

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

Desenvolvimento tecnológico de micropartículas de quitosana obtidas por *spray-dryer* para administração pulmonar de dapsona

MANOEL ORTIZ DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2010

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

Desenvolvimento tecnológico de micropartículas de quitosana obtidas por *spray-dryer* para administração pulmonar de dapsona

MANOEL ORTIZ DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana R. Pohlmann

Co-orientadora: Msc Denise Soledade Jornada

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2010

AGRADECIMENTOS

À professora Adriana R. Pohlmann, primeiramente pela oportunidade concedida e pela confiança depositada. Pela orientação e pelos conhecimentos compartilhados nesses muitos anos de Iniciação Científica.

À professora Sílvia S. Guterres, pelo acolhimento, atenção e disponibilidade sempre que solicitada.

Aos colegas do laboratório 405 e do K204, pela convivência e compartilhamento de conhecimento nesses anos de trabalho. Em especial à colega Evelise, pois se não fosse ela, provavelmente não estaria neste grupo de pesquisa.

Ao Gui e à Gabi pela companhia, amizade, alegrias e risadas, principalmente fora do laboratório.

À colega Sandra Haas, pela ajuda dourada e crucial no experimento animal de toxicidade pulmonar.

Em especial, à amiga e colega Denise Jornada, pela co-orientação, ajuda e cooperação científica, pelo conhecimento passado e pelas infinitas horas de trabalho no dia-a-dia do laboratório; também ao Josepe, por toda a ajuda prestada, desde a lavagem de uma vidraria, até as caronas para buscar os animais no biotério.

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

À Cássia, pelo amor e compreensão, principalmente nos momentos difíceis e pelos momentos felizes nesses longos anos juntos.

À FAPERGS, pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo apoio financeiro proporcionado.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Pneumonia causada por <i>Pneumocystis carinii</i>	1
1.2 Dapsona: características, farmacologia e indicações terapêuticas.....	2
1.3 Micropartículas.....	4
1.4 Sistemas de liberação pulmonar.....	5
2 OJETIVOS	7
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 Materiais.....	8
3.1.1 Matérias-primas.....	8
3.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	8
3.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais.....	8
3.2 Métodos.....	9
3.2.1 Análise da solubilidade da dapsona em diferentes óleos.....	9
3.2.2 Preparação das micropartículas de quitosana.....	9
3.2.3 Caracterização físico-química.....	10
3.2.3.1 Rendimento.....	10
3.2.3.2 Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das micropartículas.....	10
3.2.3.3 Determinação do potencial zeta.....	10
3.2.3.4 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura.....	11

3.2.3.5 Teor.....	11
3.2.3.6 Perfis de liberação <i>in vitro</i>	11
3.2.3.7 Avaliação dos perfis de dissolução	12
3.2.3.8 Análise da toxicidade pulmonar <i>in vivo</i>	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Análise da solubilidade da dapsona em diferentes óleos.....	15
4.2 Preparação das micropartículas de quitosana.....	15
4.3 Caracterização físico-química das micropartículas.....	16
4.3.1 Rendimento.....	16
4.3.2 Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das micropartículas.....	16
4.3.3 Determinação do potencial zeta.....	18
4.3.4 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura.....	20
4.3.5 Teor.....	22
4.3.6 Perfis de liberação <i>in vitro</i>	22
4.3.7 Modelagem matemática dos perfis de liberação.....	23
4.3.8 Análise da toxicidade pulmonar <i>in vivo</i>	27
5 CONCLUSÕES	30
6 REFERÊNCIAS	32
7 ANEXO	37

RESUMO

A Pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (PCP) é uma das principais doenças oportunistas que acomete pacientes portadores do vírus HIV. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 80 - 85% das pessoas portadoras do vírus sofrem de PCP. Essa infecção é pulmonar e o agente patológico permanece apenas nos pulmões. O tratamento convencional desta doença é com uso de medicação com efeitos colaterais severos, neste contexto, a dapsona (DDS) surge como um tratamento alternativo eficaz contra a PCP, que apresenta menos efeitos colaterais. A dapsona é um fármaco da classe das sulfonas, com atividade bacteriostática e que quando administrado pela via oral causa efeitos adversos nas células do sangue. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é desenvolver micropartículas de quitosana, pela técnica de spray-drying, visando a administração pulmonar com efeito local da dapsona, para o tratamento da PCP. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que o tamanho de partícula obtido foi reduzido e adequado para administração pulmonar (1 - 7 μm). O perfil de dissolução *in vitro* demonstrou uma liberação biexponencial do fármaco a partir das micropartículas, sendo essa caracterizada por uma fase de liberação rápida e outra lenta, o que indica a sustentação da liberação do fármaco.

Palavras-chave: Pneumonia *Pneumocystis carinii* (PCP), micropartículas, spray-drying, liberação pulmonar, dapsona.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*.

As doenças oportunistas são muito comuns em pessoas com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), sendo essas, produtos de dois fatores: redução nas defesas imunológicas, causadas pelo vírus HIV, e a exposição diária a agentes patogênicos. A lista dessas doenças oportunistas é extensa e de origem diversificada, podendo destacar-se: doenças bacterianas (tuberculose e pneumonia bacteriana), doenças de origem fúngica (candidíase e meningite), doenças virais (citomegalovírus e herpes), doenças protozoárias (toxoplasmose e a leishmaniose). Entre essas doenças se destaca a Pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (PCP) (WHO, 1998), doença oportunista mais frequentemente relatada em pacientes portadores do vírus HIV. Estima-se que 80 – 85% das pessoas com AIDS sofram de PCP, e dessas 5 – 28% são casos fatais (Cushion, 1985; Blum, 1992; WHO, 1998; Fishman, 1998; Hughes, 2001; Kovacs, 2001; Chougule, 2008).

O *Pneumocystis carinii*, foi classificado inicialmente como protozoário, mas após estudos específicos, passou a ser classificado como fungo. No entanto, o mais importante a se elucidar são as características biológicas para, dessa forma, achar uma terapia segura e eficaz (Hughes, 2001; Kovacs, 2001).

Através de estudos de microscopia foram evidenciadas três formas de ocorrência do *P. carinii*: cistos, esporozoítos e trofozoítos, contudo nem o modo de transmissão em seres humanos, nem o habitat natural do *P. carinii* foram determinados. O microorganismo já foi encontrado em diversos animais selvagens e de laboratório. No entanto, não foi constatado associação entre esses animais reservatórios e a contaminação de humanos (Hughes, 2001). Na literatura é abordado que o modo de transmissão ocorre pelas vias aéreas a partir de cistos dispersos no ambiente (Hughes, 2001; Kovacs, 2001).

Os principais sintomas da doença são os mesmos da pneumonia: febre, problemas respiratórios, tosse seca, dor no peito, taquipnéia e dispnéia. O diagnóstico da doença é difícil, pois as manifestações clínicas não são específicas para diferenciar a PCP e outras doenças respiratórias comuns sendo necessário raio-x dos pulmões e análise histológica do tecido ou de fluidos pulmonares (WHO, 1998; Hughes, 2001).

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

O tratamento convencional desta doença é o uso da associação de trimetoprima e sulfametoxazol, pela via intravenosa. No entanto, esse tratamento é invasivo, pode não ser efetivo e é o que apresenta maior número de efeitos adversos em relação às outras terapias. Entre esses efeitos adversos estão: erupção cutânea, febre, neutropenia, trombocitopenia, eritema multiforme, nefrotoxicidade (Fishman, 1998; WHO, 1998). Dessa forma, a opção passa a ser por tratamentos alternativos, que apresentam uma relação risco-benefício mais favoráveis. Entre esses está o uso de dapsona, relatado como um dos fármacos mais efetivos para essa patologia (Hughes, 2001).

A infecção e o alojamento do agente patógeno ocorrem nos pulmões, dessa forma é necessário que o agente terapêutico atinja os pulmões para a efetividade do tratamento. As terapias convencionais são pela via oral ou intravenosa. Como a biodisponibilidade do fármaco nos pulmões por essas vias é baixa, torna-se necessário a administração de altas doses. Contudo, estudos da literatura sugerem que uma administração local aumentaria a eficácia do tratamento por aumentar a biodisponibilidade do fármaco em seu sítio de ação, além de diminuir os efeitos adversos por requerer doses menores (Fishman, 1998; Kovacs, 2001; Hughes, 2001; Chougule, 2008).

A administração oral de dapsona, no tratamento de PCP, leva a uma baixa concentração até o sítio de ação, manutenção ineficiente das desordens causadas, baixo índice terapêutico e efeitos adversos críticos. O uso da administração pulmonar sítio-específica pode promover uma maior ação farmacológica, melhora da eficácia terapêutica, diminuição os efeitos adversos extra pulmonares e, portanto, pode ser promissora na manutenção da PCP (Chougule, 2008).

1.2. Dapsona

A dapsona (Figura 1) pertence à classe das sulfonas e é considerada um fármaco efetivo contra diversas patologias. Entre as principais indicações terapêuticas estão: Hanseníase (Opromolla, 1997; WHO, 2009; Reveiz, 2009; Souza, 2010) lúpus eritematoso; Pneumonia por *Pneumocystis carinii* e *Toxoplasma gondii* em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), malária

resistente aos tratamentos convencionais e no Sarcoma de Kaposi (Lee, 1989; Wolf, 2000; Kovacs, 2001; Zhu, 2001; Sago, 2002; Goran, 2010;).

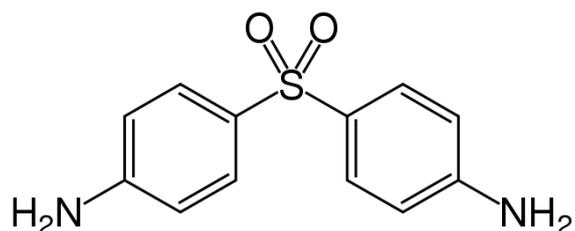


Figura 1. Fórmula estrutural da dapsona.

A dapsona pertence à classe dos antibacterianos, uma das mais importantes entre as classes de medicamentos existentes. De acordo com a nomenclatura química oficial, este fármaco é a 4,4'-Sulfonil bis benzeno amina, sendo também conhecida por 4,4' – diamino difenil sulfona, DDS, entre outros (Opromolla, 1997; Goran, 2010).

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

É um composto lipofílico com uma adequada absorção intestinal (80%) e um tempo de meia-vida de 24 a 36 horas, podendo ser detectada no sangue por até 35 dias devido à reabsorção intestinal através da bile. Quando é absorvida, a dapsona sofre metabolismo de primeira passagem, N-hidroxilação e N-acetilação, mediado por enzimas do citocromo P-450 no fígado (dos Reis Neto, 2006).

