

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

**Desenvolvimento e controle de qualidade de forma farmacêutica pó para
inalação contendo levodopa.**

RÚBIA LAZZARETTI PEREIRA

PORTO ALEGRE, 2010

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

**Desenvolvimento e controle de qualidade de forma farmacêutica pó para
inalação contendo levodopa.**

Dissertação apresentada por **Rúbia Lazzaretti Pereira**
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Coorientadora: Profa. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2010

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 01/10/2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Cássia Virgínia Garcia
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

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

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

P436d Pereira, Rúbia Lazzaretti
Desenvolvimento e controle de qualidade de forma farmacêutica pó para inalação contendo levodopa / Rúbia Lazzaretti Pereira – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xiv, 115 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Levodopa. 2. Micropartículas. 3. Secagem por aspersão. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Validação : Métodos de análise de fármacos. 6. Controle de qualidade de medicamentos. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. III. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480
Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 402 e 405 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos CNPQ.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Elfrides Schapoval, pela orientação, oportunidade e confiança. Também por sua imensa dedicação, pela paciência e pelo exemplo profissional e pessoal.

À Profa. Sílvia Guterres pela coorientação, paciência e oportunidades concedidas desde o início.

Aos Professores: Adriana Pohlmann, Martin Steppe, Nadia Volpato e Tércio Oppe pela atenção dispensada durante este trabalho.

Aos meus colegas do LEPCQ por terem me recebido de maneira acolhedora. Em especial aos queridos amigos: Alini, Cássia, Clésio, Diogo, Letícia, Marcelo e Vitor pelas discussões científicas, ajuda, amizade e convívio durante a realização deste trabalho.

À amiga Aline Barth pela amizade sincera, apoio e por todos auxílios prestados.

Ao Prof. Leandro Tasso pela valiosa colaboração nos experimentos *in vivo*.

À Profa. Valéria Weiss Angeli pela ajuda, confiança e incentivo durante a minha formação acadêmica.

Aos colegas e amigos do laboratório 405 da Faculdade de Farmácia e do laboratório K204 do Instituto de Química pelos bons momentos e auxílios prestados. Em especial a Letícia Colomé pela infinita disponibilidade e paciência.

À Renata Raffin pela atenção e colaboração neste trabalho.

Aos meus colegas do PPGCF Caroline Kran, Evelise Assumpção, Karina Paese, Kelly Bueno, Lisiane Bajerski, Renata Contri e Taís Dallcin pela amizade e colaborações.

Aos meus pais, Ivelí e Pedro, pela formação que me propiciaram, pelo apoio, incentivo e por todas as oportunidades que me concederam.

À minha irmã Rovane pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao Felipe Toigo pela compreensão, incentivo, amor e companheirismo.

Ao CNPq, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

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

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente dissertação foi redigida na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução, contendo a apresentação do tema e a formulação das hipóteses de trabalho;
- Objetivos: geral e específicos;
- Revisão da literatura;
- Capítulos I e II: artigos em redação que se referem as diferentes etapas do trabalho realizado a serem submetidos a periódicos científicos;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências bibliográficas;
- Anexo: Parecer do Comitê de Ética.

RESUMO

O presente trabalho visa desenvolver micropartículas na forma farmacêutica pó inalatório contendo levodopa, um fármaco empregado no tratamento da doença de Parkinson. As micropartículas foram preparadas pela técnica de secagem por aspersão utilizando os polímeros ácido hialurônico, quitosana e hidroxipropilmetilcelulose. Desenvolveu-se método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o controle de qualidade da formulação, bem como, estudos preliminares de estabilidade e determinação da cinética de fotodegradação. Utilizou-se coluna analítica ACE[®] RP-18 com tampão fosfato monobásico 0,01 M, ajustado a pH 3,0 como fase móvel, com vazão de 1,0 mL/min e detecção em 280 nm. A linearidade foi obtida na faixa de concentração de 10-60 µg/mL ($r^2=0,9999$) ($\alpha=5\%$). Os limites de quantificação e detecção foram 208 ng/mL e 46,8 ng/mL, respectivamente. Os excipientes e produtos de degradação não apresentaram interferência na eluição da levodopa. Resultados adequados foram encontrados para repetibilidade, precisão intermediária (<2% DPR), exatidão e robustez. Os resultados de recuperação estiveram na faixa de 100,01% a 100,93%. A cinética de fotodegradação em solução frente à luz UVC indicou reação de segunda ordem. A caracterização da formulação demonstrou resultados satisfatórios em relação ao teor, diâmetro aerodinâmico, densidade, teor de umidade e morfologia. A formulação apresentou tamanho de partícula inferior a 16,2 µm e formato arredondado com estrutura oca. A densidade de compactação mostrou valores entre 0,06-0,08 g/cm³ e diâmetro aerodinâmico abaixo de 5 µm, sugerindo que os pós são apropriados para a deposição nas regiões mais profundas do pulmão. Além disso, realizou-se estudo de citotoxicidade pulmonar *in vivo*, o qual demonstrou que a administração intratraqueal das micropartículas não induziu aumentos significativos dos indicadores de toxicidade pulmonar, em comparação ao grupo controle-positivo. Portanto, a avaliação da toxicidade aguda sugere que a liberação pulmonar de levodopa pode ser uma nova e promissora via de administração para este fármaco.

Palavras-chave: levodopa, pulmonar, micropartículas, secagem por aspersão, validação de método analítico.

ABSTRACT

Development and Quality Control of levodopa microparticles for pulmonary delivery.

The aim of this study was to develop microparticles containing levodopa for pulmonary delivery, a drug used in the treatment of Parkinson's disease. The microparticles were prepared by spray-drying using the polymers hyaluronic acid, chitosan and hydroxypropyl methylcellulose. A stability-indicating method was developed and validated for quality control by high performance liquid chromatography (HPLC), as well as, stability studies and photodegradation kinetics. The analytical column ACE[®] RP-18 was operated with 0.01 M monobasic potassium phosphate, adjusted to a pH value 3.0 as mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL/min with detection wavelength at 280 nm. Linearity was obtained over the concentration range of 10-60 µg/mL ($r^2=0.9999$) ($\alpha=5\%$). The quantification limit and detection limit were 208 ng/mL and 46.8 ng/mL, respectively. Excipient ingredients and resulting degradation products had no interference in the levodopa elution. Adequate results were found for repeatability, inter-day precision (<2% RSD), accuracy and robustness. The recovery results were in the range of 100.01% to 100.93%. The photodegradation kinetics in solution front to UVC light indicated the second-order reaction. The formulation showed satisfactory results for drug content, aerodynamic diameter, density, water content and morphology. The formulation presented particle size below 16.2 µm and spherical shape presenting a hollow structure. The tapped density ranged from 0.06-0.08 g/cm³ and an aerodynamic diameter smaller than 5 µm, suggesting that the powders are appropriated for deep lung deposition. Besides that, a cytotoxicity study *in vivo* was performed which showed that microparticles intratracheal administration did not induce significant increases of lung toxicity indicators compared with the positive control. Therefore, the acute lung toxicity evaluation suggests that pulmonary levodopa delivery could be a new and promising administration route for this drug.

