente a 5 minutos e, em que, a etapa (d) compreende agitação por 3 a 10 minutos, mais preferivelmente por 5 minutos e fucoidana na faixa de 0,5 a 3%, mais preferivelmente 0,66%.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pela etapa (e) compreender:

a. tamanho do bico atomizador de 5 a 10 μm , mais preferencialmente a 7 μm ;

b. temperatura de saída do bico atomizador de 100 a 140 °C, mais preferencialmente a 120 °C;

c. temperatura no ciclone de coleta do produto pulverulenta de 60 a 80 °C, mais preferencialmente a 70 °C;

d. Velocidade do fluxo de 10 a 20%, mais preferencialmente a 15% e

e. Velocidade de aspiração de 80 a 100%, mais preferencialmente a 100%.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pela etapa (f) compreender preparação da dispersão de HPMC, em que adiciona-se HPMC em água ultrapura sob agitação magnética moderada, posteriormente mantida refrigerada durante a noite (temperatura de 2 a 10 °C, mais preferencialmente a 4°C) e, em que:

- HPMC na faixa de 35 a 42%, mais preferivelmente 39,74%;
- água ultrapura na faixa de 30 a 40 mL, mais preferivelmente 37 mL;
- a agitação ser a 34 a 40°C por 40 a 80 minutos, mais preferencialmente a 37°C por 60 minutos.

15. Uso da composição, conforme definida na reivindicação 8, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento para tratamento de eventos trombóticos arteriais primários ou secundários, agudo ou crônico e quadros trombóticos venosos.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo dito medicamento ser para administração nasal e/ou pulmonar.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, **caracterizado** pela administração em pó envolver uso de aparato e/ou dispositivo.