Esses compostos resultantes da metabolização da dapsona no fígado são os responsáveis pelos principais efeitos adversos descritos para o seu uso. Entre os principais efeitos adversos causados por esse fármaco estão a anemia hemolítica, metahemoglobinemia e a agranulocitose (Opromolla, 1997; Coleman, 2001; dos Reis Neto, 2006; Kannan, 2009; Goran, 2010). Mesmo assim, esse fármaco é considerado benéfico, seguro e barato nas diversas terapias para as quais é prescrito (Kannan, 2009).

Em 2008, Chougule e colaboradores obtiveram uma formulação pulverulenta a partir de lipossomas contendo Dapsona, para a vetorização pulmonar, visando

uma prevenção efetiva e alternativa contra pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, em pacientes imunodeprimidos. Os resultados demonstraram que o sistema obtido, por *spray-drying*, foi capaz de prolongar a liberação da Dapsona por até 16 horas. Além disso, o autor observou a partir dos resultados obtidos, que essas formulações podem desempenhar um papel promissor na manutenção e prevenção desse tipo de pneumonia. Ainda foi possível constatar que por apresentar uma liberação prolongada no local de ação, era possível um intervalo entre doses maior o que leva a redução dos efeitos colaterais sistêmicos.

1.3. Micropartículas

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

As micropartículas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas são sistemas que possuem um núcleo como reservatório de fármaco envolto por uma parede geralmente polimérica. Já as microesferas são compostas por uma matriz polimérica onde a substância carreada pode estar uniformemente distribuída (Andrianov, 1998; Ravi Kumar, 2000; Kawagushi, 2000; Jyothi, 2010).

Esses sistemas são amplamente estudados como uma alternativa às terapias convencionais. Apresentam várias vantagens em relação aos sistemas unitários convencionais como a possibilidade de modular o perfil de liberação de fármacos. O controle da liberação de fármacos se dá pelo tempo que este precisa para se difundir através do carreador e só então ficar em contato com o meio externo (Kim, 2000).

A microencapsulação ainda pode promover o aumento da biodisponibilidade de fármacos insolúveis administrados pela via oral (Yang, 2005). É possível ainda obter um efeito protetor do fármaco, aumentando a estabilidade, melhorando a eficiência dos tratamentos, o que permite, muitas vezes, a administração de doses menores (Kim, 2000; Esposito, 2002;).

Quanto aos métodos de preparação das micropartículas, vários são descritos na literatura, podendo-se citar a coacervação complexa, separação de fases poliméricas, polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação de solvente, aspersão, entre outros (Thies, 1996). Dentre estes, destaca-se a secagem

por aspersão (*spray-drying*) por ser um processo rápido, realizado em única etapa, de baixo custo, que não utiliza solvente orgânico, sendo ainda passível de transposição de escala (Oneda e Ré, 2003).

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

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

1.4. Sistemas de liberação pulmonar

Nos últimos anos, o desenvolvimento de rotas alternativas às vias de administração convencionais tem sido o foco de muitas pesquisas na área científica. Entre essas, a via pulmonar apresenta vantagem devido à grande área superficial alveolar para absorção de fármacos, extensiva vascularização tecidual, fina barreira epitelial, baixa ação do metabolismo enzimático da região (em relação às outras vias de administração) ausência de metabolismo de primeira passagem, redução de alguns efeitos colaterais e possibilidade de redução na frequência de dose (Grenha, 2005; Learoyd, 2009; El-Sherbiny, 2009; El-Sherbiny, 2010; Thomas, 2010; Hamishehkar, 2010;).

No entanto, o pré-requisito para desenvolvimento de carreadores para uso por via pulmonar é a garantia das características aerodinâmicas do sistema (El-Sherbiny, 2009). Para isso é necessário um diâmetro reduzido que possibilite a inalação e chegada das partículas até os alvéolos pulmonares. Um adequado tamanho de partícula, (entre 0,5 e 6 μm) garante a máxima deposição nos pulmões e uma maior eficiência das micropartículas. No entanto, as partículas não devem ter um tamanho maior que 6 μm , pois a chegada às partes profundas dos pulmões poderia ser prejudicada e ainda a atividade enzimática e poder de opsonização pelos macrófagos poderia ser aumentada (Grenha, 2005; Learoyd, 2009; El-Sherbiny, 2010). Em contrapartida, o tamanho de partícula não pode ser muito reduzido, pois

partículas muito pequenas podem ser exaladas durante a expiração (El-Sherbiny, 2010).

Em um estudo feito por El-Sherbiny e colaboradores (2010), foram preparadas micropartículas com quitosana, PEG e Pluronic[®], para a liberação pulmonar sustentada de fluorsceína sódica. Como resultado foi obtido um sistema com tamanho de partícula adequado para a inalação, que quando em contato com alvéolos pulmonares sofria inchamento, proporcionando uma liberação sustentada do fármaco com uma redução da atividade fagocitária dos macrófagos (El-Sherbiny, 2010).

Learoyd e colaboradores (2009) desenvolveram micropartículas de quitosana, por spray-dryer, contendo dois modelos de fármacos. Um hidrofílico, representado pelo sulfato de terbetalina e um hidrofóbico, representado pelo dipropionato de beclometasona, para a administração pulmonar. Neste estudo foi avaliada a relação entre quitosanas de diferentes pesos moleculares e o perfil de liberação obtido em diferentes meios de dissolução. O resultado obtido foi que à medida que se aumentava o peso molecular da quitosana, um perfil de liberação mais controlado era obtido.

Em seu estudo, El-Sherbiny e colaboradores (2010), mostraram a eficiência de um novo sistema carreador nano/microestruturado, obtido pela técnica de secagem por aspersão, para administração de uma proteína-modelo. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram uma liberação pulmonar controlada em relação ao controle.

Grenha e colaboradores (2005) avaliaram o uso de micropartículas para liberação pulmonar. Foi avaliado um estudo comparativo da liberação da insulina a partir das nanopartículas de quitosana livres e destas microencapsuladas. Os perfis de liberação não mostraram diferença significativa no total liberado de insulina. No entanto, a microencapsulação das nanopartículas de quitosana por *spray-drying*, proporcionou a utilização desse sistema como pó inalatório, com características aerodinâmicas adequadas para o uso pulmonar da insulina, como alternativa à administração convencional.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a redução da toxicidade pulmonar da dapsona microencapsulada em partículas catiônicas obtidas por secagem por aspersão.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar micropartículas de quitosana contendo dapsona, pela técnica de secagem por aspersão;
- Realizar a caracterização físico-química das micropartículas;
- Realizar estudos de liberação *in vitro*, com objetivo de avaliar os perfis de liberação da dapsona a partir das micropartículas;
- Avaliar a toxicidade pulmonar da micropartículas, através da análise do fluido de lavagem bronco alveolar (FLBA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias-primas:

- Dapsona (Deg, São Paulo, Brasil)
- Quitosana (Sigma Aldrich)
- Óleo de Framboesa (Embacaps)
- Monooleato de sorbitano - Span 80[®] - (Sigma Aldrich)
- Polissorbato 80 - Tween 80[®] - (Deg, São Paulo, Brasil)
- Uretana (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS)
- Solução fisiológica

3.1.2. Aparelhos e equipamentos:

- Mini Spray Dryer MSD 1.0 Lab Maq (Ribeirão Preto, Brasil);
- Homogeneizador Panda 2K NS 1001L;
- Espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV – 160A)
- Metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN (Tóquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol Scanning Microscope JSM-5800 (Tóquio, Japão);
- Zetasizer[®] NanoSeries – Malvern Instruments (Reino Unido)
- Master Sizer 2000 – Malvern Instruments (Reino Unido)
- Ultrasson (Ultra Cleaner 1400A – Unique)
- Ultraturrax (T25 basic IKA[®] - WERK)
- Dissolutor Vankel – VK7010
- Centrífuga
- Micro seringa Model DP-4 Dry Powder Insufflator[™] (PennCentury)

3.1.3. Solventes, reagentes e outros materiais:

- Acetonitrila PA - Vetec
- Fosfato de potássio monobásico - Nuclear (São Paulo, Brasil);
- Hidróxido de sódio – Nuclear (São Paulo, Brasil)

- Etanol P.A. (Synth, Diadema, São Paulo)
- Água Milli-Q

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Análise da solubilidade da dapsona em diferentes óleos

A solubilidade da dapsona foi avaliada em diferentes óleos: buriti, semente de uva, triglicerídeos de cadeia média, girassol, semente de framboesa, copaíba, rosa mosqueta, castanha do Brasil e cravo. Para isso, uma quantidade de dapsona (50 mg) foi deixada sob agitação magnética com o óleo (1 mL) por 24 horas à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos, em centrífuga de eppendorfs, e o sobrenadante foi coletado. Após diluição, as amostras foram quantificadas por espectroscopia no UV a partir de metodologia previamente validada (ANEXO 1).

3.2.2. Preparação das micropartículas de quitosana

Para a obtenção das micropartículas de quitosana, contendo dapsona, foi feita uma emulsão entre uma fase aquosa contendo uma solução aquosa ácida de quitosana (1% m/v – 250 mL), juntamente com tensoativo polissorbato 80 (0,0875g) e uma fase oleosa contendo dapsona (0,25g), óleo de framboesa (0,5g), monooleato de sorbitano (0,0875g) e etanol (12,5 mL). Essa formulação foi deixada sob agitação magnética e então homogeneizada em ultra-turrax por cinco minutos e logo após nebulizada em *spray-dryer*, sob as condições de secagem: temperatura de entrada 150°C, pressão de 5 KgF e fluxo 0,3 L/h. Essa formulação foi chamada de MPDapT.

Uma parte da emulsão primária foi submetida ao processo de homogeneização à alta pressão (3 ciclos, 500 bar) para verificar se a homogeneidade da emulsão primária teria interferência nas micropartículas formadas. Essa segunda formulação foi chamada de MPDapH.

A formulação branca (MPBranca) foi preparada da mesma forma que a MPDapT, porém sem a adição do fármaco.

3.2.3. Caracterização físico-química das micropartículas

3.2.3.1. Rendimento

O rendimento foi calculado dividindo a massa pesada após a preparação das micropartículas pela soma de todas as massas das matérias-primas de cada formulação, excluindo-se a água e o etanol, conforme descrito na Equação 1.

Equação 1

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

3.2.3.2. Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das micropartículas

O diâmetro e distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados, a 25 °C, pela técnica de difratometria de laser, utilizando o equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram adicionadas ao aparato de dispersão contendo aproximadamente 100 mL de água destilada. A quantidade de amostra adicionada foi aquela suficiente para atingir uma obscuração entre 0,02 e 0,1. Antes de cada análise ser feita foi procedida a medida de leitura de fundo (background). Para cada amostra foram realizadas 6 leituras com intervalos de 5 minutos.