Keywords: levodopa, pulmonary, microparticles, spray-drying, analytical method validation.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 Doença de Parkinson	25
3.2 Tratamento farmacológico	25
3.3 Levodopa	26
3.4 Descrição	28
3.5 Via Pulmonar	29
3.6 Secagem por aspersão	32
3.7 Microencapsulação	33
3.8 Polímeros	34
3.9 Estudo de toxicidade pulmonar	35
4. CAPÍTULO I – Micropartículas contendo levodopa na forma farmacêutica pó inalatório: preparação e caracterização.	37
4.1 Introdução	39
Publicação 1: Novel levodopa microparticles for pulmonary delivery and <i>in vivo</i> respiratory tract toxicity study.	41
5. CAPÍTULO II – Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e estudo preliminar de estabilidade das micropartículas de levodopa.	69
5.1 Introdução	71
Publicação 2: Levodopa microparticles for pulmonary delivery: photodegradation kinetics and LC stability-indicating method.	75
6. DISCUSSÃO GERAL	103
7. CONCLUSÕES GERAIS	109

8. REFERÊNCIAS -----	113
9. ANEXO: Parecer do Comitê de Ética -----	129

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e por inclusões neuronais conhecidas por corpúsculos de Lewy. Devido ao aumento da expectativa de vida média da população mundial, a doença de Parkinson e demais doenças neurodegenerativas têm se tornado um problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2002).

A levodopa é o fármaco que proporciona o alívio mais eficaz dos sintomas motores da doença, sendo considerada o fármaco de escolha para o tratamento (LANG e OBESO, 2004; SEEBERGER e HAUSER, 2007). Devido ao seu sucesso terapêutico em pesquisas clínicas e experimentais, a levodopa vem sendo estudada a fim de desenvolver uma formulação que permita níveis sanguíneos estáveis e sustentáveis durante o dia, podendo, assim, promover benefícios aos pacientes portadores da doença e diminuir o desenvolvimento de flutuações motoras e possivelmente discinesias (SEEBERGER e HAUSER, 2007).

A ampla área de superfície epitelial, a alta vascularização, o fino epitélio alveolar e a imensa capacidade de troca de soluto são fatores que consideram a via pulmonar uma via alternativa para a administração de fármacos que visam o tratamento de enfermidades sistêmicas (SCHEUCH *et al.*, 2006). Assim sendo, a via de administração pulmonar tem apresentado um crescente interesse, como uma alternativa não-invasiva para liberação de fármacos para tratamento local e sistêmico (LIU *et al.*, 2008).

A microencapsulação tem sido foco de inúmeras pesquisas na área farmacêutica nas últimas décadas, envolvendo diferentes objetivos, entre eles a obtenção de produtos de liberação modificada de fármacos, melhora na estabilidade de fármacos ou aumento da biodisponibilidade (ESPOSITO *et al.*, 2002).

As micropartículas (1-1000 μm) são geralmente formadas a partir de materiais poliméricos, podendo ser preparadas através de inúmeros métodos descritos na literatura, entre os quais encontra-se a secagem por aspersão (ou *spray-drying*), amplamente estudada e cujas vantagens estão baseadas nos seguintes aspectos: rapidez e preparação em etapa única, possibilidade de aplicação a fármacos termossensíveis e a maior facilidade de transposição de escala em relação a outros métodos de microencapsulação (CONTE *et al.*, 1994; ESPOSITO *et al.*, 2002).

Segundo Seeberger e Hauser (2007), na busca de otimizar a variável biodisponibilidade e a insatisfatória farmacocinética da levodopa, algumas formulações alternativas foram desenvolvidas e estudadas, como: formulação intravenosa, sendo impraticável para uso prolongado; pró-fármacos de levodopa; liberação controlada via oral; via intraduodenal e desintegração oral, contudo nenhuma mostrou-se mais vantajosa. Na literatura consta apenas um trabalho sobre levodopa via pulmonar, o qual apresentou propriedades farmacocinéticas superiores à terapia oral. Entretanto, o estudo não descreve a formulação apenas o estudo farmacocinético (BARTUS *et al.*, 2004; NYHOLM, 2006).

Assim sendo, devido à biodisponibilidade variável e às indesejáveis propriedades farmacocinéticas da levodopa em formulações por via oral, o presente trabalho visa desenvolver uma formulação inovadora de levodopa na forma farmacêutica pó inalatório, pela técnica de secagem por aspersão utilizando os polímeros: ácido hialurônico, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e quitosana. Oportunizando, desta forma, a obtenção de uma possível formulação de liberação controlada para a manutenção dos níveis plasmáticos, proporcionando melhora na biodisponibilidade, diminuição de doses diárias e efeitos colaterais, como flutuações motoras. A fim de avaliar as características qualitativas e quantitativas desta nova formulação, desenvolveu-se metodologia para o controle de qualidade bem como avaliou-se a toxicidade pulmonar da mesma por meio do estudo de citotoxicidade pulmonar em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar micropartículas contendo levodopa na forma farmacêutica pó para inalação.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar micropartículas de levodopa pelo método de secagem por aspersão (spray-drying), usando os polímeros: ácido hialurônico, hidroxipropilmetilcelulose e quitosana;
- Caracterizar a formulação quanto ao tamanho de partícula, densidade de compactação, diâmetro aerodinâmico, teor de umidade e morfologia;
- Desenvolver e validar método por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise qualitativa e quantitativa da forma farmacêutica pó para inalação;
- Realizar estudos preliminares de estabilidade, identificando os principais fatores extrínsecos que promovem degradação do fármaco em estudo;
- Estudar *in vivo* a toxicidade pulmonar da formulação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), primeiramente descrita pelo médico inglês James Parkinson, em 1817, deve-se a processo neurodegenerativo do sistema extrapiramidal que resulta em distúrbios de controle de movimento, sendo incapacitante e prevalente. A doença sintomática é caracterizada pela perda de 70 a 80% dos neurônios dopaminérgicos. Os sintomas clássicos são bradicinesia (lentidão dos movimentos voluntários), tremor de repouso, rigidez e perda de reflexos posturais (HAUSSEN e SCHÖNWALD, 2000; STANDAERT e YOUNG, 2003). Afetando uma a cada 100 pessoas acima dos 65 anos, a doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer (SINGH *et al.*, 2007).

Devido ao aumento da sobrevida da população, a doença de Parkinson como todas as doenças neurodegenerativas, está se tornando cada vez mais freqüente em pessoas idosas de países desenvolvidos. Com o passar dos anos ocorre um declínio progressivo da função das células, coincidindo com o declínio progressivo da função mitocondrial. Este fato tem sido reconhecido como fator causal de muitas doenças neurodegenerativas (SCHAPIRA, 1992; WALLACE, 1992; TURNER e SCHAPIRA, 2001).

Embora a causa exata da doença seja desconhecida, diversas hipóteses foram implicadas na sua patogênese tais como: predisposição genética, ação de neurotoxinas ambientais, toxinas endógenas, infecções virais, envelhecimento cerebral, aumento da deposição de ferro na substância nigra, à excitotoxicidade por disfunção mitocondrial crônica e estresse oxidativo devido a dois fatores, o aumento da atividade da enzima monoaminoxidase (MAO) e a inibição da cadeia respiratória (GU e OWEN, 1998; TURNER e SCHAPIRA, 2001; MEDIFOCUS, 2008).