Figuras

Figura 1

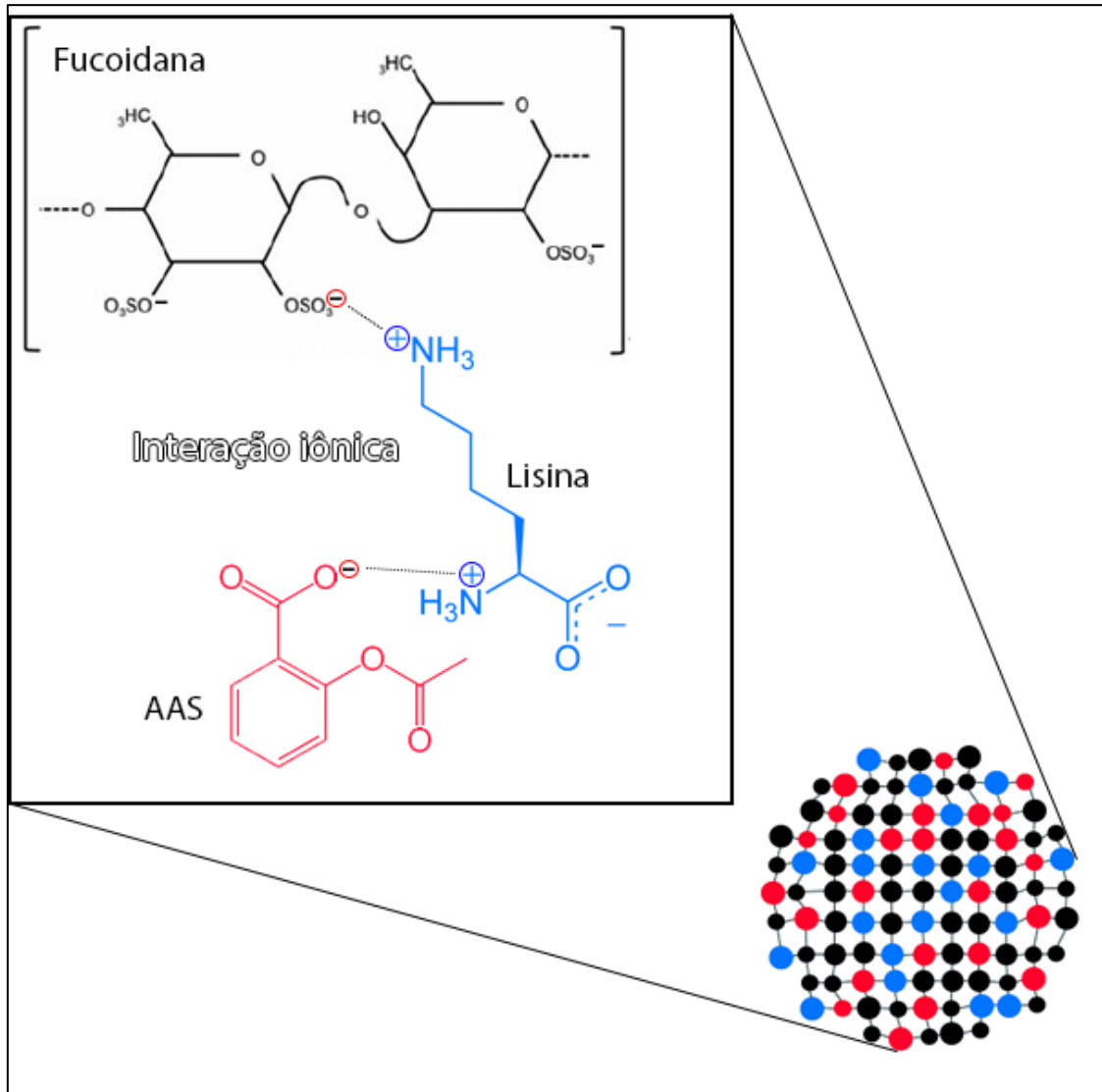


Figura 2

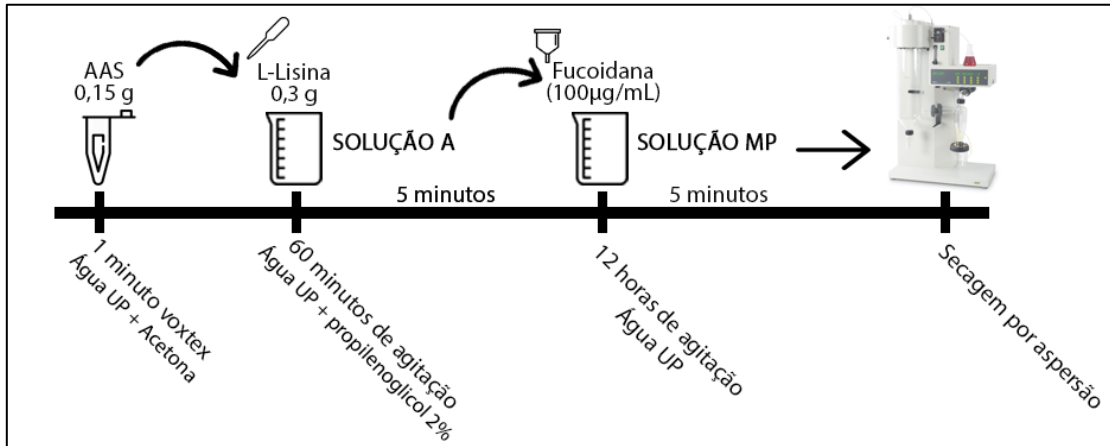


Figura 3

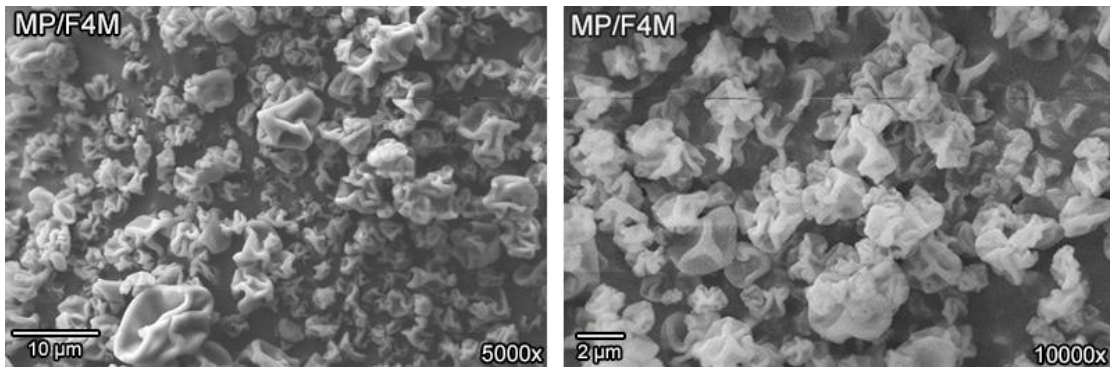


Figura 4

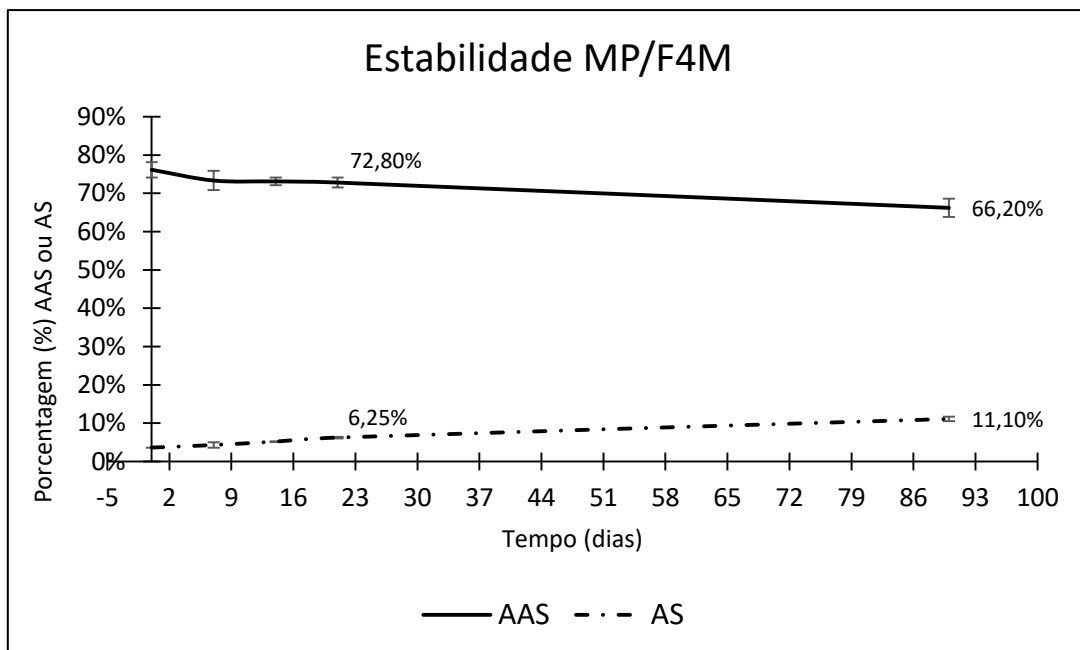


Figura 5

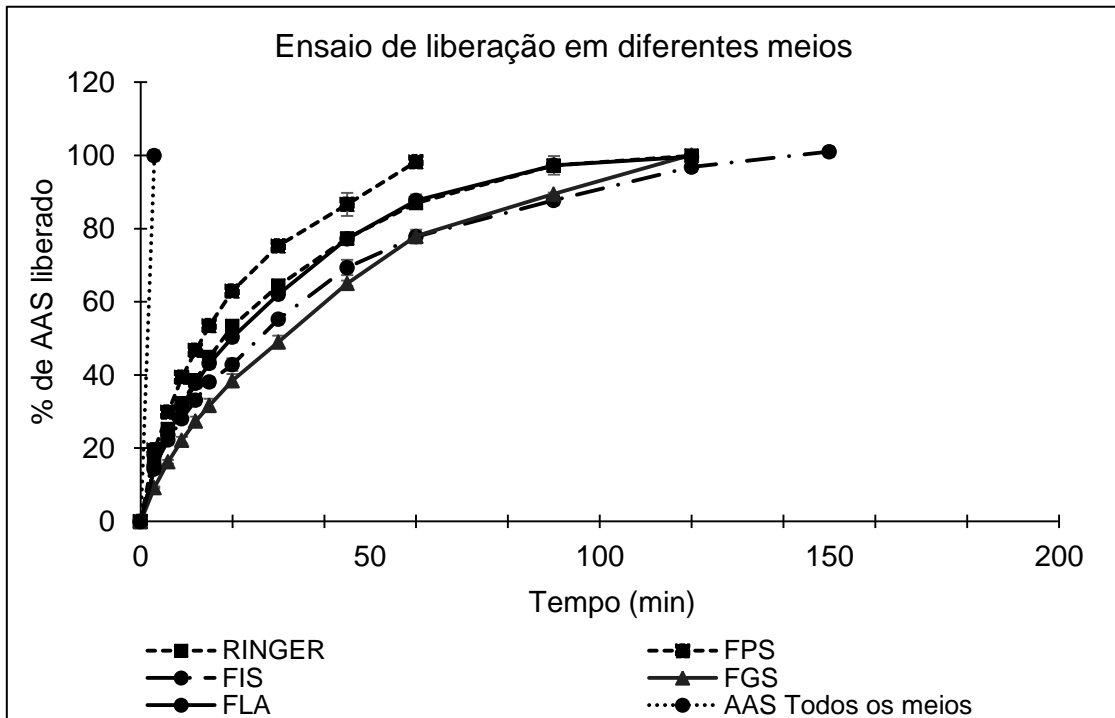


Figura 6

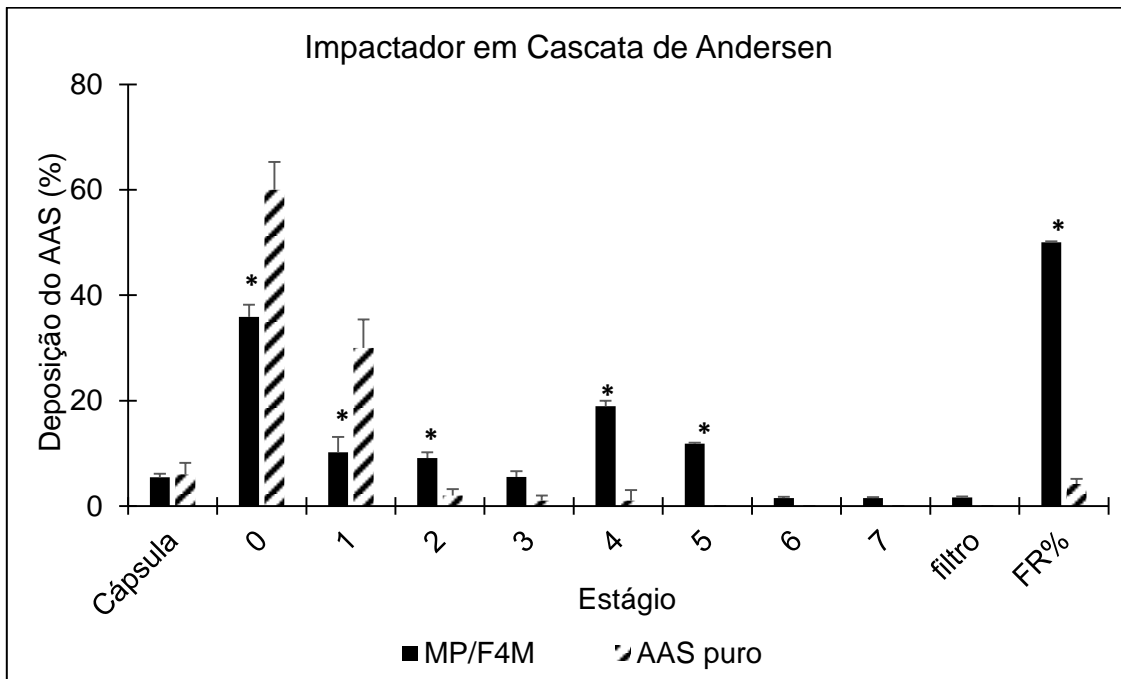


Figura 7