3.2.3.3. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado, em triplicata de leitura, pela técnica de mobilidade eletroforética utilizando o equipamento NanoSizer[®] ZS (Malvern Instruments, UK). Para isso, 20 mg das micropartículas foram suspensas em uma solução de NaCl 10 mM (previamente filtrada em membrana de 0,45 µm) com auxílio de banho de ultrassom.

3.2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica foi realizada no Centro de Microscopia da UFRGS, por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Jeol Scanning Microscope JSM-5800). As amostras foram metalizadas em ouro (metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN) e analisadas em diferentes aumentos.

3.2.3.5. Teor

Para o cálculo do teor de fármaco nas micropartículas, exatamente cerca de 50 mg de pó foram adicionadas a um balão volumétrico de 100 mL com acetonitrila e mantida sob agitação por 10 minutos seguidos de 30 minutos de homogeneização em banho de ultrassom. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, diluído (200 µL em um balão de 10 mL), filtrado em membrana de 0,45 µm (Durapore, Millipore®) e analisado por espectroscopia UV conforme metodologia previamente validada (ANEXO1).

3.2.3.6. Perfis de liberação *in vitro*

Os experimentos foram realizados em dissolutor (Vankel VK7010) utilizando-se tampão pH 6,8 (tampão fosfato), em cubas de 900 mL, respeitando a condição *sink* ($C_s = 400 \mu\text{g/mL}$), metodologia de cestas (USP 1) e velocidade de agitação de 100 rpm. Cada um dos ensaios foi realizado em duplicata.

A massa de micropartículas utilizada foi de 150 mg, acondicionada em cápsulas de gelatina dura. As amostras foram coletadas automaticamente (5 mL, coletor VK8000) nos tempos 5, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 90, 120, 240, 480, 720, 960 e 1440 minutos, sem reposição de meio e analisadas posteriormente por espectroscopia UV em 260 nm (metodologia previamente validada).

3.2.3.7. Avaliação dos perfis de dissolução

As curvas de dissolução foram construídas a partir dos dados de dapsona liberada (%) em função dos tempos de coleta. Posteriormente esses perfis foram

avaliados por diferentes metodologias: métodos modelo dependentes e eficiência de dissolução.

A eficiência de dissolução (ED) foi determinada segundo a metodologia descrita por Khan (1975) e comparada entre o fármaco livre e as duas formulações microparticuladas através do método estatístico ANOVA ($\alpha = 0,05$). A ED é uma avaliação modelo-independente que pode ser definida a partir da área sob a curva de dissolução, sendo expressa como a porcentagem da área de um retângulo que descreve 100 % da dissolução de um determinado período de tempo (Equação 2). Para o cálculo da área sob a curva foi utilizado o software Origin[®] 7.0.

Equação 2

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

A modelagem matemática dos perfis de liberação foi realizada com o auxílio do programa Micromath Scientist[®] (versão 3.0, Micromath[®], Inc., EUA) através do ajuste dos dados experimentais a dois modelos: monoexponencial (Equação 3) e biexponencial (Equação 4).

Equação 3

$$\%D = 100(1 - e^{-kt})$$

Equação 4

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

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

A escolha do modelo que melhor descreveu os dados experimentais foi feita através da análise do critério de seleção do modelo (MSC), do coeficiente de correlação e do ajuste do gráfico.

Após a determinação do modelo que melhor descreve os dados experimentais de dissolução, a

Equação 5 (Shargel, 2005) foi utilizada para o cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de liberação para cada formulação.

Equação 5

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

Onde K é a constante cinética determinada na modelagem dos dados.

Ainda foi aplicado o modelo da Lei das Potências aos perfis de dissolução para a obtenção dos parâmetros a e n , os quais caracterizam um sistema quanto às características estruturais e geométricas, além do mecanismo de liberação do fármaco (Equação 6).

Equação 6

$$ft = at^n$$

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

3.2.3.8. Análise da toxicidade pulmonar

A análise do fluido de lavagem bronco alveolar (FLBA) é um método efetivo para a detecção de resposta inflamatória pulmonar, o qual permite a detecção de qualquer anormalidade nas células e componentes bioquímicos do trato respiratório inferior (Kowal-Bielecka, 2010). Dentre as várias metodologias descritas na literatura para avaliar a toxicidade pulmonar de uma substância, a análise do FLBA é um dos métodos mais descritos para a identificação de agentes citotóxicos (Henderson, 2005).

Algumas substâncias inaladas podem induzir mudanças no trato respiratório, promover alterações em parâmetros bioquímicos e na permeabilidade do pulmão e, em última instância, provocar a morte do indivíduo (Cryan, 2007). O aumento de proteínas e um fluxo anormal de neutrófilos são as alterações mais sensíveis a uma resposta inflamatória no FLBA. Portanto, pode-se detectar mudanças na permeabilidade do epitélio pulmonar através da determinação da concentração de proteínas totais. A determinação de marcadores de citotoxicidade pulmonar, tais como a enzima lactato desidrogenase (LDH), proteínas totais, fosfatase alcalina,

entre outros, figura entre os métodos mais utilizados para avaliação da toxicidade de materiais inaláveis (Henderson, 2005; Hussain, 2006).

A LDH é uma enzima citoplasmática fundamental na oxidação de L-lactato a piruvato e está presente na maioria dos tecidos do organismo humano. Uma vez que acontece morte celular, a LDH é liberada para o meio extracelular. Deste modo, níveis extracelulares aumentados de LDH estão relacionados com dano e morte celular (Krugten, 1996). A determinação da concentração de proteínas totais no fluido bronco alveolar é outro importante indicador de integridade celular, pois, na presença de um agente exógeno, proteínas podem ser liberadas no espaço alveolar devido à perda da integridade da barreira epitelial alvéolos-capilares (Zhang, 1996). Estudos com animais têm demonstrado que a avaliação do teor de proteínas totais é um marcador sensível para inflamação (Hussain, 2006).

Para a avaliação da toxicidade pulmonar das micropartículas foram utilizados 12 ratos Wistar machos. Esses animais foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura, claridade, água e alimentação. Os animais foram divididos em 3 grupos de 4 animais:

- Grupo Controle positivo – Dodecil Sulfato de Sódio 0,1% (SDS)
- Grupo Teste – Micropartículas de quitosana contendo Dapsona
- Grupo Comparativo – Dapsona

Os animais foram anestesiados com solução de uretana (1,25g/Kg, I.P.), previamente aos experimentos. Para a administração intratraqueal dos tratamentos, a traquéia foi exposta e uma incisão realizada entre o 5º e 6º anel traqueal. Os tratamentos foram administrados com auxílio de uma micro seringa com quantidades pré-determinadas de cada tratamento para cada grupo. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e os pulmões removidos. Após lavagem adequada dos pulmões, o fluido de lavagem foi centrifugado e o sobrenadante coletado para quantificação de lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase alcalina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da solubilidade da dapsona em diferentes óleos

O resultado dessa análise (Figura 2) demonstrou que a maior quantidade de dapsona solubilizada foi encontrada no óleo de semente de framboesa (1,14 mg/mL), sendo esse o óleo escolhido para o desenvolvimento da formulação. Os óleos de semente de uva e rosa mosqueta não apresentaram quantidades detectáveis de dapsona solubilizada.

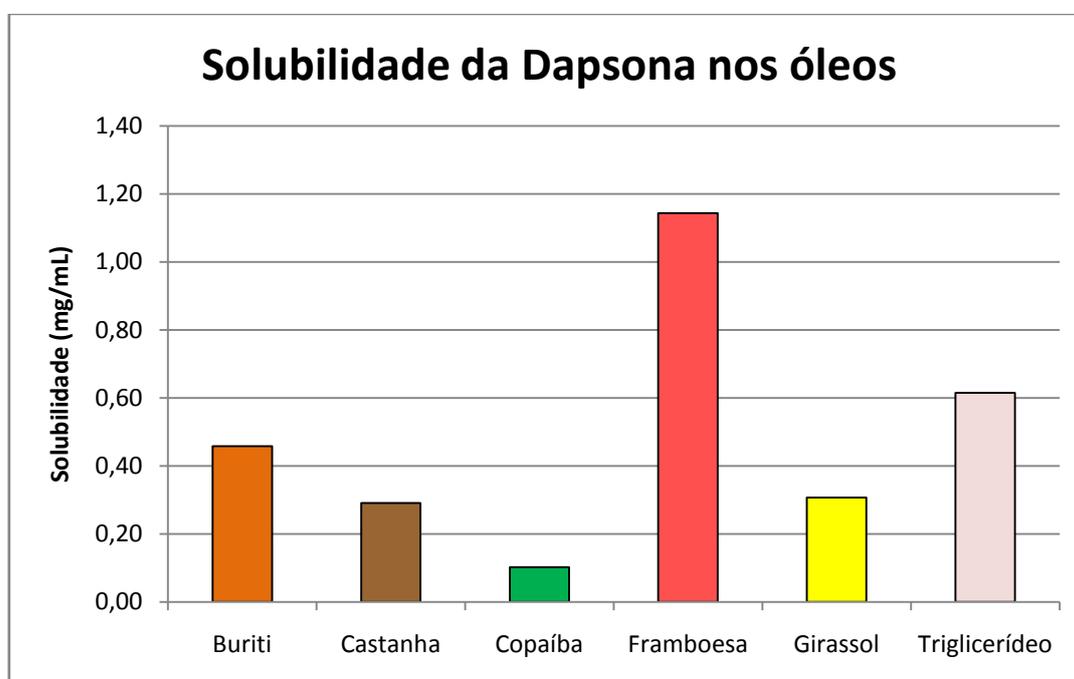


Figura 2. Solubilidade da dapsona (mg/mL) para os diferentes óleos testados.

4.2. Preparação das micropartículas de quitosana

As micropartículas de quitosana, contendo dapsona, foram obtidas com sucesso seguindo a metodologia previamente descrita. As partículas obtidas a partir da emulsão preparada em ultraturrax (MPDapT) apresentaram coloração amarelada,

característica esta de sistemas microparticulados contendo quitosana (Learoyd, 2009), pulverulentas, e levemente aglomeradas.

Já os pós obtidos a partir da emulsão preparada em homogeneizador (MPDapH) apresentaram uma coloração amarelo-claro, pulverulentas, no entanto, com menor tendência a aglomeração.

4.3. Caracterização físico-química das micropartículas

4.3.1. Rendimento

Os rendimentos obtidos foram de 29% e 27% para as formulações MPDapH e MPDapT, respectivamente. Esses valores estão abaixo dos obtidos pela técnica proposta (*spray-drying*), contendo quitosana descritos na literatura – de 40 a 75% (Grenha, 2005; Alhalaweh, 2009). Os motivos para o baixo rendimento pode ser por perda de pó que fica adsorvido na torre de secagem e ainda parte dele é perdido pela parte superior do ciclone.