3.2. Tratamento farmacológico

Foi somente na década de 60, após a identificação das alterações patológicas e bioquímicas no cérebro de pacientes com doença de Parkinson, que surgiu o primeiro tratamento com sucesso. A introdução da levodopa representou o maior avanço terapêutico, produzindo benefícios clínicos para praticamente todos os pacientes e

reduzindo a mortalidade por esta doença. No entanto, logo após a introdução da mesma, tornou-se evidente que o tratamento por longo prazo era complicado pelo desenvolvimento de efeitos adversos que incluem flutuações motoras, discinesia (movimentos involuntários) e complicações neuropsiquiátricas (BRASIL, 2002; NYHOLM, 2006; SEEBERGER e HAUSER, 2007; MEDIFOCUS, 2008).

A farmacoterapia para a doença de Parkinson está focada em fármacos dopaminérgicos, principalmente precursores da dopamina, como a levodopa, e agonistas da dopamina (NYHOLM, 2006). A levodopa é considerada o fármaco padrão ouro para o tratamento da doença, pois proporciona uma diminuição mais eficaz dos sintomas motores, especialmente rigidez e bradicinesia (SEEBERGER e HAUSER, 2007).

Existem atualmente vários modos de intervenção farmacológica sintomática:

- Levodopa padrão ou com formulações de liberação controlada, associados com inibidor da dopadescarboxilase (carbidopa ou benserazida);
- Agonistas dopaminérgicos;
- Inibidores da monoaminoxidase B (MAO-B): selegilina;
- Inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT): tolcapona e entacapona;
- Anticolinérgicos;
- Antiglutamatérgicos: amantadina (BRASIL, 2002; NYHOLM, 2006; SEEBERGER e HAUSER, 2007).

Uma vez que os sintomas produzem graus de incapacidade e o tratamento dopaminérgico seja necessário, tanto levodopa ou agonistas dopaminérgicos podem ser utilizados. Entretanto, levodopa mostrou ser mais eficaz, em estudos controlados randomizados, no controle dos sintomas motores que os agonistas dopaminérgicos (BRASIL, 2002).

3.3. Levodopa

A síndrome de Parkinson caracteriza-se pelo déficit de dopamina nas vias nigro-estriatais do cérebro. A levodopa, através da enzima L-aminoácido-descarboxilase, é convertida em dopamina, principal neurotransmissor depletado na DP. Acredita-se que a levodopa reponha parte dos estoques deficientes de dopamina no estriato

produzindo, portanto, melhora dos sintomas (BRASIL, 2002; HAUSSEN e SCHÖNWALD, 2002).

A levodopa, após administração oral, é absorvida pelo tubo gastrointestinal alcançando nível sérico máximo em 15 a 45 minutos. Na circulação, além da conversão pela dopa-descarboxilase para dopamina, uma fração do fármaco é convertida de maneira irreversível para 3-O-metildopa, através da enzima catecol-O-metiltransferase (BRASIL, 2002). Estima-se que a biodisponibilidade oral da levodopa seja de 5% e aproximadamente 1-3% da levodopa administrada chega inalterada no cérebro, sendo que grande parte administrada é descarboxilada pela MAO presente na mucosa intestinal e em outros locais periféricos. O tempo de meia-vida da levodopa é de 1 a 2 horas (GOODMAN e GILMAN, 1980; BRASIL, 2002; HAUSSEN e SCHÖNWALD, 2002; RODRIGUES e CAMPOS, 2006).

A levodopa de liberação modificada é absorvida no trato gastrointestinal de maneira controlada, alterando o pico de concentração máximo do fármaco para 45 a 90 minutos. Contudo, devido à baixa biodisponibilidade apresentada, requer aumento da dose em relação à levodopa. As doses diárias iniciais de levodopa são usualmente de 200/50 mg/dia (levodopa/benserazida) ou 250/25 mg/dia (levodopa/carbidopa) divididas no mínimo em duas administrações. As doses são ajustadas de acordo com a resposta clínica. Em geral, a dose média eficaz da forma farmacêutica de liberação modificada é de 600-750 mg/dia de levodopa (BRASIL, 2002).

A biodisponibilidade de fármacos usados para o tratamento crônico da doença de Parkinson possui importantes implicações na sua utilidade clínica. Fármacos com biodisponibilidade baixa podem causar uma ampla variação na resposta clínica entre pacientes e no próprio paciente. Além disso, inúmeros fatores, incluindo sexo, idade e motilidade gástrica, podem afetar a biodisponibilidade do fármaco (SEEBERGER e HAUSER, 2007). A velocidade de absorção depende, além do esvaziamento gástrico, do período de exposição às enzimas de mucosa gástrica e da flora intestinal. A administração junto às refeições, especialmente volumosas, retarda a absorção e reduz o pico de concentração plasmática em até 30%. Proteínas, presentes nos alimentos, possuem aminoácidos neutros que competem pelos mecanismos de transporte da levodopa no jejuno e na barreira hematoencefálica (HAUSSEN e SCHÖNWALD, 2002).

Além disso, a absorção de levodopa ocorre no intestino delgado proximal, dependendo do esvaziamento gástrico, o qual é errático e pode estar diminuído em pacientes que apresentam a doença (NYHOLM, 2006).

Para as medicações utilizadas no tratamento, otimizar a biodisponibilidade do fármaco pode diminuir a variabilidade da resposta clínica e minimizar os efeitos adversos de longo uso como flutuações motoras (SEEBERGER e HAUSER, 2007).

Algumas estratégias a fim de melhorar a biodisponibilidade da levodopa foram desenvolvidas, tais como: liberação controlada via oral, pró-fármacos de levodopa, co-administração de levodopa com carbidopa, uso de um inibidor de carboxilase ou de catecol-O-metiltransferase, bem como outras vias de administração como: intravenosa e via intraduodenal, contudo nenhuma mostrou-se mais vantajosa. (NYHOLM, 2006; SEEBERGER e HAUSER, 2007).

3.4. Descrição

A levodopa (Figura 1) apresenta as seguintes características:

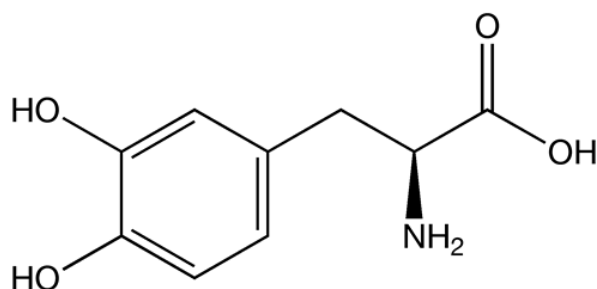


Figura 1: Estrutura química da levodopa (THE MERCK Index, 2000).

- Nomes químicos: (-)-3-(3,4-diidroxifenil)-L-alanina; β -(3,4-diidroxifenil)-L-alanina; (-)-2-amino-3-(3,4-diidroxifenil) ácido propanóico
- Classe terapêutica: antiparkinsoniano
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 59-92-7

- Nome no Chemical Abstracts (CAS): 3-hidroxi-L-tirosina
- Formula Molecular: $C_9H_{11}NO_4$
- Peso Molecular: 197,19;
- Composição: C 54,82%, H 5,62%, N 7,10%, O 32,45%;
- Solubilidade: facilmente solúvel em ácido clorídrico e ácido fórmico. Solubilidade em água: 66 mg/40 mL. Praticamente insolúvel em etanol, benzeno, clorofórmio e acetato de etila;
- Faixa de fusão: 276-278 °C e 284-286 °C.