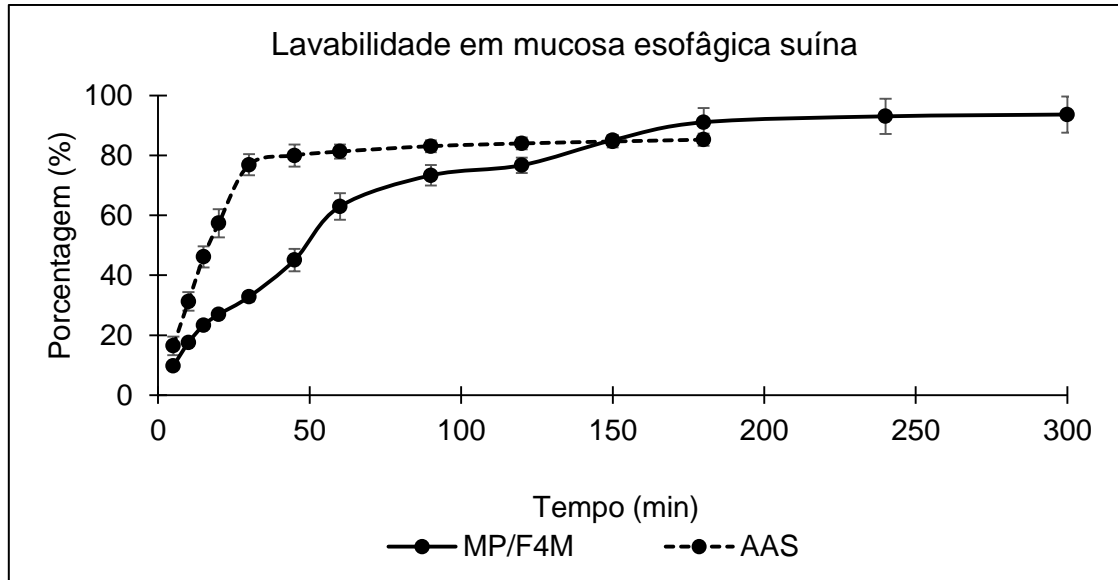


Figura 8

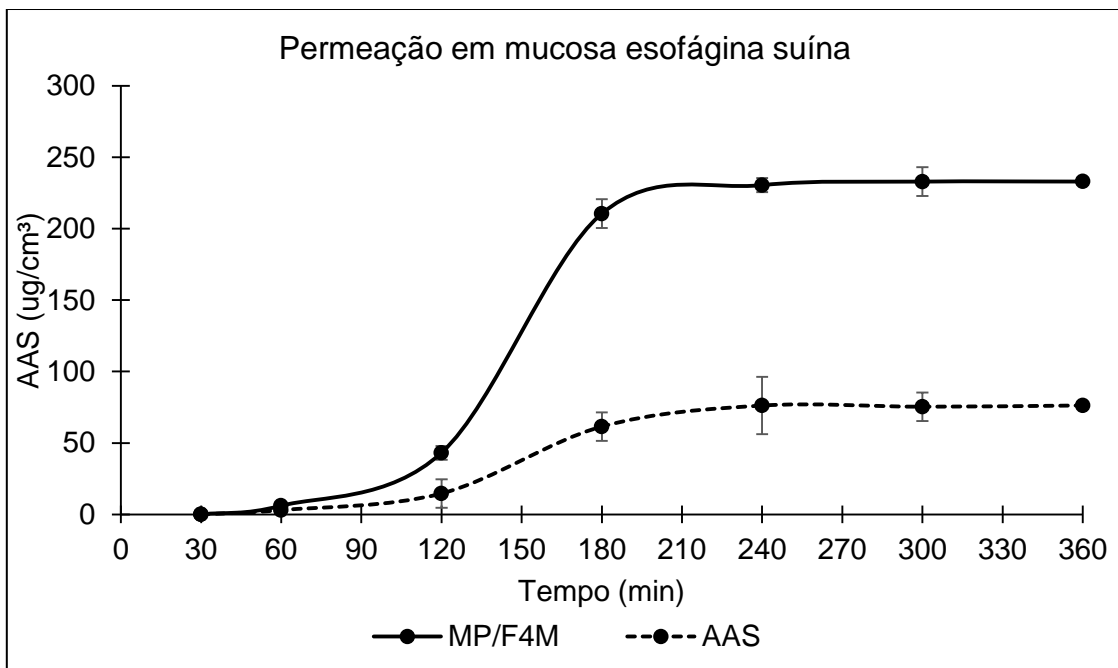


Figura 9

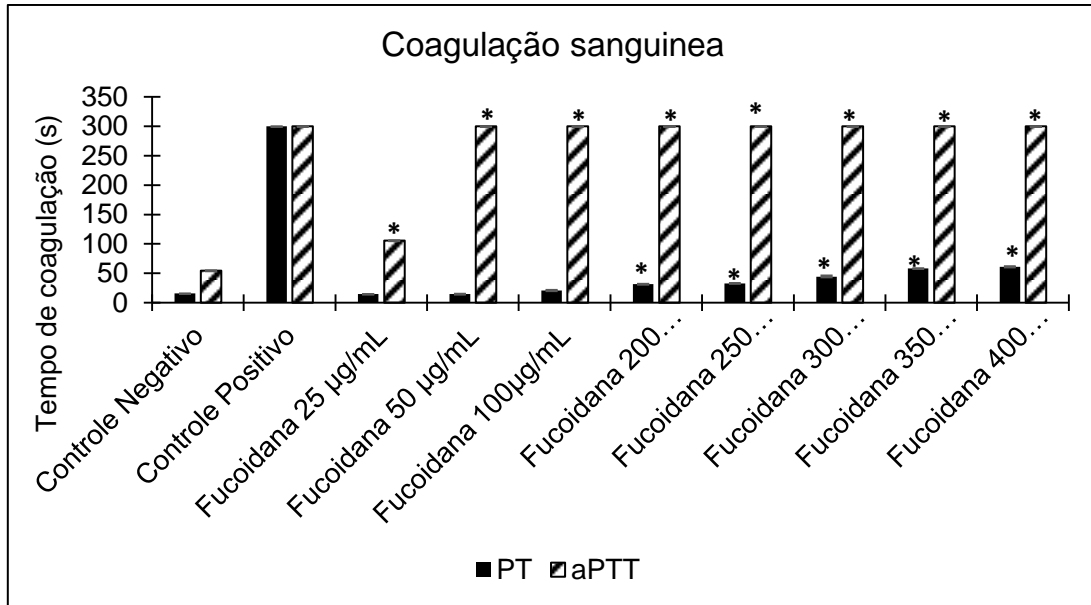


Figura 10

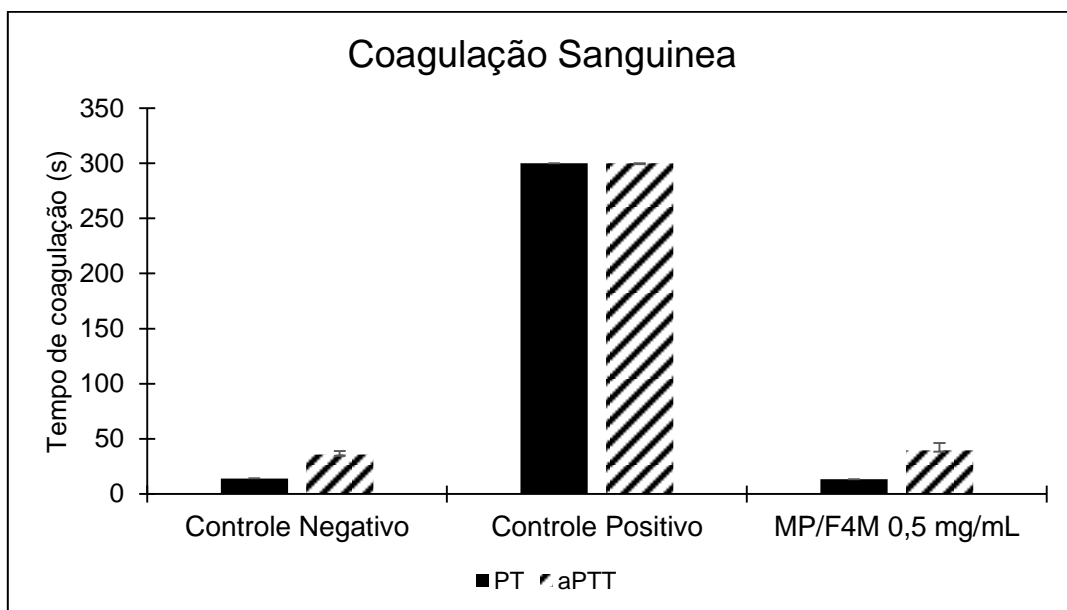


Figura 11

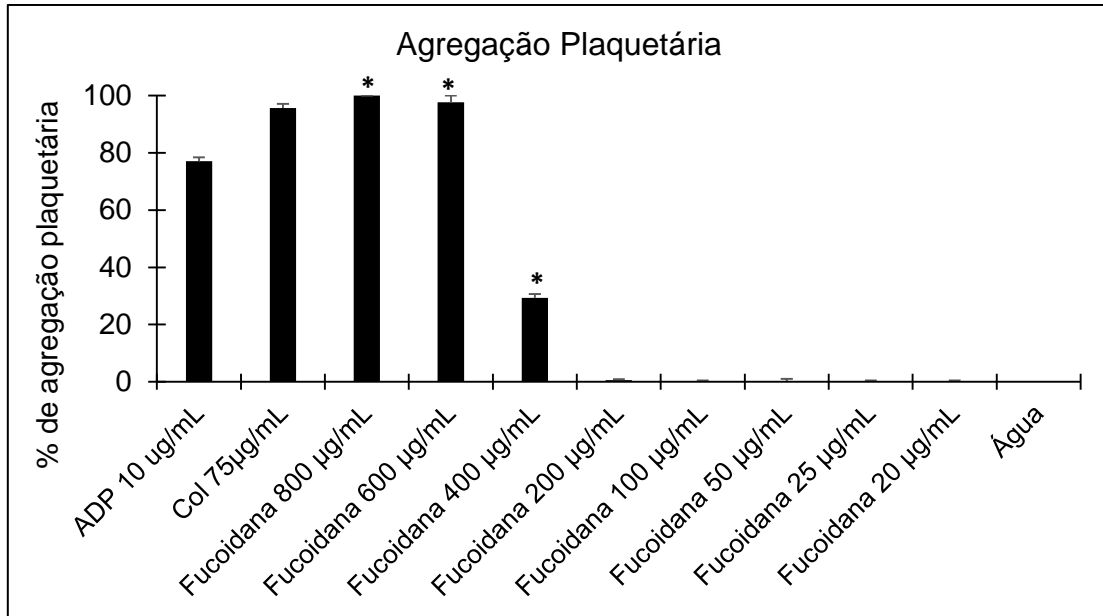


Figura 12

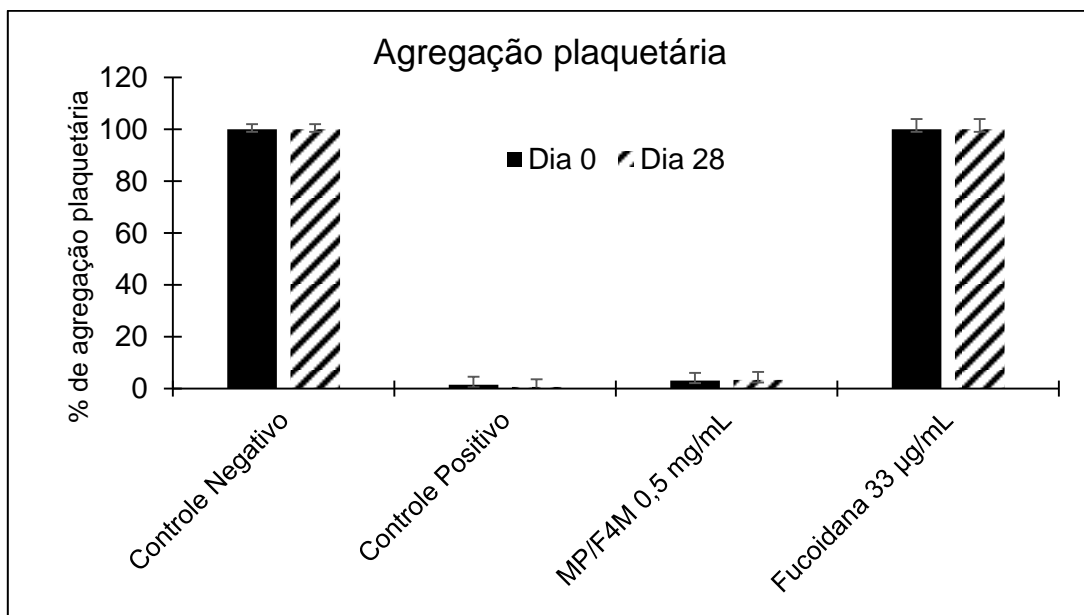


Figura 13

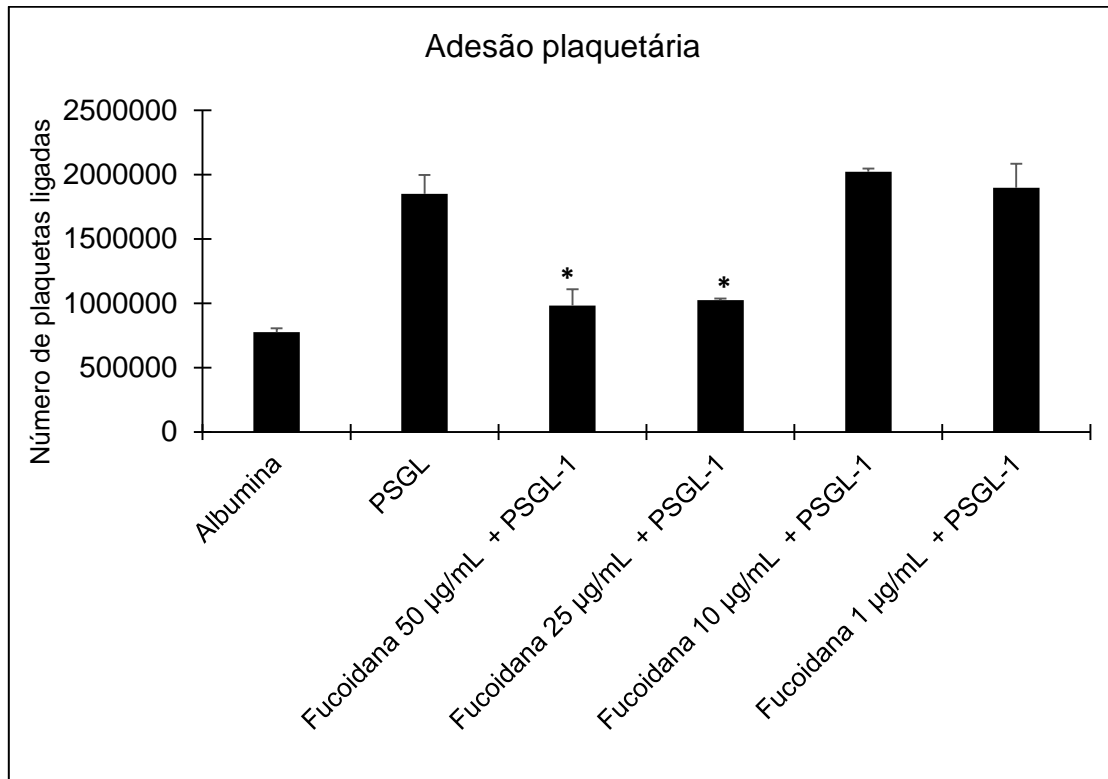


Figura 14