4.3.2. Determinação do diâmetro e distribuição de tamanho das micropartículas

A análise granulométrica das micropartículas foi realizada através de difratometria de laser utilizando água como meio não-solvente. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição granulométrica por difração de laser das micropartículas.

Amostra	MPDapH	MPDapT	MPBranca
d(0,1) (µm)	7.7	7.5	25.5
d(0,5) (µm)	14.3	19.8	67.4
d(0,9) (µm)	25.9	51.7	163.9
SPAN	1.271	2.231	2.054
D (4,3) (µm)	15.7	31.3	83.8

As partículas se apresentam aglomeradas. No entanto, na análise de difratometria de laser da MPDapH (Figura 3) evidenciou a clara tendência a desaglomeração das partículas, o que não foi observado para a formulação MPDapT (Figura 4).

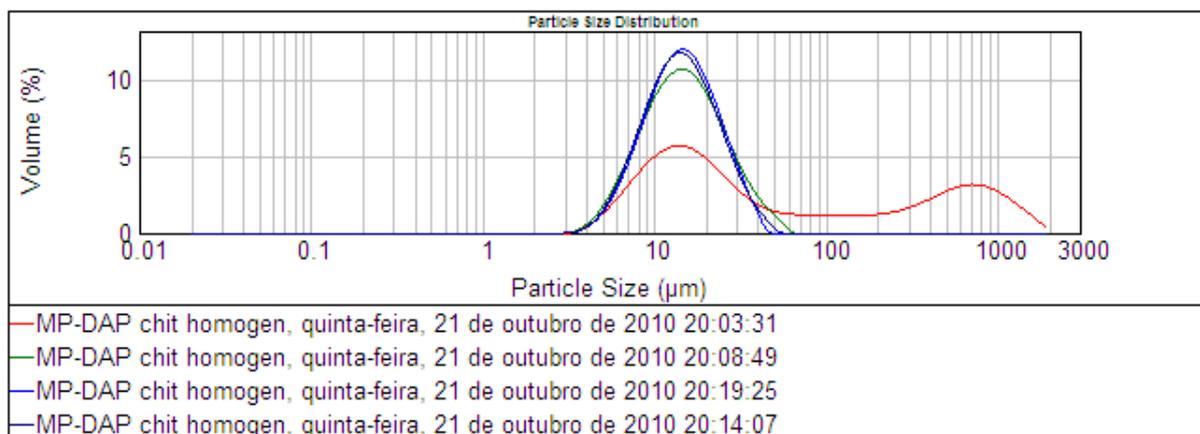


Figura 3. Distribuição de tamanho de partícula da MPDapH mostrando a desaglomeração.

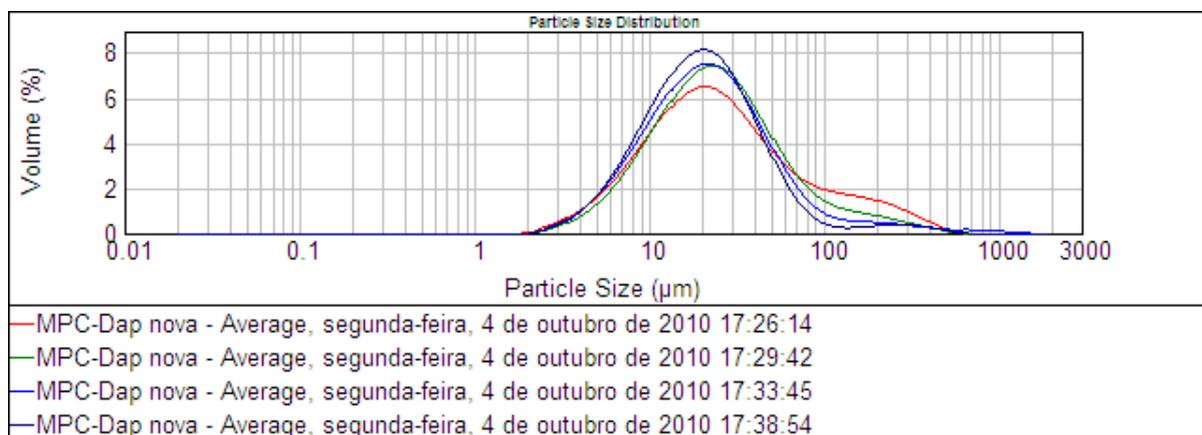


Figura 4. Distribuição de tamanho de partícula da MPDapT mostrando a desaglomeração.

O diâmetro médio baseado na determinação do volume das partículas (D [4,3]) apresentou valores diferentes para as formulações MPDapT e MPDapH. As partículas obtidas por homogeneização a alta pressão apresentaram um diâmetro de aproximadamente 15 μm e um SPAN baixo (1.271), indicando uma maior

homogeneidade de distribuição de tamanho, ou seja, baixa polidispersão. Já a MPDapT apresentou um tamanho de partícula de aproximadamente 31 μm e um SPAN maior (2.231), indicando maior polidispersão do sistema. Esses resultados sugerem que a passagem da emulsão primária em homogeneizador melhora a homogeneidade dos componentes das micropartículas além de diminuir o tamanho da gotícula da emulsão primária obtendo assim um sistema com distribuição granulométrica mais estreita.

A formulação branca apresentou diâmetro maior. Uma explicação pra essa diferença pode ser por uma provável agregação maior das partículas brancas. Na análise por difratometria de laser essa formulação mostrou uma tendência a desaglomeração maior que a MPDapT (Figura 5).

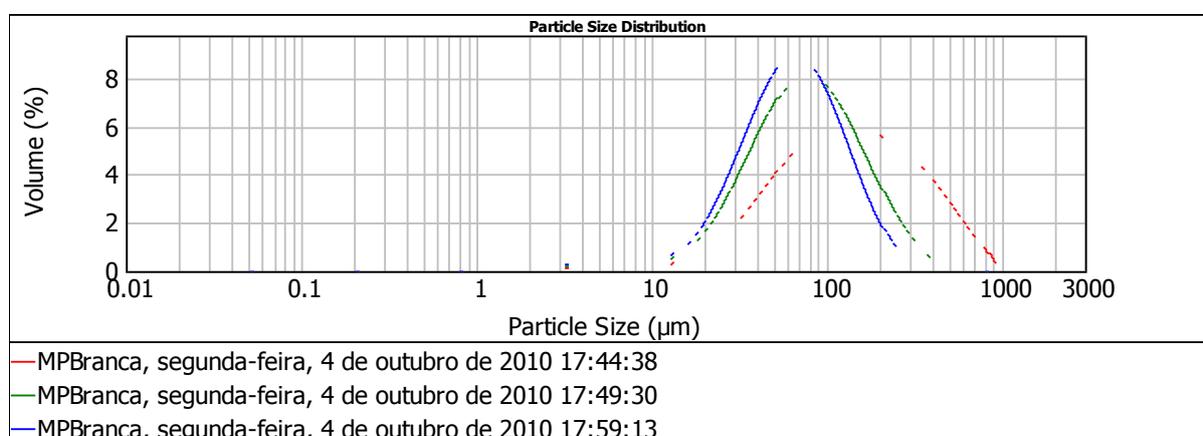


Figura 5. Distribuição de tamanho de partícula da formulação branca mostrando a desaglomeração.

O diâmetro obtido por esta técnica é superior ao que é indicado para a administração pulmonar (0,5 – 6 μm), dessa forma torna-se necessária avaliação por microscopia eletrônica de varredura.

4.3.3. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta de ambas as formulações (MPDapH e MPDapT) foi de aproximadamente +30 mV, característico de sistemas que contêm a quitosana (polímero catiônico) na composição. Os gráficos representados na Figura 6 e na Figura 7 apresentam a distribuição do potencial zeta de MPDapH (+29,2 mV) e MPDapT (+32,8 mV), respectivamente.

Quando comparado o potencial zeta das micropartículas contendo dapsona, com a formulação branca (sem a presença de fármaco), 4,2 mV, observou-se uma diferença expressiva nos valores. Essa diferença pode ser devido a presença de fármaco na superfície da partícula, dessa forma a ionização de grupamentos de moléculas do fármaco contribuíram para o aumento do potencial zeta. Além disso, o baixo valor de potencial zeta da formulação branca pode ter propiciado uma aglomeração maior das partículas no momento da análise de diâmetro de partícula, o que corrobora com o resultado obtido por difratometria de laser, gerando um diâmetro superior ao das partículas carregadas com fármaco.

Os valores de potencial zeta mais elevados tornam-se vantajosos, pois podem garantir uma maior estabilidade das micropartículas quando essas entrarem em contato com os fluidos biológicos. Assim evita-se a formação de aglomerados ao longo do trato respiratório, os quais poderiam dificultar a chegada da formulação aos bronquíolos devido ao tamanho.

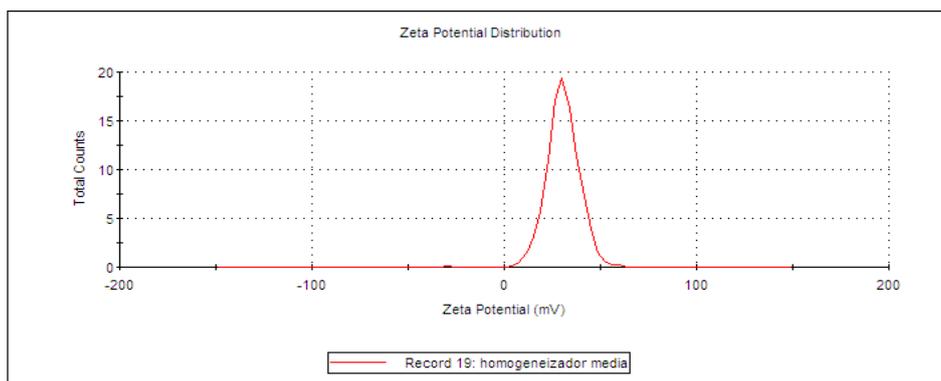


Figura 6. Distribuição do potencial Zeta da formulação MPDapH.