3.5. Via Pulmonar

A administração de fármacos via pulmonar possui inúmeras vantagens comparada a outras vias, como a oral ou parenteral. Apesar de ser empregada tradicionalmente para o tratamento de doenças locais, nos últimos dez anos houve um crescente interesse pela liberação sistêmica de fármacos (EDWARDS *et al.*, 2003; LABIRIS e DOLOVICH, 2003). Os pulmões possuem alta permeabilidade e vascularização (~500 milhões de alvéolos), pequena espessura da barreira epitelial (~0,2 μm), ampla área de absorção (~75 m^2) e atividade proteolítica limitada (PATTON e PLATZ, 1992; CLARK, 2002; COURRIER, 2002; MUCHMORE e GATES, 2006; SCHEUCH *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008). Além disso, é também considerada uma via de administração de fármacos não-invasiva (LABIRIS e DOLOVICH, 2003). A via pulmonar tem demonstrado seu potencial na absorção tanto de moléculas pequenas, quanto de macromoléculas (VON WICHERT e SEIFART, 2005). Em geral, moléculas pequenas com caráter hidrofóbico apresentam maior biodisponibilidade pela via pulmonar que pela via oral (PATTON *et al.*, 2004). Moléculas hidrofílicas neutras ou carregadas negativamente são também absorvidas com alta biodisponibilidade (BROWN e SHANKER, 1983; PATTON *et al.*, 2004). No caso de macromoléculas como peptídeos e proteínas, a liberação pulmonar tem apresentado ótimos resultados (PATTON e BYRON, 2007). Um exemplo de sucesso é a insulina inalatória para tratar o diabetes mellitus, que já está sendo comercializada em alguns países (PATTON, 2006).

Dentre outras vantagens da via pulmonar, pode-se destacar também a farmacocinética reprodutível, pois a liberação pulmonar não sofre influência de dietas

alimentares, transtornos gastrintestinais e variações entre pacientes (LABIRIS e DOLOVICH, 2003).

Fármacos podem ser liberados localmente para o tratamento de patologias respiratórias, como asma ou fibrose cística. Neste caso, a liberação localizada pode diminuir a dose de fármaco, bem como diminuição de efeitos adversos resultantes de altas doses via sistêmica e proporcionar um início de ação rápido (SAKAGAMI *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2007). Alternativamente, a liberação sistêmica do fármaco pode ser alcançada através da região alveolar, onde o fármaco é absorvido pelas finas camadas de células epiteliais e chega à circulação sistêmica; alcançando, assim, um efeito rápido e evitando metabolismo de primeira passagem. Além disso, esta via pode ser considerada uma alternativa para as medicações que não podem ser utilizadas por via oral, devido à degradação enzimática ou à baixa permeabilidade intestinal (SUNG *et al.*, 2007).

Basicamente o trato respiratório está dividido em duas partes: via superior, compreendendo a cavidade nasal, a laringe e a faringe, e via inferior, constituída pela traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos (PATTON e BYRON, 2007; SEVILLE *et al.*, 2007).

As partículas se depositam no pulmão, principalmente, por três mecanismos: impactação por inércia (ou colisão inercial), sedimentação gravitacional e difusão browniana. Partículas com diâmetro aerodinâmico superior a 5 μm são depositadas por impactação por inércia na boca e na via aérea superior, partículas menores, entre 1 e 5 μm , depositam-se nos pulmões por sedimentação, enquanto partículas muito pequenas, menores que 1 μm , são conduzidas por difusão, sendo que a maioria permanece em suspensão e são depois exaladas (AULTON, 2005; SUNG *et al.*, 2007).

A colisão inercial ocorre nas regiões superiores do trato respiratório, onde a velocidade do ar é alta e o fluxo é turbulento. Quando partículas estão sendo conduzidas aos pulmões por uma corrente de ar e encontram uma outra corrente de ar em sentido oposto, colidirão com as paredes das vias respiratórias sem seguir a direção das correntes de ar. Por sua vez, a sedimentação gravitacional é resultado da força gravitacional sobre as partículas, sendo um importante mecanismo de deposição nas regiões alveolares. Finalmente, a difusão browniana corresponde ao movimento

aleatório de partículas, resultando em deposição das partículas nas vias respiratórias inferiores (LABIRIS e DOLOVICH, 2003; SEVILLE *et al.*, 2007).

Assim sendo, o tamanho de partícula e a densidade, e conseqüentemente, o diâmetro aerodinâmico, são os parâmetros fundamentais na definição do local de deposição e na biodisponibilidade do fármaco que chega ao trato respiratório (TAYLOR e KELLAWAY, 2001; SHAM *et al.*, 2004; RABBANI e SEVILLE, 2005; PILCER *et al.*, 2008). Quanto menor for a densidade das partículas, maior será a dispersibilidade do pó e a eficiência de liberação (VEHRING, 2007). A fração de pó respirável, usualmente a fração de partículas com diâmetro aerodinâmico entre 1 e 5 μm , deve ser a mais alta possível a fim de garantir uma deposição pulmonar máxima no trato respiratório profundo (BOSQUILLON *et al.*, 2001; MUCHMORE e GATES, 2006).

O diâmetro aerodinâmico corresponde ao diâmetro físico de uma esfera de densidade unitária, que sedimenta no ar com uma velocidade igual à partícula sob análise (AULTON, 2005; CHOW *et al.*, 2007). Forma, carga e higroscopicidade da partícula são outros fatores ligados à formulação capazes de influenciar a deposição (CHOW *et al.*, 2007).

Independentemente do método usado para a produção de aerossol, antes de alcançar o trato respiratório inferior, as partículas inaladas devem superar alguns obstáculos e mecanismos de defesa pulmonar, principalmente a estrutura do trato respiratório e a camada de muco, a qual protege o epitélio na região traqueobronquial. As partículas devem ser pequenas o suficiente para passarem pela boca, garganta, serem conduzidas pelas vias aéreas e alcançarem o trato respiratório inferior, mas também não podem ser pequenas demais pois serão exaladas. Contudo, algumas partículas serão removidas do pulmão pela depuração mucociliar (RIOS *et al.*, 1994; GEHR *et al.*, 1996; CLARK, 2002; COURRIER, 2002).

No trato respiratório inferior, há outros dois mecanismos de defesa: os macrófagos alveolares e a atividade enzimática. Os alvéolos estão protegidos por macrófagos alveolares, células do sistema imunológico as quais procuram por partículas estranhas ao longo da superfície pulmonar (SUNG *et al.*, 2007). Entretanto, não há um consenso em relação ao tamanho ideal que a fagocitose possa ser evitada. Alguns autores descrevem que a atividade de fagocitose é máxima em partículas entre 1 – 2 μm

(AKHTAR e LEWIS, 1997; AHSAN *et al.*, 2002; MAKINO *et al.*, 2003; GRENHA *et al.*, 2005), em geral, sabe-se que quanto menor o tamanho da partícula maior a chance de serem capturadas pelo sistema imunológico (RUDT e MULLER, 1992; AHSAN *et al.*, 2002; GRENHA *et al.*, 2005).

Em relação ao segundo mecanismo de defesa, os pulmões apresentam uma atividade enzimática inferior quando comparada a outras superfícies mucosas, como por exemplo a gástrica (EVORA *et al.*, 1998). Entretanto, algumas enzimas foram identificadas, como inibidores de proteases, isoenzimas da família do citocromo P-450 e lisoenzimas (PATTON e PLATZ, 1992; DUSZYK, 2001).