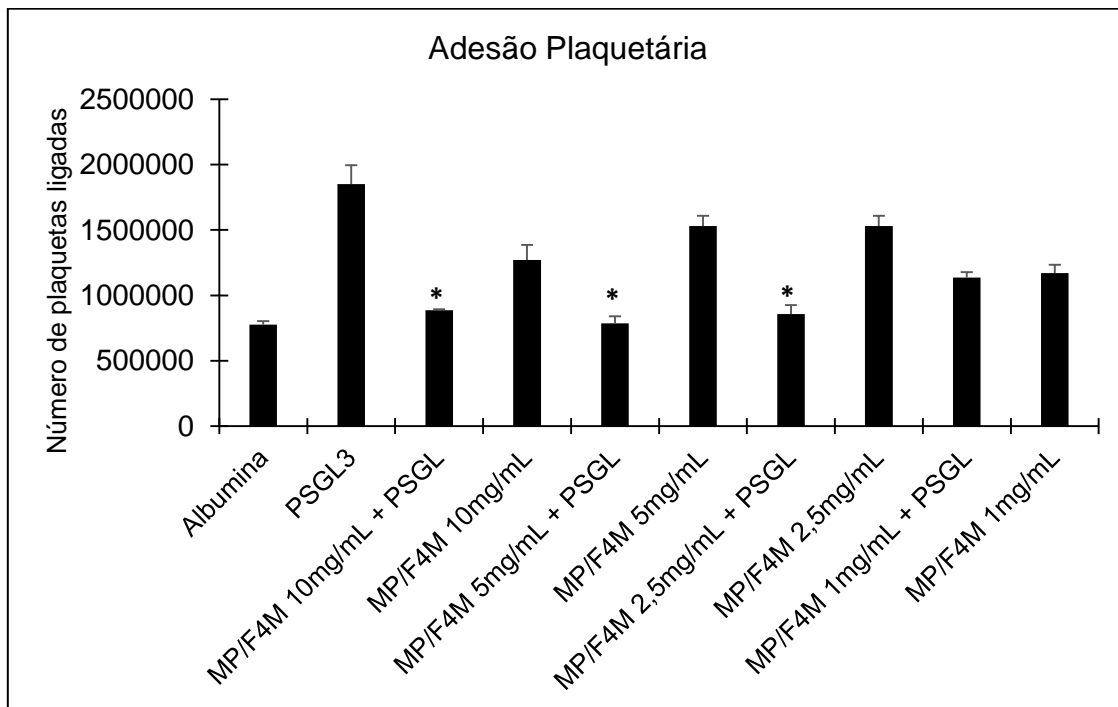


Figura 15

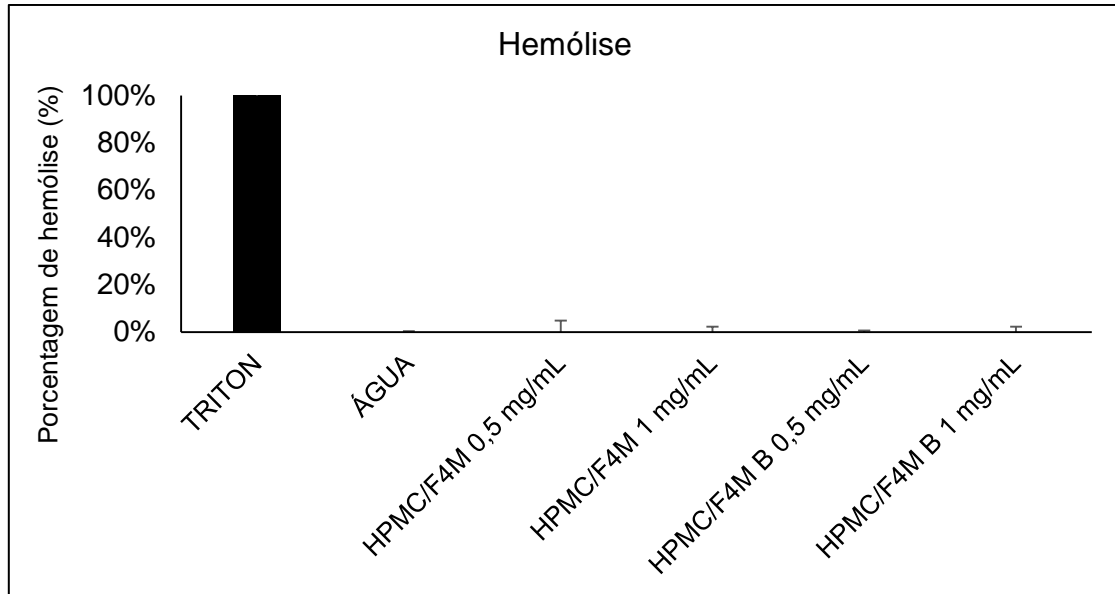


Figura 16

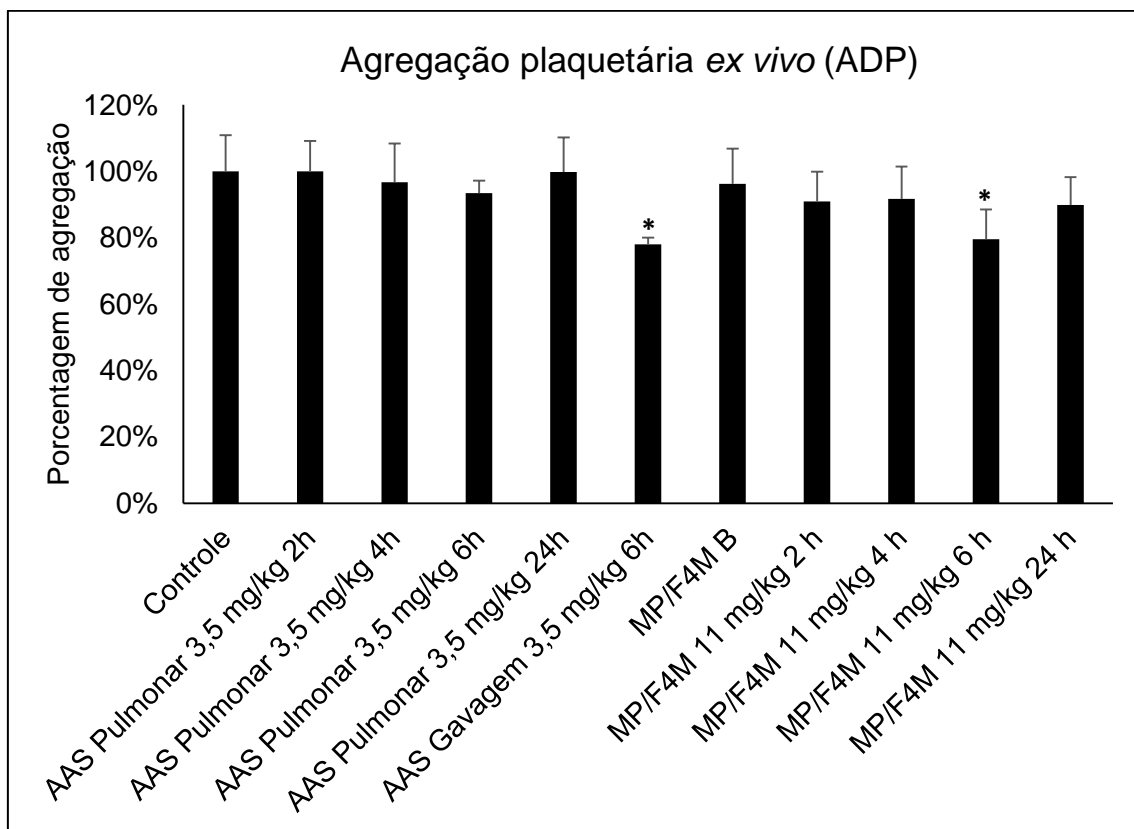


Figura 17

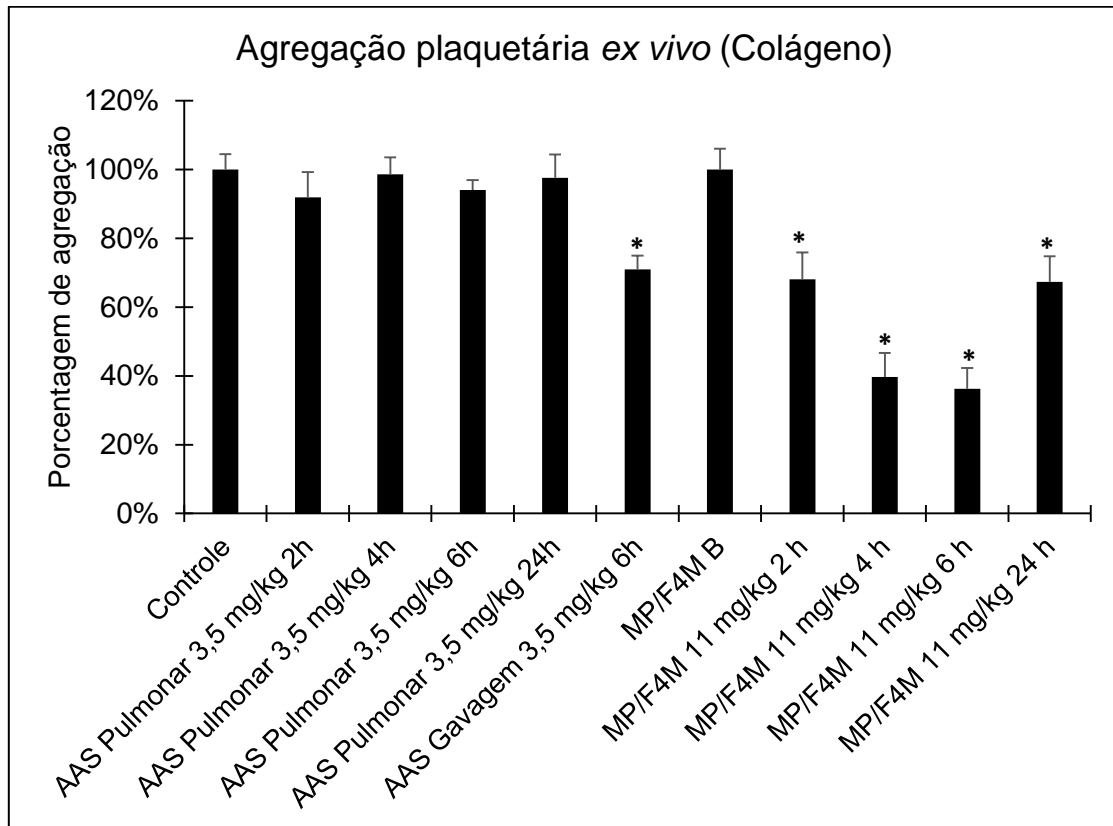


Figura 18

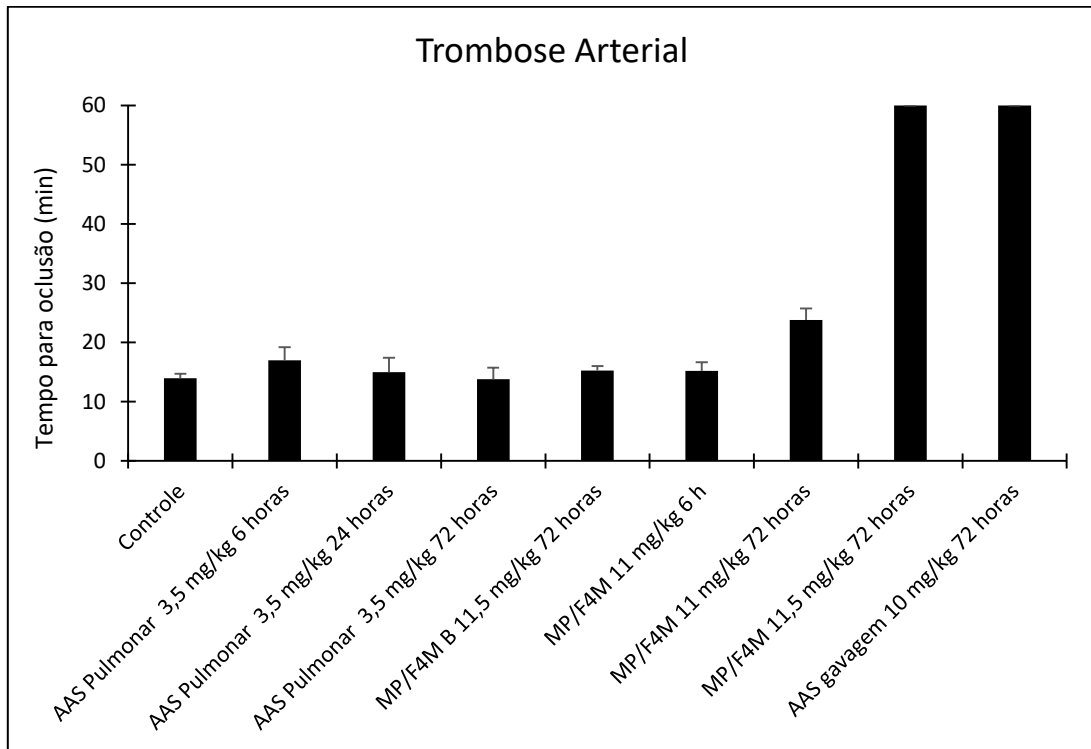


Figura 19

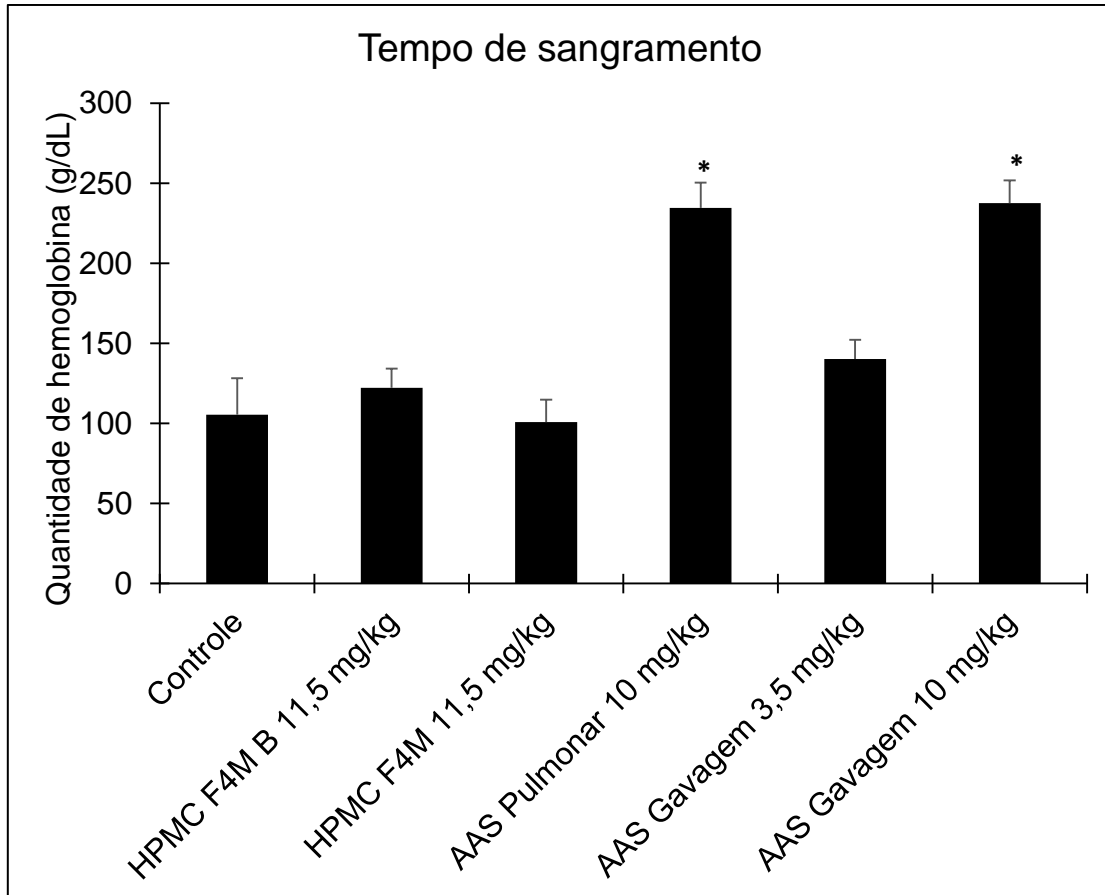


Figura 20

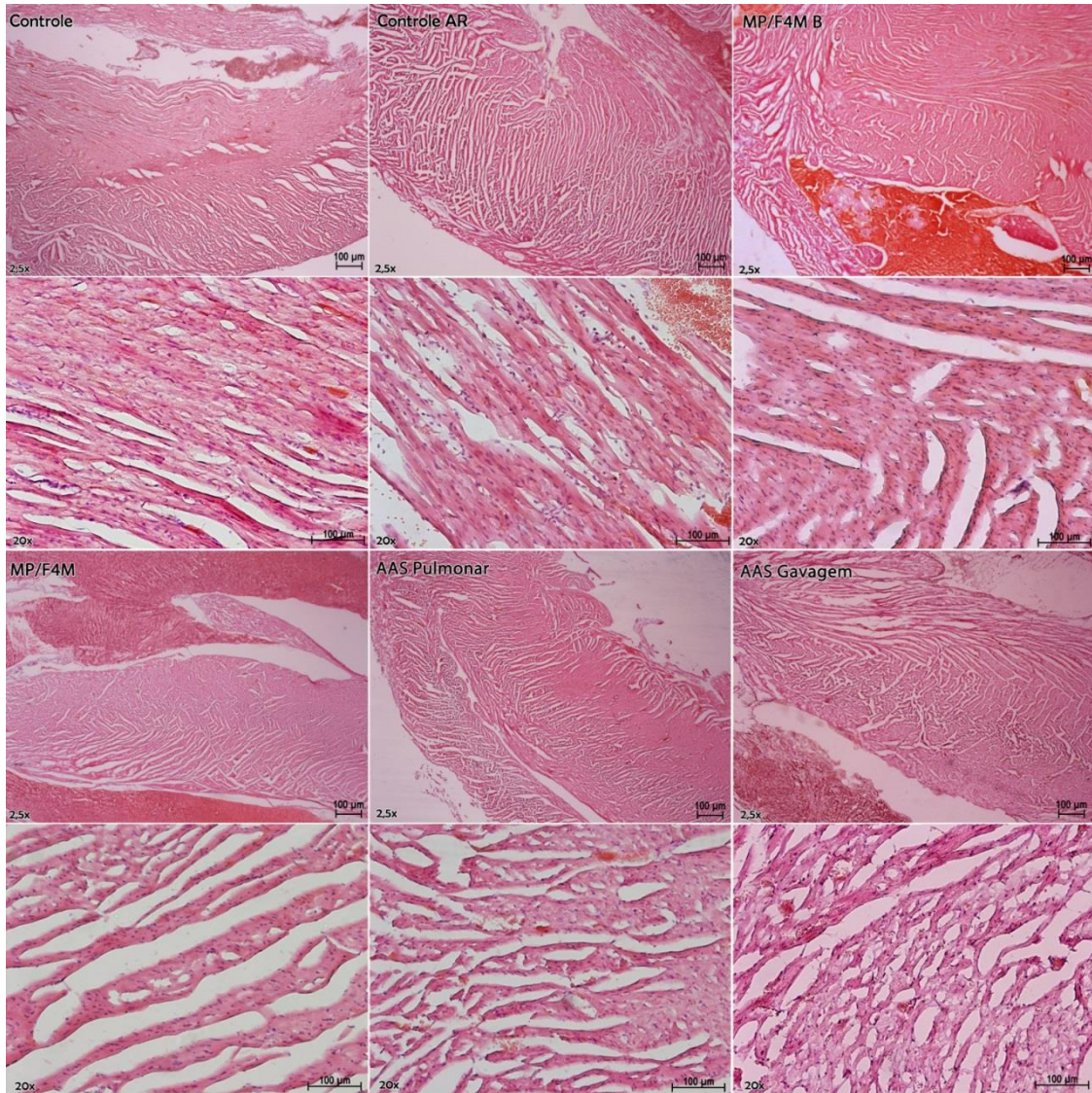