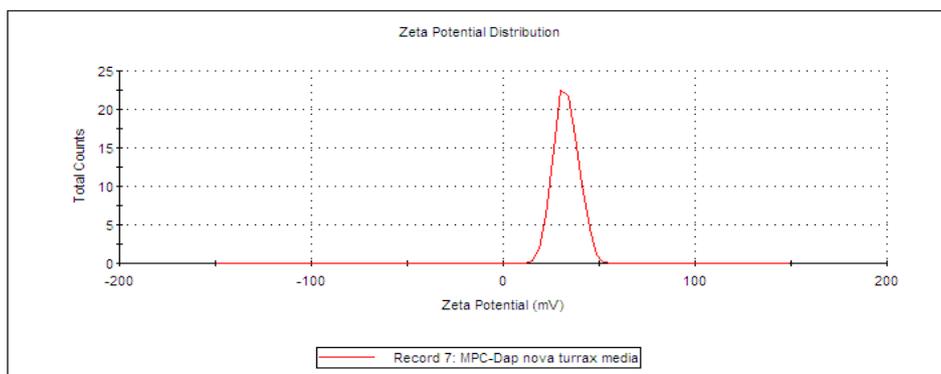


Figura 7. Distribuição do potencial Zeta da formulação MPDapT.

4.3.4. Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura é muito importante na caracterização de micropartículas. Essa técnica permite a observação da morfologia das partículas, topografia, presença ou não de poros, determinação do tamanho de partícula primária isolada e ainda a verificação da distribuição do sistema.

A Figura 8 corresponde às micropartículas provenientes a partir da emulsão primária passada em homogeneizador (A e B), MPDapH e provenientes do ultraturrax (C e D). Pode-se observar que essas partículas são esféricas, o que está de acordo com a literatura, que relata que partículas obtidas por *spray-drying* e quitosana, geralmente apresentam esse formato (Alhalaweh, 2009; Learoyd, 2009).

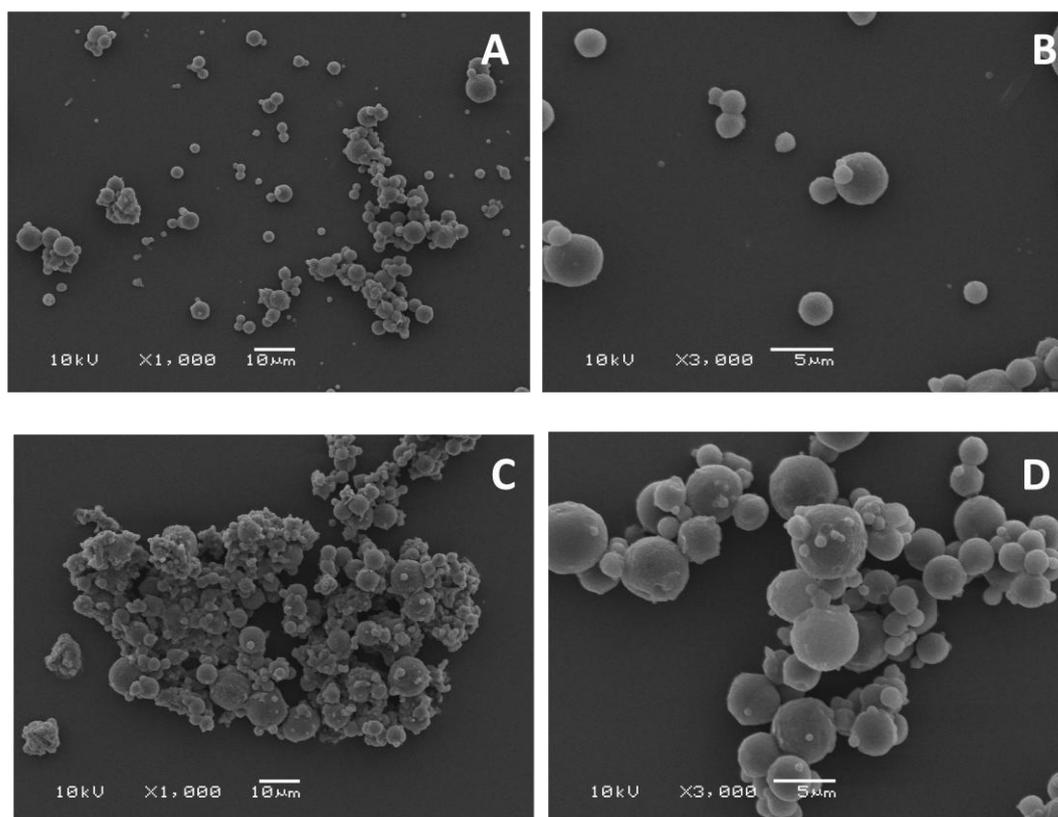


Figura 8. Fotomicrografias de varredura de MPDapH (A e B) e MPDapT (C e D).

Com base nessa análise, foi possível observar que as partículas apresentaram um tamanho inferior aos obtidos pela análise por difratometria de laser, sendo esse entre 1 e 7 μm . Essa diferença se dá provavelmente devido ao fato de algumas partículas ainda permanecerem aglomeradas durante a análise de difratometria de laser. Como discutido anteriormente, esses diâmetros determinados na microscopia eletrônica de varredura são ideais para a administração pulmonar.

A análise de microscopia demonstrou uma maior homogeneidade de tamanho de partícula para a MPDapH corroborando o resultado de SPAN encontrado através da análise por difratometria de laser. Outro aspecto importante a ser ressaltado é que as partículas dessa formulação estão menos aglomeradas que as da MPDapT, característica importante e desejada para administrações por via pulmonar.

Quanto à topografia, as imagens mostram que as partículas são rugosas e sem poros.

A Figura 9 corresponde a comparação das formulações em diferentes aumentos.

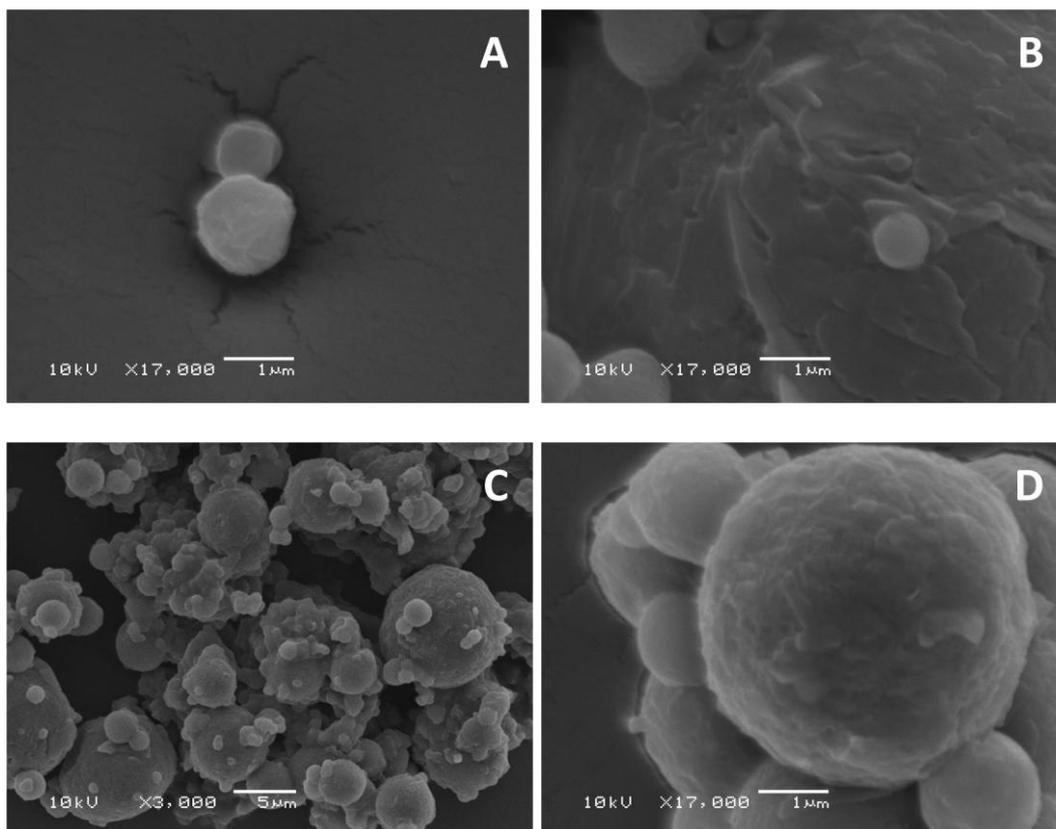


Figura 9. Fotomicrografias de varredura de MPDapH (A e B) e MPDapT (C e D)

Um aspecto importante a ser observado é que elas apresentam um tamanho da partícula primária isolada bem próximos (1 a 7 μm). Isso não foi observado na análise por difração de laser, já que para as partículas MPDapT o diâmetro foi duas vezes maior do que as MPDapH. Dessa forma pode-se constatar uma maior aglomeração desse sistema, o que não é interessante para o objetivo inicial.

Quando analisada a formulação branca, observou-se uma grande aglomeração das partículas (dados não apresentados), fato esse que pode ter gerado maiores valores de diâmetro para essa formulação, corroborando os dados de tamanho de partícula.

4.3.5. Teor

As partículas de dapsona apresentaram um carga de fármaco de aproximadamente 5 %, sendo $51,3 \pm 4,5$ mg/g para MPDapT e 55,3 mg/g para MPDapH.

A quantidade de dapsona associada as partículas foi um pouco inferior a esperada (7 %). Durante o processo de secagem das formulações observou-se que parte do material seco ficou aderido à torre de secagem do equipamento formando um filme. Também foi observado pó na saída para o filtro na parte superior do ciclone. Neste sentido, a dapsona poderia estar associada a estes materiais perdidos, havendo conseqüentemente uma diminuição na concentração de fármaco no material coletado.

4.3.6. Perfis de liberação in vitro

Objetivando avaliar o perfil de liberação do fármaco, a metodologia de dissolução *in vitro*, em tampão pH 6,8 a 37° C, utilizando dissolutor foi realizada. A escolha do pH 6,8 foi devido ao fato desse ser o pH do fluido pulmonar.

Através da análise inicial do gráfico do perfil de dissolução (Figura 10), pode-se observar que o fármaco livre dissolveu cerca de 80% nos primeiros 30 minutos de experimento. Por outro lado, o perfil de dissolução da dapsona a partir das micropartículas apresentou uma liberação mais lenta.