3.6. Secagem por aspersão

A técnica de secagem por aspersão, ou spray-drying, consiste na passagem de uma solução ou suspensão contendo a substância ativa, por um orifício atomizador, para a câmara de secagem, onde um fluxo de ar quente promove a rápida secagem das gotículas. As partículas sólidas secas são, então, separadas e recolhidas e podem apresentar-se na forma de pós finos, granulados ou aglomerados (PALMIERI *et al.*, 1994, 2001).

O processo de secagem por aspersão consiste em quatro etapas fundamentais: 1) aspersão da amostra; 2) contato líquido-vapor aquecido; 3) evaporação; 4) separação sólido-gás/vapor. Alterações nas condições operacionais de secagem, dentre elas a natureza do material a ser aspergido, velocidade de alimentação e a temperatura de secagem (CONTE *et al.*, 1994; HE *et al.*, 1999; BILLON *et al.*, 2000) ou até mesmo o modelo do equipamento, influenciam as características do produto obtido. Desse modo, o tamanho de partícula e distribuição granulométrica, porosidade, fluxo, umidade, estabilidade e aparência podem ser modificados e/ou controlados alterando-se os parâmetros do processo (BILLON *et al.*, 1999; RABBANI e SEVILLE, 2005).

A secagem por aspersão apresenta a vantagem de ser uma técnica rápida, onde a água é removida em uma única etapa. Pode ser aplicada a fármacos e polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos e materiais sensíveis ao calor, além de permitir um controle do tamanho de partícula (PALMIERI *et al.*, 1994; ESPOSITO *et al.*, 2002). Além disso, a

secagem por aspersão tem sido amplamente utilizada para obtenção de pós para inalação (BOSQUILLON *et al.*, 2004; GILANI *et al.*, 2004; NAJAFABADI *et al.*, 2004).

3.7 Microencapsulação

A microencapsulação tem sido amplamente estudada na área farmacêutica com vários objetivos, entre eles: desenvolvimento de formas de liberação, obtenção de micropartículas gastrorresistentes, desenvolvimento de formas de liberação intrapulmonar, intranasal e intra-articular, desenvolvimento de formas de liberação oftálmica, diminuição da toxicidade gastrointestinal, melhora na estabilidade de fármacos, obtenção de grânulos, aumento da biodisponibilidade, imunização oral e intranasal (CONTE *et al.*, 1994; ESPOSITO *et al.*, 2002).

As micropartículas são sistemas micrométricos (1 a 1000 μm), geralmente poliméricos, que podem ser classificados em duas categorias, de acordo com a sua constituição: as microesferas, que são sistemas matriciais micrométricos; e microcápsulas, que são sistemas reservatórios micrométricos, contendo uma substância ativa ou núcleo rodeado por uma membrana ou revestimento (ESPOSITO *et al.*, 2002).

Outro aspecto relevante é a caracterização dos sistemas microparticulados. A determinação das propriedades da formulação obtida é fundamental para sua caracterização como sistema carreador de fármaco. Desta forma, diversos aspectos podem ser avaliados como: rendimento do processo, eficiência de encapsulação, teor de umidade, morfologia por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura ou microscopia confocal e tamanho de partícula e distribuição granulométrica por difratometria a laser (KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 1996; PALMIERI *et al.*, 2001; ESPOSITO *et al.*, 2002; ONEDA e RÉ, 2003).

A determinação das interações e/ou incompatibilidades entre os constituintes da formulação é freqüentemente avaliada por técnicas como a espectroscopia na região do infravermelho, a difratometria de raios-X e métodos termo-analíticos, como a calorimetria exploratória diferencial (KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 1996; LORENZO-LAMOSA *et al.*, 1998; KURKURI e AMINABHAVI, 2004).

3.8 Polímeros

As micropartículas podem ser preparadas a partir de polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Polímeros como ácido hialurônico, HPMC e quitosana têm sido empregados na microencapsulação de fármacos via pulmonar, como dipropionato de beclometasona, betametasona e sulfato de terbutalina, devido às suas propriedades mucoadesivas, além de aumentar a absorção pulmonar e retardar a depuração mucociliar (HWANG *et al.*, 2008; LEAROYD *et al.*, 2008b; MANCA *et al.*, 2008; SIVADAS *et al.*, 2008).

O ácido hialurônico é um polissacarídeo biodegradável, biocompatível, não-tóxico, não-imunogênico e não-inflamatório, que vem sendo utilizado em diversas aplicações médicas. Esse biopolímero aniônico é composto de unidades dissacarídeas alternadas de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina com ligações interglicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Mais de 50% do ácido hialurônico presente no corpo humano é encontrado na pele, pulmões e intestino. Também está presente no líquido sinovial, cordão umbilical e no sangue (BENEDETTI, 1994). Atualmente, é produzido comercialmente de tecidos animais como da crista de galos e de fermentações microbianas (OH *et al.*, 2010). Devido às inúmeras funções biológicas e excelentes propriedades físico-químicas, o ácido hialurônico tem sido amplamente utilizado no tratamento de artrite, cirurgias oftálmicas, liberação de fármacos e implantes de tecidos (HWANG *et al.*, 2008).

Quitosana, $\beta(1-4)$ 2-amino-2-deoxi-D-glicose, é um biopolímero hidrofílico obtido industrialmente pela hidrólise alcalina de grupos aminoacetil da quitina, o qual é o componente principal de conchas, camarões, siris e outros crustáceos (LIM *et al.*, 2000). Este polissacarídeo apresenta relevantes propriedades como: biocompatibilidade, não-toxicidade e biodegradabilidade (SINHA *et al.*, 2004). Além disso, possui propriedades mucoadesivas e a capacidade de promover a permeação de macromoléculas através do epitélio (LEHR *et al.*, 1992). Obtida da desacetilação da quitina, a quitosana é formada de unidades de D-glicosamina e N-acetilglicosamina. É um excipiente promissor que pode ser empregado em uma ampla variedade de aplicações, incluindo preparações de liberação modificada (TLIUM, 1998; LEAROYD *et al.*, 2008a). Outros estudos demonstram que pode-se aumentar a absorção de fármacos

pela interação direta da molécula catiônica do polímero com a membrana celular carregada negativamente (BORCHARD *et al.*, 1996).

Éteres da celulose não-iônicos, como hidroxipropilmetilcelulose, têm sido amplamente estudados em formulações de liberação sustentada. Extensivamente utilizado como excipiente, em formulações farmacêuticas orais e tópicas e, também, em produtos cosméticos e alimentares. Dentre as inúmeras funções, destaca-se seu uso na área farmacêutica como agente de revestimento, formador de película, agente estabilizador, unificador de comprimidos, agente de suspensão e de incremento de viscosidade. Além disso, é considerado um material não-tóxico e não irritante. Em contato com a água, este polímero hidrata-se rapidamente formando uma solução viscosa. É encontrado em diversas graduações que variam em viscosidade e em quantidade para substituição. O HPMC (Methocel[®] E3) utilizado possui 28-30% do grupo metoxil (OCH₃), 7-12% do grupo hidroxipropil (OCH₂CHOHCH₃) e é considerado de baixa viscosidade (2,4 – 3,6 mPas) (KIBBE, 2000; LEVINA e RAJABI-SIAHBOOMI, 2004).