Figura 21

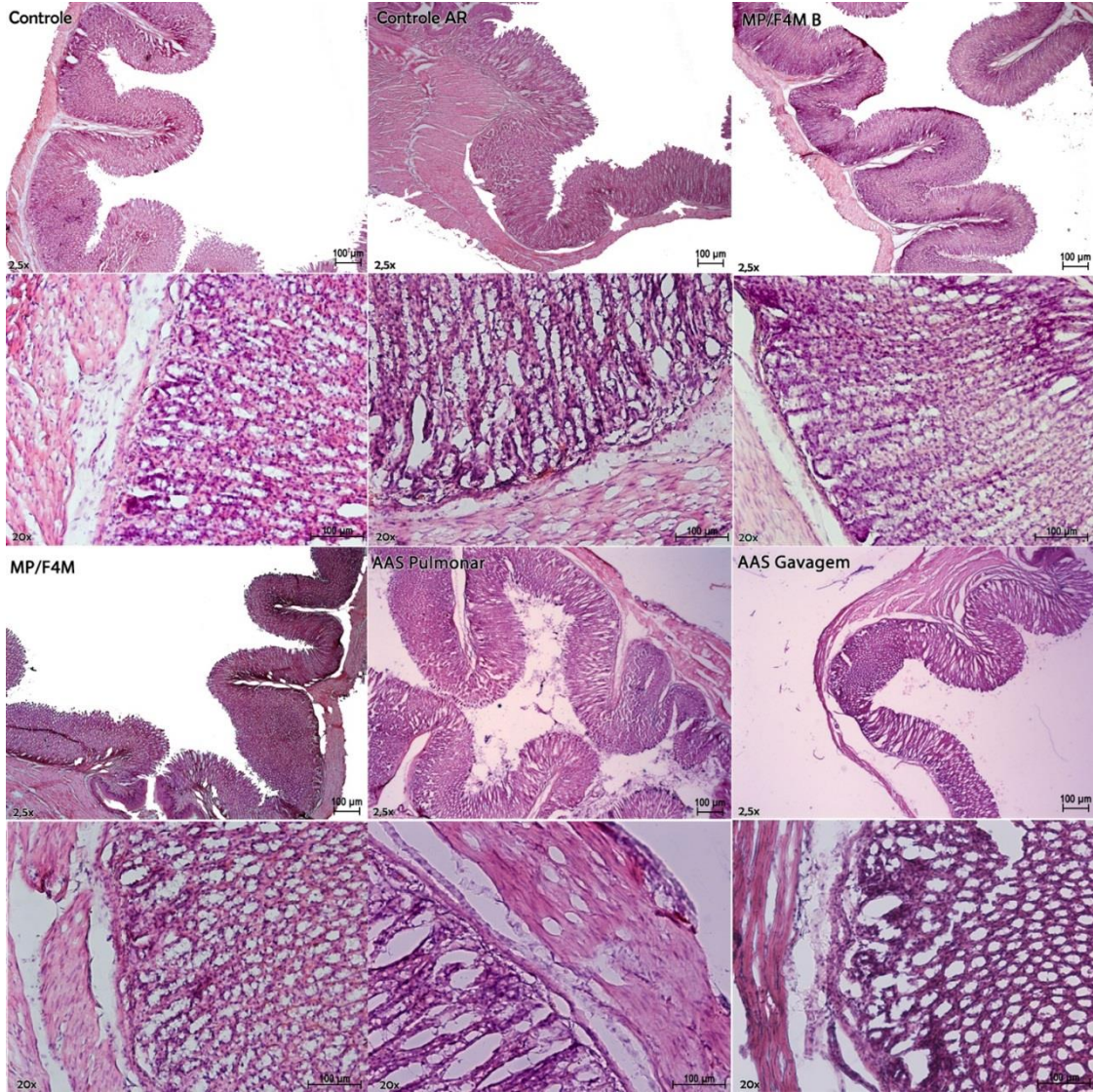


Figura 22

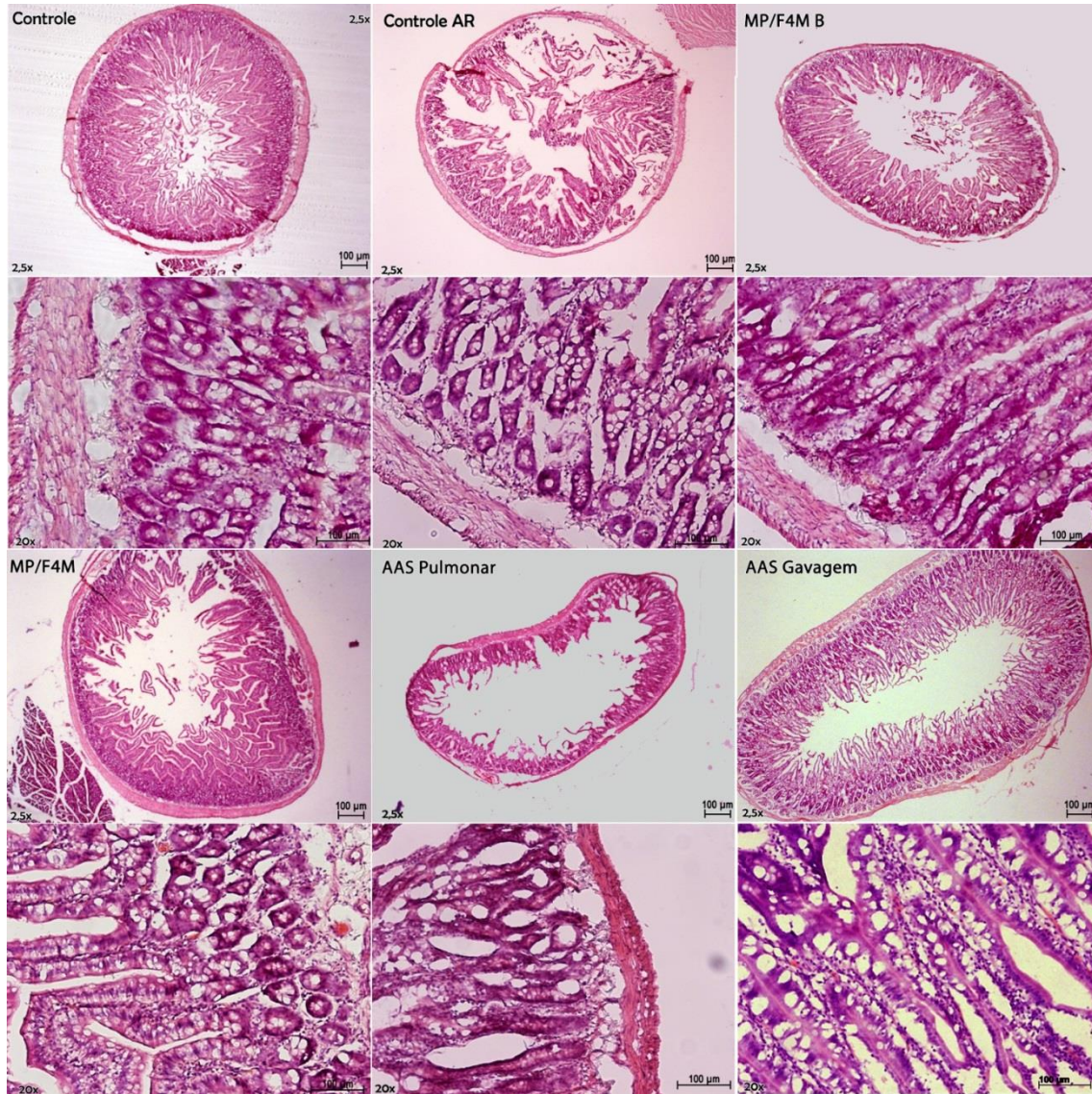


Figura 23

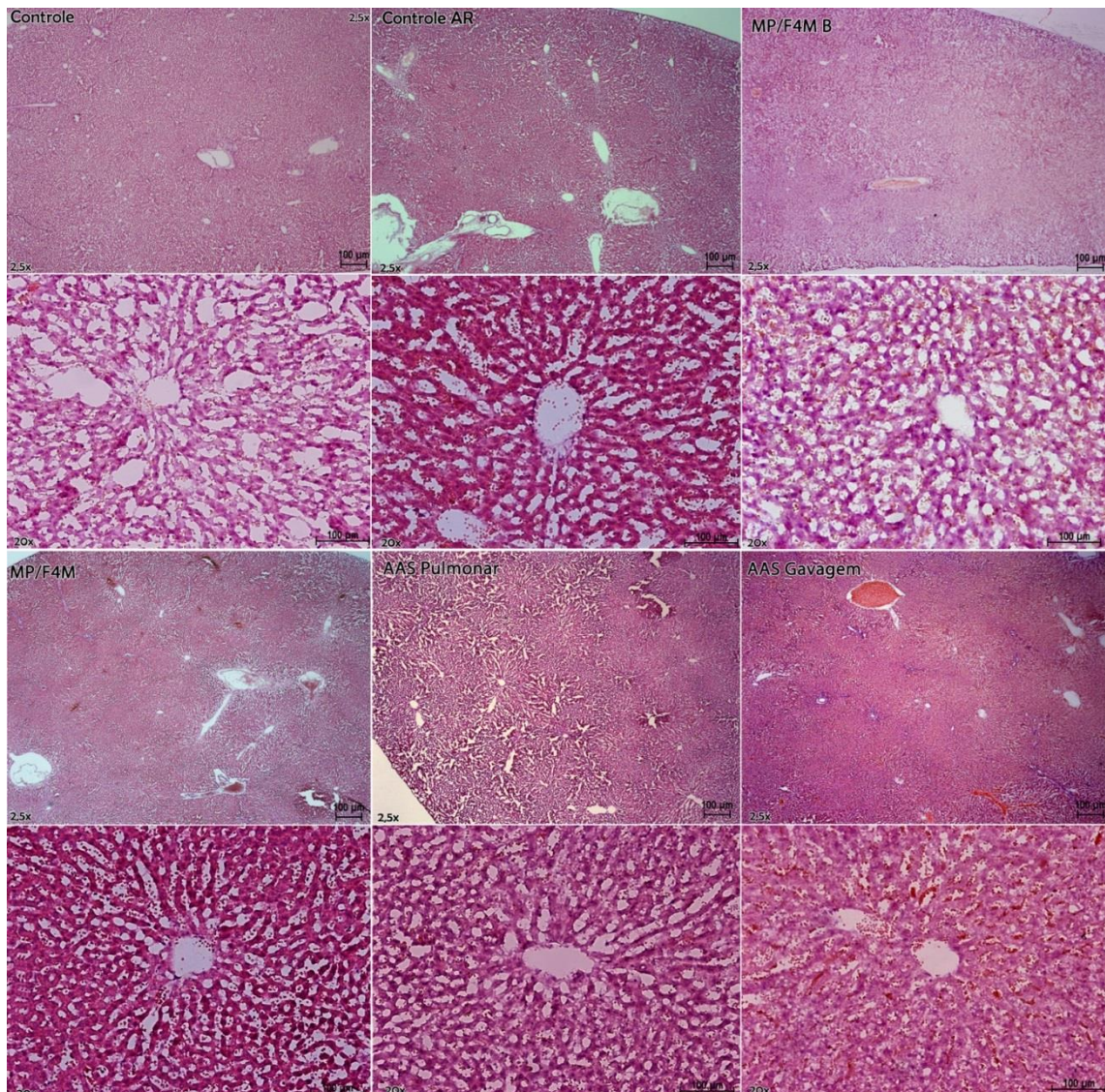


Figura 24

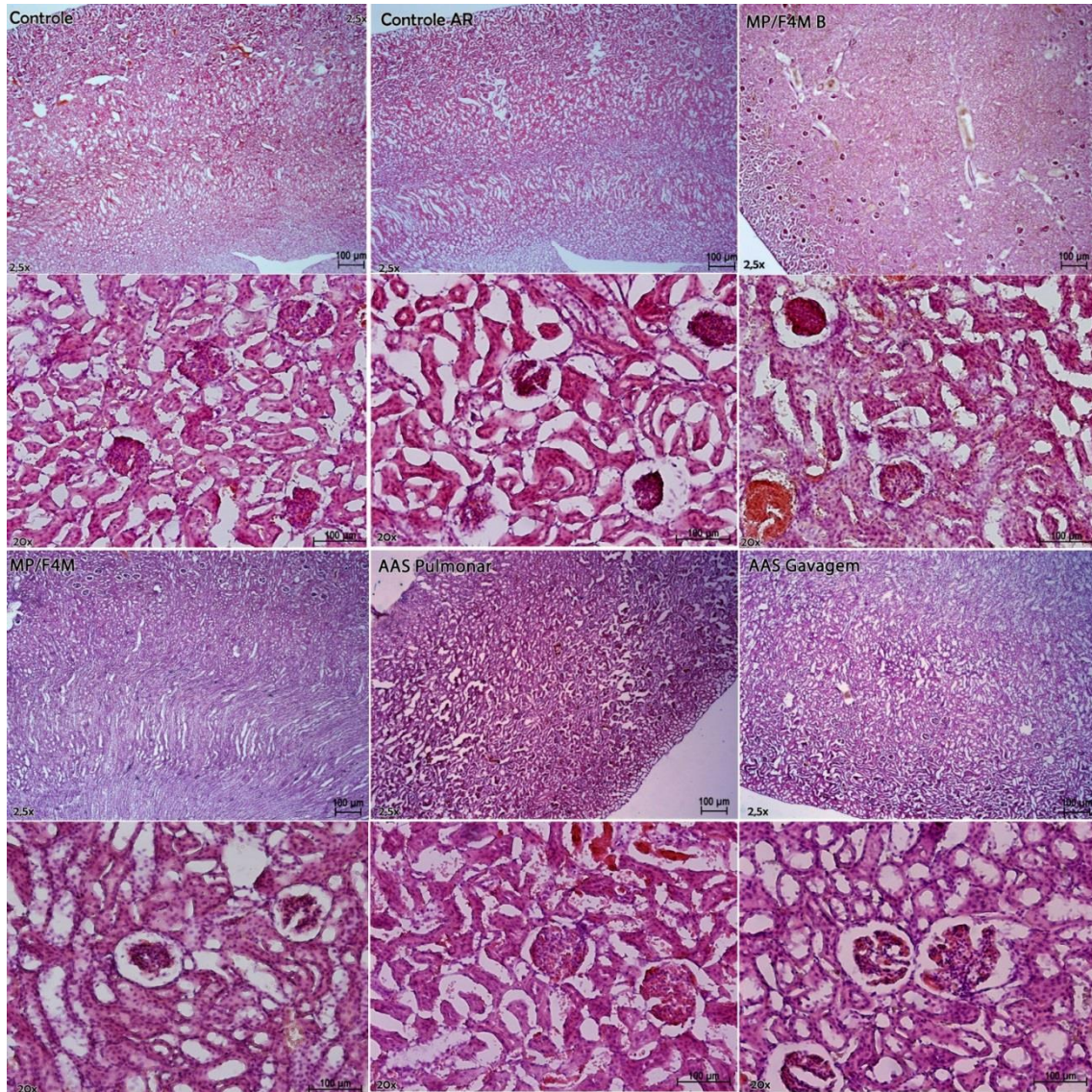


Figura 25

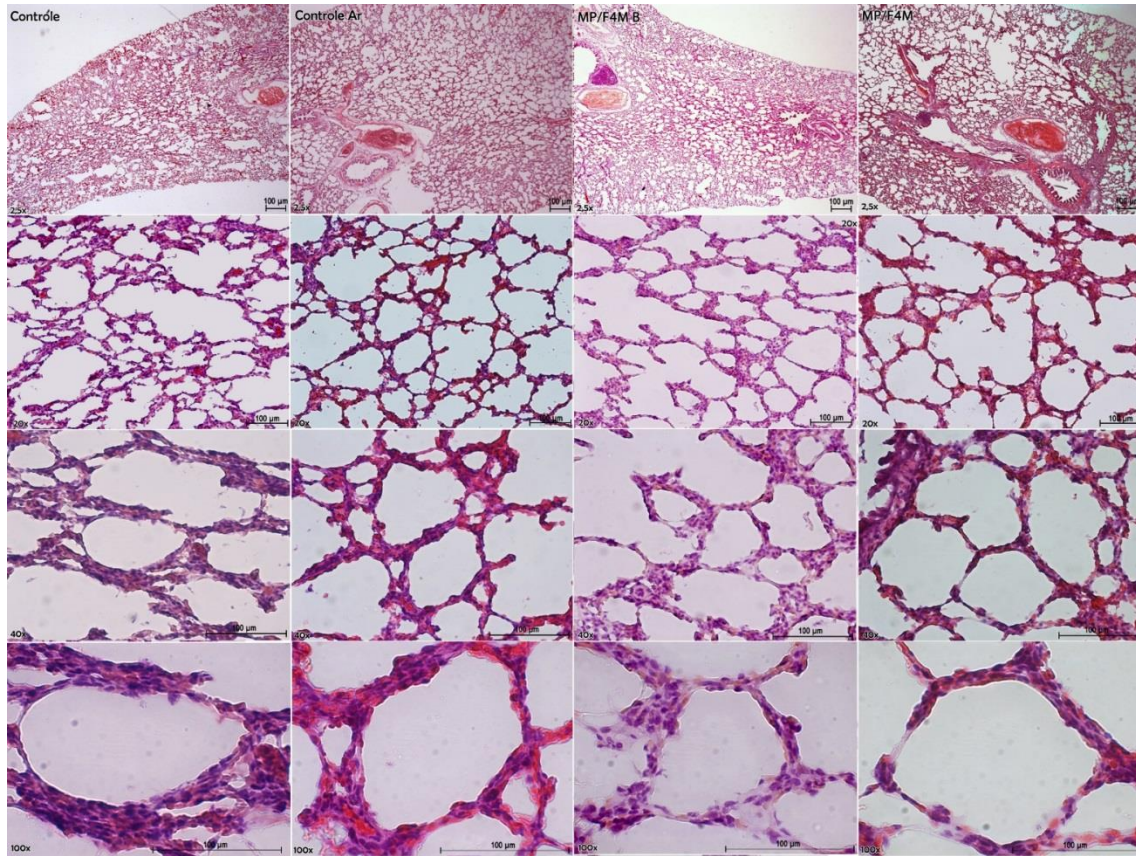
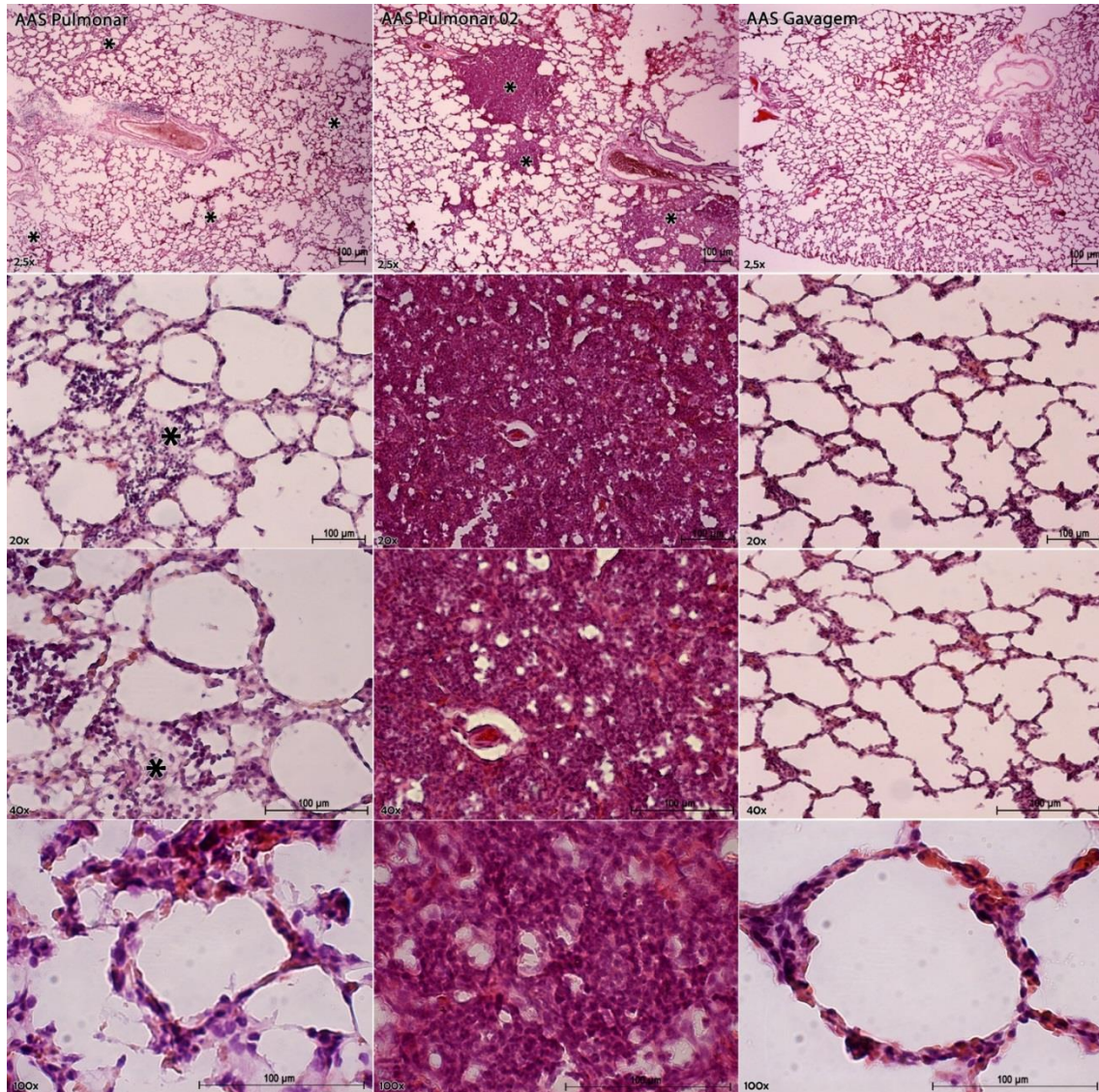


Figura 26



Resumo

MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULA E USO DA COMPOSIÇÃO

O presente invento aparece de forma inovadora ao associar um antiagregante plaquetário clássico utilizado na clínica médica (ácido acetilsalicílico – AAS) em conjunto com um polissacarídeo natural com ligação específica em plaquetas e locais com expressão de P-selectina (fucoidana extraída da espécie *Aschophyllum Nodosum*), um aminoácido ligante com atividade secundária de regeneração tecidual e anti-mucosite (L-lisina), e um promotor de liberação controlada (hidroxipropilmetilcelulose - HPMC), estruturados de forma organizacional como micropartículas bioadesivas de liberação prolongada, baseada nos conceitos de nanotecnologia.

A associação destes, conforme observado nos resultados, acarretou em um aumento da atividade antiagregante plaquetária do AAS, devido principalmente à seletividade da fucoidana, quando comparado ao AAS puro nos ensaios in vivo, com manutenção dos efeitos antiagregantes por até 24 horas. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia e Medicina.