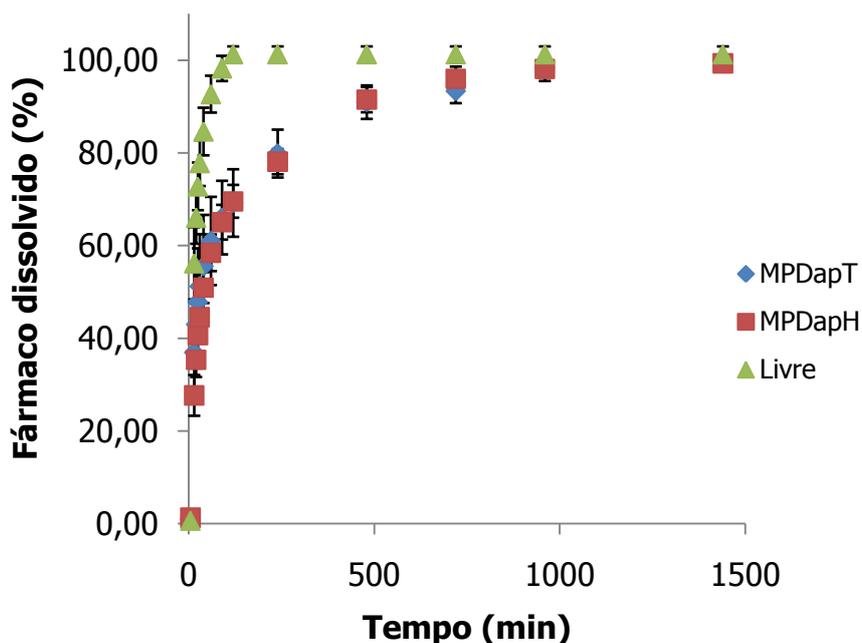


Figura 10. Perfis de liberação obtidos pela dissolução da dapsona livre e das micropartículas contendo dapsona em tampão fosfato pH 6,8 utilizando dissolutor.

Com o objetivo de verificar diferenças ou similaridades entre os perfis de liberação, foi procedida a avaliação da eficiência de dissolução (ED). Como resultados obtiveram-se os seguintes valores: $82,4 \pm 3,8$ % para o fármaco livre; $90,4 \pm 2,6$ % para MPDapT; $89,3 \pm 2,4$ % para MPDapH. A partir da análise desses valores pode-se constatar que há uma diferença significativa entre a ED das micropartículas quando comparadas com o fármaco livre. Entretanto, quando comparadas entre si, as formulações de micropartículas MPDapT e MPDapH são estatisticamente iguais (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

4.3.7. Modelagem matemática dos perfis de liberação

A partir dos perfis de liberação obtidos, foi realizado um estudo comparativo das formulações microparticuladas com base na modelagem matemática desses perfis. Para isso, foram testados os modelos monoexponencial e biexponencial. Em todos os casos a modelagem foi feita até o ponto em que a formulação atinge 100 % de liberação.

Considerando os valores para o critério de seleção do modelo e os valores de coeficiente de correlação, além do ajuste do gráfico, a equação biexponencial foi a

que melhor descreveu os dados obtidos a partir da dissolução de ambas micropartículas. Os resultados da comparação entre os modelos estão apresentado na Tabela 2 e a modelagem dos perfis pelo modelo biexponencial está apresentado na Figura 11 para MPDapT e na Figura 12 para MPDapH.

Tabela 2. Valores do critério de seleção do modelo (MSC) e coeficiente de correlação (r) para os modelos monoexponencial e biexponencial, para as formulações de micropartículas.

		MPDapT	MPDapH
Monoexponencial	MSC	0.3435	2.4797
	r	0.6840	0.9690
Biexponencial	MSC	6.0268	7.2863
	r	0.9994	0.9998

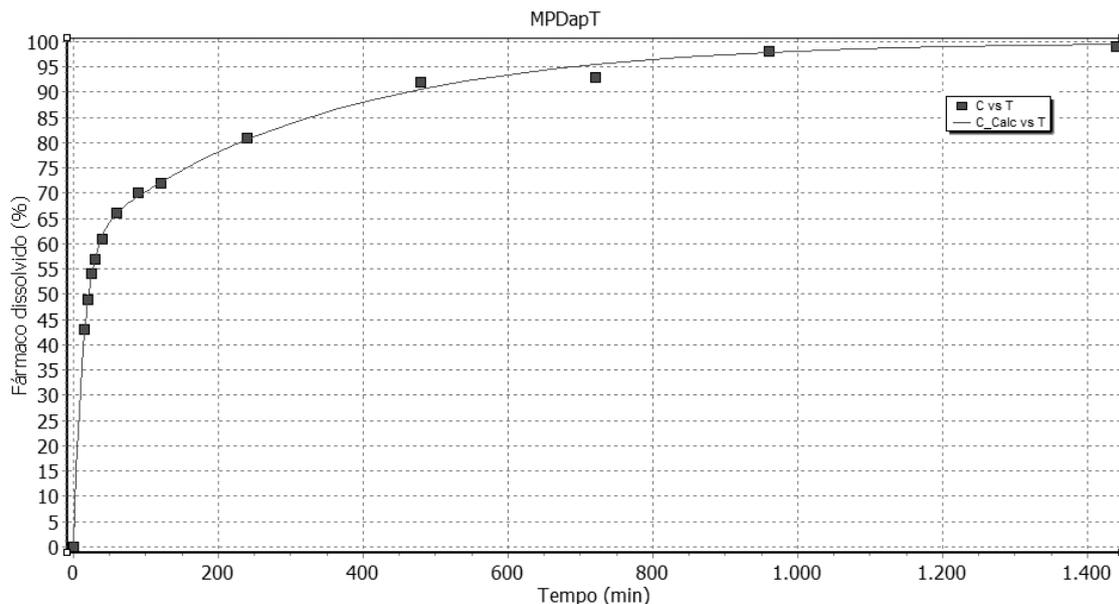


Figura 11. Modelagem matemática da formulação MPDapT segundo o modelo biexponencial.

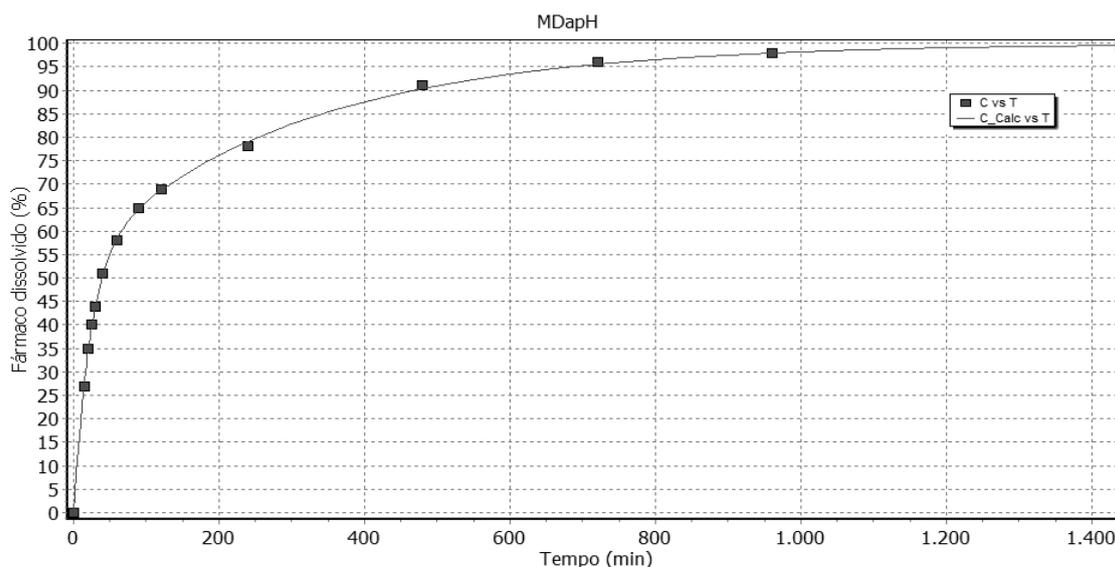


Figura 12. Modelagem matemática da formulação MPDapH segundo o modelo biexponencial.

A partir da modelagem matemática, pode-se concluir que ambas as partículas apresentaram um perfil de dissolução constituído de uma fase de liberação rápida (*burst phase*) e de uma fase de liberação controlada (fase lenta). A fase rápida pode ser associada a uma parcela de fármaco adsorvido na superfície da partícula ou reticulado na parede polimérica, o que resulta em uma liberação inicial mais rápida. A liberação sustentada provavelmente é referente a parcela de fármaco dispersa no núcleo oleoso da partícula.

A tabela 3 apresenta os parâmetros calculados: constante de liberação da fase rápida (k_1) e da fase lenta (k_2), a fração de fármaco que contribuiu para cada fase (A e B respectivamente), bem como o tempo de meia vida para cada uma das fases.

Tabela 3. Parâmetros obtidos a partir da modelagem matemática, segundo o modelo biexponencial, para as microspartículas MPDapT e MPDapH: constantes de liberação (k_1 e k_2), porcentagem de fármaco que contribuiu para a etapa (A e B) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

Etapa		MPDapT	MPDapH
Rápida	A (%)	60,0	54,5
	k_1 (min^{-1})	0.076	0.044
	$t_{1/2}$ (min)	9.18	15.75
Lenta	B (%)	40,0	45,8
	k_2 (min^{-1})	0.003	0.003
	$t_{1/2}$ (min)	229.99	213.06

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

A modelagem matemática dos perfis de dissolução também foi feita a partir da equação que descreve a Lei das Potências. Essa abordagem foi feita a fim de elucidar os mecanismos de liberação das micropartículas contendo dapsona, a partir da determinação do parâmetro n e a tabela 4 indica os valores de n calculados e os mecanismos de liberação:

Na Tabela 4 está a interpretação para os valores de n obtidos.

Tabela 4. Mecanismo de liberação de substâncias contidas em sistemas particulados.

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

Os valores dos coeficientes de correlação, MSC e do parâmetro n estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros obtidos a partir da modelagem pela Lei das Potências para as formulações MPDapT e MPDapH.

	MPDapT	MPDapH
MSC	2.73	2.75
R	0.9802	0.9807
n	0.27	0.39

Conforme pode-se observar as micropartículas apresentaram um n inferior ao estabelecido para processos caracterizados por difusão fickiana. Ritger e Peppas (1987) afirmaram, contudo, que em sistemas microparticulados polidispersos esses valores podem apresentar essa alteração. Eles descreveram que em uma mistura hipotética com 20 % de partículas de 20 μm , 60 % de 100 μm e 20 % de 500 μm pela lei das potências foi possível calcular um $n = 0,30$, que é considerado diferente do valor obtido para uma amostra monodispersa de 100 μm ($n = 0,43$). Dessa forma, pode-se concluir que as micropartículas de quitosana contendo dapsona possuem um mecanismo de liberação governado por processo de difusão.

4.3.8. Análise da toxicidade pulmonar

A análise do fluido de lavagem bronco alveolar é uma das metodologias descritas na literatura para a avaliação da toxicidade de substâncias. O resultado obtido do doseamento da lactato desidrogenase (LDH) dos grupos está apresentada na Figura 13. A formulação teste utilizada foi a MPDapH, pois apresentou um melhor fluxo quando veiculada pela micro seringa.