3.9. Estudo de toxicidade pulmonar

A análise do fluído de lavagem broncoalveolar (FLBA) é um método efetivo para a detecção de resposta inflamatória pulmonar, o qual permite amostrar células e componentes bioquímicos do trato respiratório inferior (HENDERSON *et al.*, 1985; KOWAL-BIELECKA *et al.*, 2010). Dentre as metodologias existentes para avaliar a toxicidade pulmonar de uma substância, a análise do FLBA é um dos métodos mais descritos na literatura para a identificação de agentes citotóxicos (HENDERSON, 2005).

Substâncias inaladas potencialmente deletérias podem induzir mudanças na função respiratória, promover alterações em parâmetros bioquímicos e na permeabilidade do pulmão, causar respostas imunogênicas e, em última instância, provocar a morte do indivíduo (CRYAN *et al.*, 2007).

O aumento de proteínas e um influxo de neutrófilos (polimorfonucleares) são as alterações no FLBA mais sensíveis de uma resposta inflamatória (HENDERSON *et al.*, 1985). Portanto, pode-se detectar mudanças na permeabilidade do epitélio pulmonar através da determinação da concentração de proteínas totais. Substâncias inaladas

podem afetar a barreira epitelial pela abertura das junções celulares ou pelo aumento da permeabilidade da membrana celular. Além disso, o FLBA pode ser estudado quanto ao número de células, presença de enzimas indicadoras de dano celular, tais como desidrogenase láctica (DHL), fosfatase alcalina (FA) e Nacetilglucosaminidase (NAG), bem como quanto aos níveis de citosinas, interleucinas e óxido nítrico (HENDERSON, 2005; CRYAN *et al.*, 2007).

4. CAPÍTULO I – MICROPARTÍCULAS CONTENDO LEVODOPA NA FORMA FARMACÊUTICA PÓ INALATÓRIO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.

4.1. INTRODUÇÃO

A microencapsulação tem sido estudada em diversas áreas, como engenharia química e alimentícia, química industrial, cosmética e farmacêutica, entre outras. Dentre as técnicas utilizadas para a obtenção de micropartículas para liberação pulmonar pode-se destacar a secagem por aspersão, cujas vantagens estão baseadas no controle sobre o tamanho de partícula, morfologia da partícula, densidade do pó e possibilidade de incorporação de vários excipientes. Pode-se ressaltar também a rápida preparação com baixo custo, fácil transposição de escala comparada a outros métodos de microencapsulação e possibilidade de emprego para substâncias termolábeis, devido ao curto tempo de residência dos produtos na câmara de secagem (WAN *et al.*, 1992; CONTE *et al.*, 1994; LEAROYD *et al.*, 2008a).

Os sistemas microparticulados, em geral, possuem potencial para serem utilizados tanto nos sítios de ação específico como em sistemas de liberação controlada. Entretanto, as micropartículas possuem vantagens adicionais quando acompanhadas de polímeros com propriedades mucoadesivas como: um contato mais próximo com a camada de muco, absorção mais eficiente e aumento da biodisponibilidade de fármacos, devido à ampla superfície em um dado volume (SAKAGAMI *et al.*, 2001).

Polímeros mucoadesivos têm sido foco de inúmeras pesquisas na área farmacêutica com a finalidade de proporcionar uma melhora na liberação de fármacos devido ao aumento do tempo de permanência e contato da forma farmacêutica com as mucosas. Os materiais mucoadesivos incorporados nas formulações podem aumentar a absorção de fármacos pela mucosa celular ou o fármaco pode ser liberado no sítio por um período prolongado (SAKAGAMI *et al.*, 2001; SIVADAS *et al.*, 2008).

As micropartículas mucoadesivas, como um sistema carreador de fármacos para melhorar a liberação de medicamentos, possuem potenciais aplicações em diversas vias de administração, tanto para efeito local quanto sistêmico (LIM *et al.*, 2000; SIVADAS *et al.*, 2008).

Neste contexto, este capítulo descreve o desenvolvimento das micropartículas e sua caracterização bem como estudo de citotoxicidade pulmonar da formulação em ratos através da técnica de lavagem bronco-alveolar (Comitê de Ética – Parecer nº 2008118).

Novel levodopa microparticles for pulmonary delivery and *in vivo* respiratory tract toxicity study.

Rúbia L. Pereira*, Aline B. Barth, Leandro Tasso, Renata P. Raffin, Sílvia S. Guterres, Elfrides E. S. Schapoval.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre-RS, Brazil, CEP 90610-200.

* Corresponding author: Tel: +55 51 33085214; Fax: +55 51 33085378

E-mail address: rlperei@yahoo.com.br (Rubia Lazzaretti Pereira)

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurodegenerative movement disorder and comprises both motor and non-motor symptoms at all stages of the disease. Levodopa provides the most relief of the motor signs and symptoms of PD and it is considered the gold standard of treatment. The aim of this study was to develop novel microparticles containing levodopa for pulmonary delivery. Powders were produced by spray-drying levodopa, chitosan, HPMC and hyaluronic acid at different ratios and under controlled conditions, to obtain suitable particle size distribution for lung delivery. The formulation that showed the best results was characterized using laser diffraction, scanning electron microscopy, tapped density analysis and quantified by HPLC. In addition, a cytotoxicity assay was performed to evaluate the pulmonary membrane damage of levodopa and the formulation dry powder in rats. The results showed good drug loading capacity ($97.30\% \pm 0.5$) and the obtained microparticles presented appropriate aerodynamic diameter for pulmonary delivery ($4.18 \pm 0.09 \mu\text{m}$). The bronchoalveolar lavage (BAL) study *in vivo* showed that levodopa microparticles did not elicit any significant increases in marker enzyme activities compared to the untreated control group. Therefore, no respiratory tract toxicity was observed with this novel formulation.

Keywords: levodopa, microparticles, spray-drying, Parkinson's disease, cytotoxicity study.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a central nervous system (CNS) pathology that leads to severe difficulties with body motions. Affecting one in every 100 adults above the age of 65 years, it is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease (De Rijk *et al.*, 2000). Typical symptoms include tremor, rigidity, slowed body movements (bradykinesia), unstable posture and difficulty in walking. To date PD remains an incurable disease, however available therapies aim to improve the functional capacity of the patient for as long as possible (Katzung, 2001; Singh *et al.*, 2007; Goole and Amighi, 2009).

Levodopa is the key compound in the treatment of PD, acting as a precursor of dopamine. When levodopa is administered orally it is rapidly decarboxylated and only a small portion of the dose enters the CNS unchanged. Thus, a high dose is required for the desired effect which induces to numerous side effects (Forzese, 1997; Olanow *et al.*, 2004; Jankovic, 2005). Besides that, levodopa presents a variable oral bioavailability which leads to motor fluctuations. Nevertheless, levodopa still the most effective pharmacological treatment for PD (Nyholm, 2006; Seeberger and Hauser, 2007; LeWitt, 2009; Murata, 2009; Simuni *et al.*, 2009a; Yokochi, 2009; Ngwuluka *et al.*, 2010; Puente *et al.*, 2010).

The problems with oral levodopa have prompted researchers to find alternative routes of administration (Nyholm, 2006; Goole and Amighi, 2009; Kim *et al.*, 2009). The large alveolar surface area suitable for drug absorption, low thickness epithelial barrier, extensive vascularization and relatively low proteolytic activity compared to other administration routes, together with the absence of the first-pass effect, make the

pulmonary delivery an outstanding target (Patton and Platz, 1992; Clark, 2002; Courier *et al.*, 2002; Jain, 2008). Therefore, a novel spray-dried formulation of levodopa microparticles containing chitosan, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and hyaluronic acid for pulmonary delivery has been developed focused on the concept of slowing and targeting the release of levodopa to prolong the therapeutic effect, to reduce dose and number of administrations. In a pharmacokinetic study published by Bartus and collaborators (2004), it was demonstrated several advantages of pulmonary delivery of levodopa over the oral route and established the concept that an inhalable formulation may provide a relatively simple and effective means for improving the treatment of PD patients.