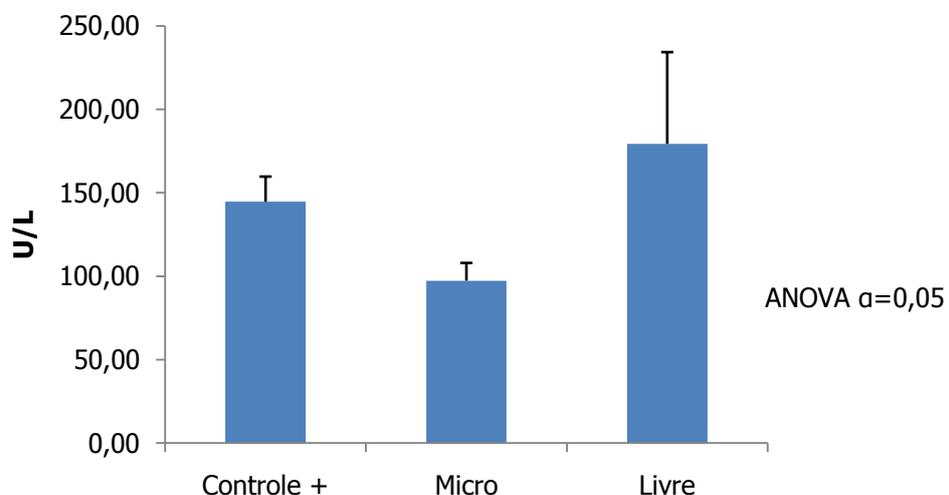


Figura 13. Doseamento da lactato desidrogenase no fluido de lavagem bronco alveolar dos animais tratados com dodecil sulfato de sódio (controle +), MPDapH (micro) e fármaco puro (livre).

O resultado obtido mostra que o fármaco livre aumentou os níveis de LDH extracelular, caracterizando um efeito elevado de toxicidade juntamente com o

controle positivo, solução de SDS (Hussain, 2005). Por outro lado, o grupo teste das micropartículas apresentou uma concentração significativamente inferior de LDH no fluido de lavagem em relação ao grupo controle positivo e o fármaco livre, demonstrando uma menor toxicidade celular e bioquímica dos pulmões (ANOVA, $\alpha = 0,05$). Além disso, a administração da dapsona livre não foi possível, devido a um fluxo deficiente através do dispositivo de aplicação pulmonar. Para a administração desta, foi utilizada uma quantidade suficiente de lactose para o melhoramento do fluxo. Em alguns estudos não foi identificada toxicidade pulmonar da lactose (Baldrick, P. et al, 1997; de Jesús Valle et. al, 2008). Tendo em vista o fluxo deficiente da dapsona livre e a elevada toxicidade, a utilização das micropartículas para administração pulmonar se torna interessante.

Outro indicativo de descontinuidade das membranas é a presença da enzima fosfatase alcalina no meio extracelular (Henderson, 2005; Hussain, 2005; Rawat, 2008). A quantificação desta enzima está apresentada na Figura 14.

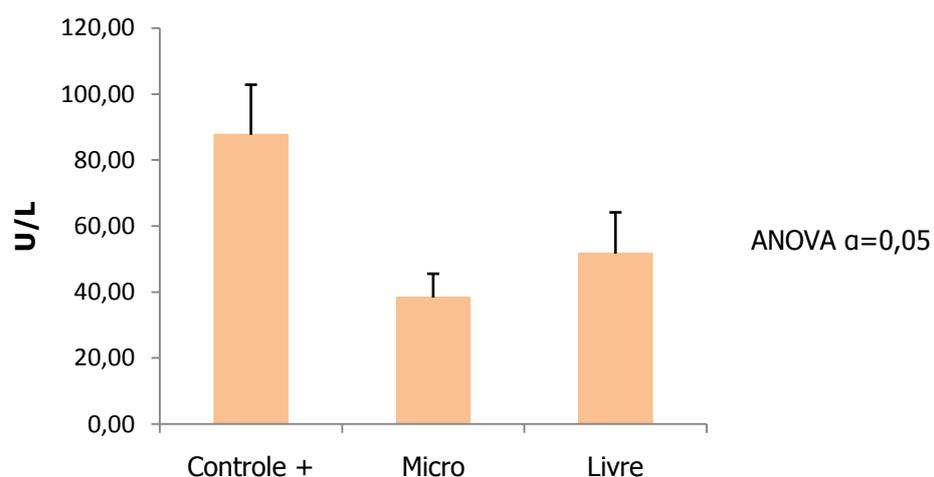


Figura 14. Doseamento da fosfatase alcalina no fluido de lavagem bronco alveolar dos animais tratados com dodecil sulfato de sódio (controle +), MPDapH (micro) e fármaco puro (livre).

O resultado obtido evidenciou uma elevação na concentração da fosfatase alcalina no fluido de lavagem nos grupos do fármaco livre e do controle positivo. Esses dados corroboram com os já obtidos acima para a LDH, evidenciando o potencial citotóxico da dapsona na integridade celular e bioquímica do tecido

pulmonar. Em contrapartida, as micropartículas apresentaram uma diferença significativa (ANOVA, $\alpha = 0,05$) na comparação com os grupos controle + e livre, mostrando uma concentração inferior da enzima fosfatase alcalina no fluido de lavagem bronco alveolar, sendo menos tóxica que o fármaco livre, portanto se apresenta como um veículo promissor para a administração pulmonar da dapsona.

5. CONCLUSÕES

As micropartículas foram obtidas com sucesso, de acordo com a formulação proposta e o método de obtenção, por spray-drying, foi adequado para objetivo proposto.

A MPDapH apresentou um tamanho de partícula reduzido em relação a MPDapT, evidenciado por difratometria de laser, e ambas mostraram estar aglomeradas, mas com tendência à desaglomeração em função do tempo.

Além dessa análise, essa técnica permitiu concluir que a MPDapH possui uma distribuição de tamanho mais homogênea, o que pode inferir que a passagem da emulsão primária em homogeneizador, pode ter diminuído o tamanho de gotícula produzindo micropartículas com tamanho reduzidos e com baixa polidispersão.

O potencial zeta para as partículas contendo o fármaco, quando em contato com meio aquoso, foi adequado para evitar a formação de grandes aglomerados dessas formulações.

A morfologia das partículas, por MEV, evidenciou que tanto MPDapH quanto MPDapT apresentaram um formato esférico, superfície rugosa e ausência de poros. Outra análise importante é referente à diferença de tamanho observada por esta técnica em relação à difratometria de laser. Por MEV as MP possuem um tamanho entre 1 e 7 μm , que é inferior àquele obtido na análise por difratometria e esse tamanho obtido se encontra na faixa ideal para a administração pulmonar.

O perfil de liberação *in vitro* demonstrou que ambas as micropartículas apresentam um perfil de liberação igual, porém diferente do ativo livre. O perfil da micropartículas é descrito pelo modelo biexponencial tendo uma fase de liberação rápida (*burst phase*) e uma fase de liberação controlada, a qual é significativamente mais lenta que a dissolução do ativo livre. Através da análise pela Lei das Potências foi possível constatar que as partículas não sofrem inchamento, tendo sua liberação controlada por difusão.

O experimento animal da análise da toxicidade pulmonar mostrou que o tratamento com o fármaco livre proporcionou elevados níveis da enzima LDH e fosfatase alcalina no fluido de lavagem bronco alveolar, indicando elevada toxicidade. Por outro lado, as micropartículas apresentaram uma menor citotoxicidade, pois índices menores de LDH e fosfatase alcalina foram encontrados,

o que torna promissor e interessante o uso da dapsona microencapsulada no sistema carreador desenvolvido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alhalaweh, A., Andersson, S., Velaga, S.P. - Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery - **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**. Vol. 38 I. 3 P. 206-214. 2009.

A.K. Andrianov, L.G. Payne – Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates – **ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS** 34 (1998) 155 –170.

Baldrick P, Bamford D.G. - A toxicological review of lactose to support clinical administration by inhalation. - **Food Chem Toxicol**. 1997 Jul; 35 (7): 719-33.

Blum R. N., Miller L. A., Gaggini L. C., Cohn D. L. – Comparative Trial of Dapsone Versus Trimethoprim/Sulfamethoxazole for Primary Prophylaxis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia – **JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES**. Vol. 5, N. 4, 1992.

Chougule M., Padhi B., Misra A. – Development of Spray Dried Liposomal Dry Powder Inhaler of Dapsone – **PHARM. SCI. TECH**. Vol.9, N.1, 2008.

Coleman M.D. Dapsone – mediated agranulocytosis: risks, possible mechanisms and prevention – **TOXICOLOGY**. 162 (2001) 53–60.

Cryan S. A., Sivadas N., Garcia-Contreras L. - In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal - **ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS**. Vol.59; I. 11; P: 1133-1151 (2007).

Cushion M. T., Stanforth D., Linke M. J., Walzer P. D. - Method of Testing the Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to Antimicrobial Agents In Vitro - **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. Vol. 28Dec. 1985, p. 796-801.

dos Reis Neto E.T., Neves Júnior M.T. - Dapsona no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico com manifestações cutâneas, relato de dois casos e uma breve revisão de literatura (2006)

de Jesús Valle et. al - Toxicological evaluation of lactose and chitosan delivered by inhalation - **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, Vol.19, No.3, pp. 387–397 (2008)

Esposito, E.; Cervellati, F., Menegatti, E., Nastruzzi, C., Cortesi, R. – Spray Dried Eudragit Microparticles as Encapsulation Devices for Vitamin C. - **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS**. Amsterdam, v. 242, n. 1-2, p. 329-334, 2002.

El-Sherbiny I. B., McGill S., Smyth H. D. C. – Swellable Microparticles as Carriers for Sustained Pulmonary Drug Delivery - **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**. VOL. 99, N. 5, 2009.

El-Sherbiny I. B., Smyth H. D. C. – Biodegradable nanomicro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: (I) Self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres – **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS** 395 (2010) 132–141.

Fishman J. A. – Treatment of Infection Due to *Pneumocystis carinii* - **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. June (1998) Vol.42, N.6, p.1309–1314.

Goran D., et al. - The response of peritoneal macrophages to dapsone covalently attached on the surface of carbon nanotubes - **CARBON** 48 (2010) 3066 – 3078.

Grenha A., Seijo B., Remuñán-López C. – Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery - **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES** 25 (2005) 427–437.

Hamishehkar H., *et.al.* – Effect of carrier morphology and surface characteristics on the development of respirable PLGA microcapsules for sustained-release pulmonary delivery of insulin – **International Journal of Pharmaceutics**. 389 (2010) 74–85

Hughes W. T. – *Pneumocystis carinii* Pneumonia – **SEMINARS IN PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES**, Vol. 12, N.4 (October), 2001; pp 309-314.

Henderson, R. F. - Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. **EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY**, v. 57, p.155–159, 2005.