The advantages for sustained release (SR) formulations for pulmonary drug delivery are numerous, and include extended duration of action, improved management of therapy, reduced dosing frequency, improved patient compliance, reduction in side effects, together with potential cost savings that exists for SR therapy (Cook, 2005; Learoyd *et al.*, 2008b).

Chitosan, a polysaccharide derived from deacetylation of the naturally occurring polymer chitin, is a promising excipient that can be employed in sustained release preparations (Learoyd *et al.*, 2008a). Indeed, chitosan has well-documented relevant properties as biocompatibility, low toxicity and biodegradability (Hirano *et al.*, 1988; Knapczyk *et al.*, 1989; Hirano *et al.*, 1990; Dornish *et al.*, 1997). Other mucoadhesive polymers such as hyaluronic acid act as a drug release modifier. Both polymers have been found to increase pulmonary absorption by delaying mucociliary clearance (Lim *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2008; Learoyd *et al.*, 2008a; Sivadas *et al.*, 2008). HPMC was

chosen since it had previously been used as particle stabilizer (Steckel *et al.*, 2003) and as a particle shaper for dry powder inhaler (Colombo *et al.*, 2008).

Microspheres have recently been proposed for pulmonary administration, once they can be designed to achieve appropriate morphological and aerodynamic characteristics for that purpose. The success of the inhaled particles depends mostly on their size and density, and hence, aerodynamic diameter (Taylor and Kellaway, 2001). The respirable fraction of these powders, generally the fraction of particles with an aerodynamic diameter ranging from 1 to 5 μm , should be as high as possible to guarantee a maximum deposition in the deep lung (Bosquillon *et al.*, 2001).

The first epithelial surface encountered by inhaled materials is the epithelium of the respiratory tract. The epithelium is lined by a fluid (ELF) that can be sampled by a saline wash (lavage) of the area of interest. The purpose of this technique, known as bronchoalveolar lavage (BAL), is to obtain a sample of the ELF from the respiratory tract so it can be analyzed for biomarkers of an inflammatory response in the respiratory tract. The most common responses measured are indicators of an inflammatory response. Protein content in the lavage fluid can be used to monitor increased permeability of the alveolar/capillary barrier, which occurs in an inflammatory response. Lactate dehydrogenase is a cytoplasmic enzyme whose presence extracellular indicates cell death and alkaline phosphatase is an enzyme associated with Type II cell secretions (Henderson, 2005; Hussain and Ahsan, 2005; He *et al.*, 2007; Matute-Bello, 2008).

Therefore, the aim of this study was to prepare novel microspheres composed of chitosan, HPMC and hyaluronic acid by spray-drying and characterize the formulation

for pulmonary delivery. In addition, the effect of levodopa and the microspheres on the pulmonary membrane damage was evaluated in rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Levodopa (99.99%) was purchased from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Chitosan, low molecular weight (LMW: 50kDa) was supplied by Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, USA), Methocel[®] E3 (HPMC) was kindly donated by Colorcon (NJ, USA) and hyaluronic acid was purchased from Purebulk (Oregon, USA). All other solvents or chemicals were of HPLC or analytical grade. Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV (Molsheim, France).

2.2 Microparticles preparation and characterization

2.2.1 Preparation of spray-dried powders

Formulations for spray-drying were prepared by the addition of levodopa to a 0.5% (v/v) glacial acetic acid aqueous solution containing hyaluronic acid and HPMC. The solution was prepared by mixing 0.16 g of hyaluronic acid and 3.12 g of HPMC in 500 mL glacial acetic acid aqueous solution (0.5% v/v) under mechanical agitation until completely dissolved. After that, 2.5 g of levodopa were added into the solution. The prepared formulation was subsequently spray-dried (LM-MSD1.0: Labmaq São Paulo, Brazil) using the following operating conditions: inlet temperature, 120 °C; spray flow rate, 0.3 L/h and air pressure, 50 KPa. The equipment is equipped with a 0.7 mm

pressurized nozzle. These conditions resulted in an outlet temperature between 75-85°C.

Two grams of the resultant spray-dried powder were resuspended in 150 mL glacial acetic acid aqueous solution (0.5% v/v) and mixed with 50 mL of another solution of glacial acetic acid (0.5% v/v) containing 0.2 g chitosan low molecular weight. The prepared formulation (200 mL) was subsequently spray-dried using the following operating conditions: inlet temperature, 120 °C; spray flow rate, 0.2 L/h and air pressure, 50 KPa. The recovered particles were stored in a desiccator at room temperature until further use.

2.2.2 Determination of drug and water content

The levodopa content in the prepared microspheres was determined by high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1200 series; Santa Clara, USA) method with UV detector at 280 nm. The method to quantify the drug in the formulation was developed and validated according to the official guidelines (ICH 2005; USP, 2009). Microspheres, containing a quantity equivalent of 10 mg levodopa, were transferred to a 50 mL volumetric flask, and then it was added 15 mL of mobile phase (0.01 M monobasic potassium phosphate adjusted to a pH value 3.0) followed by 20 minutes in ultrasonic bath and 20 minutes in mechanical shaker. After that, the volume was completed with mobile phase and an aliquot of 2 mL of this solution was diluted in a 10 mL volumetric flask with mobile phase resulting in a final concentration of 40 µg/mL. The solution was then filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore®) prior to the injection. Samples were eluted with mobile phase through a ACE® RP-18 octadecyl

silane column (250 x 4.6 mm I.D. particle size 5 µm) at a flow rate of 1.0 mL/min. The temperature was set at 25 °C in the column oven. The sample injection volume was 20 µL and the run time was 10 minutes.

The residual moisture content of spray-dried powders was determined by Karl Fisher titration (Mettler-Toledo DL37 coulometer, Ohio, USA).

2.2.3 Stability study in solution

The stability of levodopa in mobile phase at room temperature was examined by incubating a known amount of levodopa in the buffer solution for 15 h to verify the drug stability during the analytical analysis.

It was also performed a stability study of levodopa in 0.5% (v/v) acetic acid solution containing the excipients to ensure that levodopa will not degrade during the formulation preparation. Aliquots of this solution were withdrawn after 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 5 h and compared to a reference standard solution. The samples were analysed in triplicate by HPLC.

2.2.4 Particle size analysis

Particle size distribution and polydispersity of the spray-dried powders were determined by laser scattering using a Scirocco cell with Scirocco 2000 dry powder feeder (Mastersizer 2000, Malvern Instrument, UK). The powder was dispersed in air using 2 bar pressure. All samples were measured using Fraunhofer diffraction mode. Each sample was analysed in triplicate.

The population dispersity was referred as span and calculated as reported in the following equation:

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

where d_{90} , d_{10} and d_{50} are the mean diameters at the 90%, 10% and 50% of the population distribution, respectively.