HIV-related opportunistic diseases: UNAIDS Technical Update – October 1998, **WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO**

Hussain, A.; Ahsan, F. – State of insulin self-association does not affect its absorption from the pulmonary route – **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 25 (2005) 289–298

Hussain, A.; Majumder, Q.H.; Ahsan, F. - Inhaled insulin is better absorbed when administered as a dry powder compared to solution in the presence or absence of alkylglycosides. - **PHARMACEUTICAL RESEARCH**, v. 23, n°. 1, 2006.

Joseph A. Kovacs; Vee J. Gill; Steven Meshnick; et al. - New Insights Into Transmission, Diagnosis, and Drug Treatment of Pneumocystis carinii Pneumonia - **JAMA**, November 21, 2001—Vol 286, No.19.

Jyothi, N. V. N. et. Al. - Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency - **JOURNAL OF MICROENCAPSULATION** Volume: 27 Issue: 3 Pages: 187 Published: MAY 2010.

Kannan G., et al. - Drug usage evaluation of dapson (2009) – **INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES** - Vol: 71, Issue : 4, Page : 456-460

Kawagushi, H. Functional polymer microspheres. **PROGRESS IN POLYMER SCIENCES**, v. 25, p. 1171 – 1210, 2000.

Khan, K. A. The concept of dissolution efficiency. **JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY**, v. 27, p.48-49, 1975.

Kim, C. – Controlled Release dosage form design. 1 ed. Lancaster: **TECHNOMIC**, 2000. 301 p.

Kowal-Bielecka O., Kowal K., Chyczewska E. - Bronchoalveolar Lavage Fluid in Scleroderma Interstitial Lung Disease: Technical Aspects and Clinical Correlations: **REVIEW OF THE LITERATURE SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM** - Vol. 40; I. 1; P. 73-88 (2010).

Krugten, M.V.; Cobben, N.A.M.; Lamers, R.J.S.; Van Dieijen-Visser, M.P.; Wagenaar, S.J.Sc.; Wouters, E.F.M.; Drent, M. Serum LDH: a marker of disease activity and its response to therapy in idiopathic pulmonary fibrosis. **NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE**, v. 48, p.220-223, 1996.

Learoydetal T. P., *et.al.* - Sustained delivery by leucine-modified chitosan spray dried respirable powders – **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS** 372 (2009) 97–104

Lee B., Medina I., Benowitz N., et al. Dapsone, tri-methoprim and sulfamethoxazole plasma levels during treatment of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): Evidence of drug interactions. **ANN INTERN MED** 1989;110 : 606–11.

Ministério da Saúde - <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>

Oneda, F., Ré, M. I. – The Effect of formulation Variables on the Dissolution and Physical Properties of Spray-dried Microspheres Containing Organic Salts. **POWDER TECHNOLOGY**, Amsterdam, v.130, p. 377-384, 2003.

Opromolla, D. V. A. Terapêutica da hanseníase. *Medicina*, Ribeirão Preto, 30: 345-350 jul/set. 1997.

Rastogi N., Goh K.S., Labrousse V. Activity of sub inhibitory. Concentrations of dapsone alone and in combination with cell-wall inhibitors against Mycobacterium avium complex organisms. **EUR J CLIN MICROBIOL INFECT DIS** 1993;12(12):954–8.

Ravi Kumar, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

Rawat, A. et. Al. – Complexation of a Poly-L-Arginine with Low Molecular Weight Heparin Enhances Pulmonary Absorption of the Drug – **Pharmaceutical Research**, Vol.25, No.4, April 2008

Reveiz L, Buendía JA, Téllez D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. **REV PANAM SALUD PUBLICA**. 2009;26(4):341–9.

Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. fickian and non=fickian release from non-swellable device in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE**, v. 5, p. 23-36, 1987.

Sago J., Hall R.. Dapsone. **DERMATOL THER** 2002;15(4):340–51.

Shargel, L. Applied Biopharmaceutics an Pharmacokinetics. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

Sousa A.R.D., Costa C.O., Queiroz H.M.C., Gonçalves P.E.S., Gonçalves H.S. - Leprosy simulating lichenoid eruption: case report and literature review. *An. BRAS. DERMATOL*. 2010; 85(2):221-3.

Thies, C. A. – Survey of Microencapsulation Process. In. Benita, S. Microencapsulation: Methods and Industrial Application. 10 ed. **NEW YORK: MARCEL DEKKER**, 1996. Cap. 1, p. 1-19.

Thomas C., Gupta V., Ahsan F. – Particle Size Influences the Immune Response

Produced by Hepatitis B Vaccine Formulated in Inhalable Particles – **PHARM. RES.** (2010) 27:905–919.

Vehring, R. – Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. **PHARMACEUTICAL RESEARCH**, Vol. 25, n. 5, May 2008.

Wolf R., Tüzün B., Tüzün Y. - Dapsone: Unapproved Uses or Indications. **CLINICS IN DERMATOLOGY** (2000); 18:37–53

Weekly Epidemiological Record, no. 33, 14 august 2009, **WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO**

Yang, J. F.; Qiu, L. Y.; Jin, Y.; Zhang, J. X. – Thymosine-loaded enteric microspheres for oral administration: Preparation and in vitro release studies. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS**, v. 301, p. 41-47, 2005.

Zhang, Q. ; Kusaka, Y. ; He, L. Zhang, Z. ; Sato, K. - Dynamic changes of constituents in bronchoalveolar lavage fluid in experimental silicotic rats. **INDUSTRIAL HEALTH**, v.34, p.379-388, 1996.

Zhu Y.I., Stiller M.J. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. **J. AM. ACAD. DERMATOL** 2001;45(3):420–34.)

7. ANEXO

7.1. Validação do método analítico para as micropartículas de dapsona

A validação do método analítico da dapsona foi realizada em espectrofotômetro UV. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, limites de detecção e quantificação e especificidade frente a uma formulação de micropartículas excluindo apenas o fármaco, sendo os ensaios realizados em Espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV – 160A), em comprimento de onda de 260 nm usando como solvente acetonitrila.

Para a avaliação da linearidade três curvas de calibração foram construídas, a partir de três soluções-mãe diferentes, com uma faixa de concentração utilizada de 1,0 a 10,0 µg/mL. Na Figura 15 a representação das três curvas de calibração. Os limites de detecção (Equação 7) e quantificação (Equação 8) foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma da International Conference on Harmonization (1996).

Equação 7

$$LD = \frac{3,33 \cdot DP}{B}$$

Equação 8

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{B}$$

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

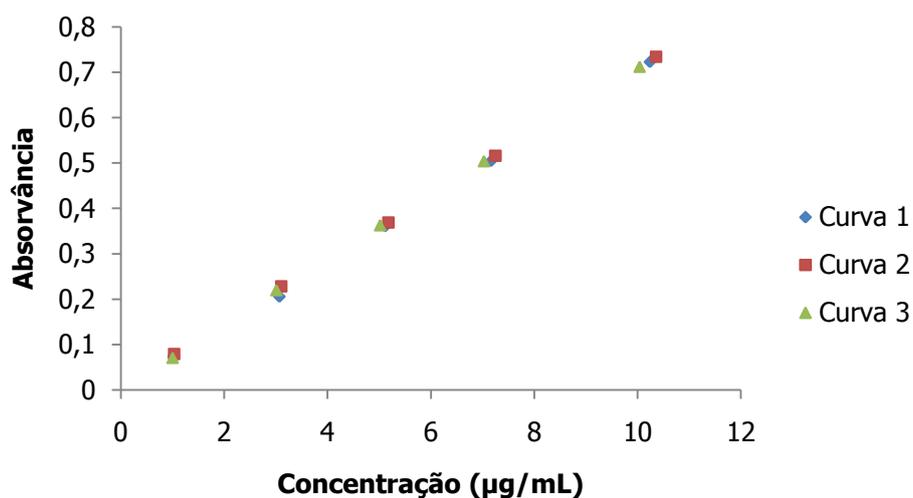


Figura 15. Representação gráfica das curvas de calibração.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações 7 e 8 com base nos resultados do experimento de linearidade. Dessa forma, os valores encontrados foram de 0,15 µg/mL para o limite de detecção e 0,45 µg/mL para o limite de quantificação.

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

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade apresentou DPR de 3,05 para a sextuplicata. A precisão intermediária foi avaliada em três dias consecutivos, com três amostras em cada dia, de mesma concentração. Os valores de DPR foram 3,05, 1,93 e 0,94 para cada dia. Para ambos os estudos os valores de desvios padrões relativos foram inferiores a 5, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão.

Para avaliação da especificidade, uma formulação branca foi preparada com todos os componentes das micropartículas, porém sem a presença do fármaco (figura 17). O mesmo volume, tratamento e diluição das micropartículas utilizadas

no teste de precisão foi utilizado para o teste de especificidade, porém utilizando-se a micropartícula sem fármaco. Foi efetuada uma varredura com essa formulação, não sendo observado nenhum pico de absorção para a região de 260 nm (dados não apresentados). Dessa forma o método foi considerado específico.

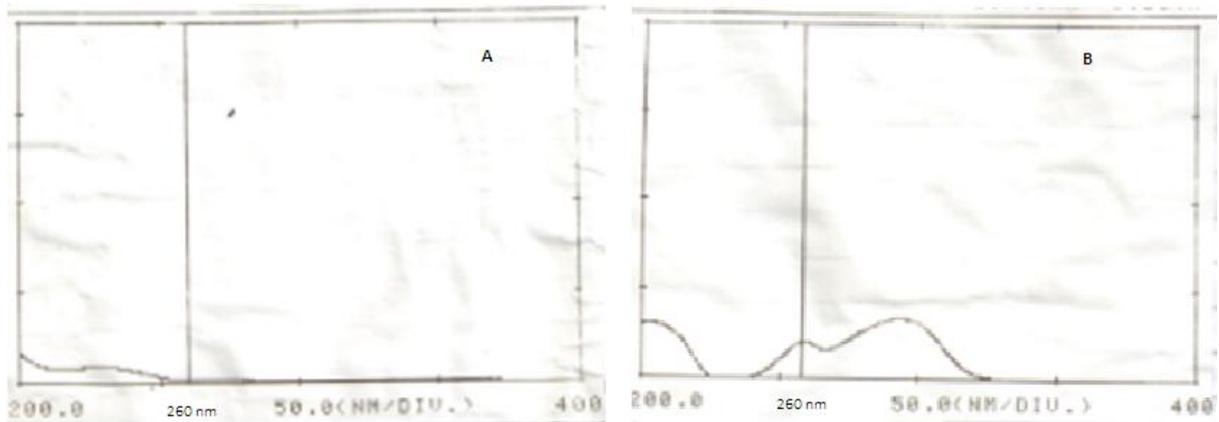


Figura 17. Gráficos de análise de especificidade: A) MPBranca e B) MPDap