Eq. (1)

2.2.5 Powder density and aerodynamic diameter

The tapped density of the spray-dried powders was measured after 10, 500 and 1250 mechanical tapping on the same sample using a tamping volumeter (Tapped Density Assessor: J. Engelsmann AG, Ludwigshafen, Germany) until the change in the powder volume was smaller or equal to 0.1 mL (Hausner, 1967; Guyot *et al.*, 1995). Measurements were performed in triplicate. The particle density (ρ) was calculated dividing the mass of powder by the final tapped volume.

After that, the theoretical aerodynamic diameter, d_{aero} , of the microparticles was calculated by the following equation:

$$d_{aero} = d (\sqrt{\rho/\rho_1})$$

where d is the particle size, ρ is particle density and ρ_1 is the shape function 1 g/cm³.

Eq. (2)

The mean diameter over the volume distribution $d_{4,3}$ was used as particle size (d) in the equation.

2.2.7 Scanning electron microscopy

Morphology of the microparticles was examined by scanning electron microscopy (SEM, Model JSM-6060; Jeol Technics, Tokyo, Japan). Spray-dried powders were mounted onto separate, adhesive-coated, 12.5 mm diameter aluminum pin stubs.

Excess powder was removed by tapping the stubs sharply. Spray-dried powders were gold-coated prior to analysis.

2.2.8 Differential scanning calorimetry

The thermal properties of the levodopa, polymers, binary and ternary physical mixture, formulation physical mixture and the spray-dried powders were analysed using a differential scanning calorimeter (DSC, Model Q20; TA Instruments, Delaware, USA). All physical mixtures were done using the same proportion of drug and polymers used in the formulation. Samples (5–7 mg) were sealed in DSC hermetic aluminum pans and placed in liquid nitrogen for 5 minutes. After that, the samples were exposed to a 10 °Cmin⁻¹ temperature ramp between -80 and 380 °C. Exothermal and endothermic peak temperatures, onset temperature and heat of enthalpy for each peak were determined using TA Instruments software.

2.3 Respiratory tract toxicity study *in vivo* - analysis of bronchoalveolar lavage

Male Wistar rats weighing 250–300 g were anaesthetized with ethyl carbamate (1.25 g/kg, i.p.) and placed on their backs on a board during the experiments. The trachea was exposed and an incision was made between the fifth and sixth tracheal rings. Rats were divided into four groups, four rats in each group, to receive four different treatments using a blunt stainless steel cannula. Positive control group received 100 µL sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.1%), the negative control received an air insufflation of 10 mL. The third group of animals received levodopa (4.5 mg/kg) and the fourth group received the microparticles containing levodopa (4.5 mg/kg), chitosan

HPMC and hyaluronic acid. The amount of levodopa dry powder administered was calculated according to a study published by Bartus *et al.* (2004).

After 4 hours the animals were sacrificed and the lungs were removed. The lavage was done with 3 mL of room temperature sterile saline which was left in the lungs for 30 s. During this time, the lungs were gently massaged to ensure the saline reached all areas. The retained volume was then re-instilled for an additional lavage cycle. Subsequently, the lungs were lavaged again with a further volume of sterile saline using the same procedure. The combined lavagates were then retained in a tube kept on ice. The cellular content of the lavage fluid was removed by centrifugation at 1000 rpm for 10 min at 4 °C (refrigerated centrifuge, Sigma 4K15). The supernatant of BAL was analyzed for total protein, alkaline phosphatase (AP), lactate dehydrogenase (LDH) and albumin using commonly applied laboratory procedures.

The experimental protocol performed in the present study was approved by the Ethical Research Committee of the University of Rio Grande do Sul (protocol nº 2008118).

3. Results and Discussion

3.1 Stability study

Levodopa was stable in mobile phase at room temperature for 15 hours. So, the method developed and validated was suitable for all HPLC drug analysis. Levodopa was also stable in 0.5% (v/v) acetic acid solution containing the excipients during the 5 h analysed. This ensures that levodopa will not degrade or suffer an interference of the excipients during the stirring time and before the spray-drying procedure.

3.2 Spray-dried powder characteristics

Powders were produced by spray-drying levodopa, chitosan, HPMC and hyaluronic acid at different ratios and under different controlled conditions. The formulation and the conditions described in the item 2.2.1 were the one that presented acceptable drug loading results and suitable particle size distribution for lung delivery. It was necessary to spray-dry the microspheres twice due to the incompatibility of chitosan and hyaluronic acid in the acetic acid solution. Chitosan, a cationic polymer, and hyaluronic acid, an anionic polymer, form an insoluble complex in solution.

Analysis of the levodopa content of the spray-dried powders indicated that the drug loading ranged from 96.80% to 97.80% (Table 1). Titration analysis of the spray-dried powders indicated that the moistures content ranged from 5.0 – 7.5% w/w. These values are in line with other studies that indicate moisture content of spray-dried powders of 7.5% w/w (Stahl *et al.*, 2002; Chew, 2005).

Table 1: Drug loading by HPLC and water content of spray-dried powder.

Powder composition	Drug loading (%) \pm S.D.	Water content (%) \pm S.D.
Levodopa, chitosan, hyaluronic acid and HPMC	97.30 \pm 0.50	6.25 \pm 1.25
Chitosan, hyaluronic acid and HPMC	-	6.22 \pm 0.80

3.2.1 Particle size analysis

Particle size data by laser diffraction are presented in Table 2. The tapped density of the spray-dried powders was similar for all powders (range: 0.06-0.08 g/mL; Table 2). Previous researchers suggested that powders with low tapped density exhibit better aerosolisation characteristics compared to more dense powders (Bosquillon *et al.*, 2001; Bosquillon *et al.*, 2004).

The results of particle size and tapped density were used to calculate the theoretical aerodynamic diameter (d_{aero}). As shown in Table 2, the d_{aero} value of spray-dried powders was between 4.09 – 4.28 μm , suggesting that the powders were of a suitable aerodynamic size for pulmonary delivery. In addition, the d_{aero} value of spray-dried powders was smaller than the placebo formulation, showing a favorable influence of levodopa in the particle size.

Table 2: Particle size distribution and aerodynamic diameter of spray-dried powder (average of three measurements).

Powder	$d [v,10]$ (μm) \pm S.D.	$d [v,50]$ (μm) \pm S.D.	$d [v,90]$ (μm) \pm S.D.	$d [4,3]$ (μm) \pm S.D.	Span \pm S.D.	Tapped density (g/cm^3) \pm S.D.	d_{aero} (μm) \pm S.D.
Levodopa, chitosan, HPMC and hyaluronic acid	4.62 \pm 0.48	13.64 \pm 0.79	30.23 \pm 0.34	15.7 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	0.07 \pm 0.01	4.18 \pm 0.09

3.2.2 Differential scanning calorimetry

The influence of the heat flow on the thermal properties of the spray-dried formulation is shown in Fig. 1. For levodopa differential scanning calorimetry, a characteristic endothermic peak of melting is present at approximately 305 °C. The thermogram of the spray-dried formulation exhibited three endothermic transitions at 57, 142 and 267 °C. A broad exothermic peak was observed at 120 °C only at the spray-dried sample. This peak was not observed at the physical mixture, showing that a different interaction occurred in the formulation. Others exothermic peaks were seen between 320-345 °C. Besides that, it was also observed a temperature decrease in the levodopa peak from 306 to 267 °C.

All DSC curves were also evaluated especially with regard to the phase transition enthalpies (peak areas). The levodopa microparticles showed a decrease in the

enthalpies (ΔH) compared to pure levodopa, binary and ternary mixtures and physical mixture, as shown in Table 3.

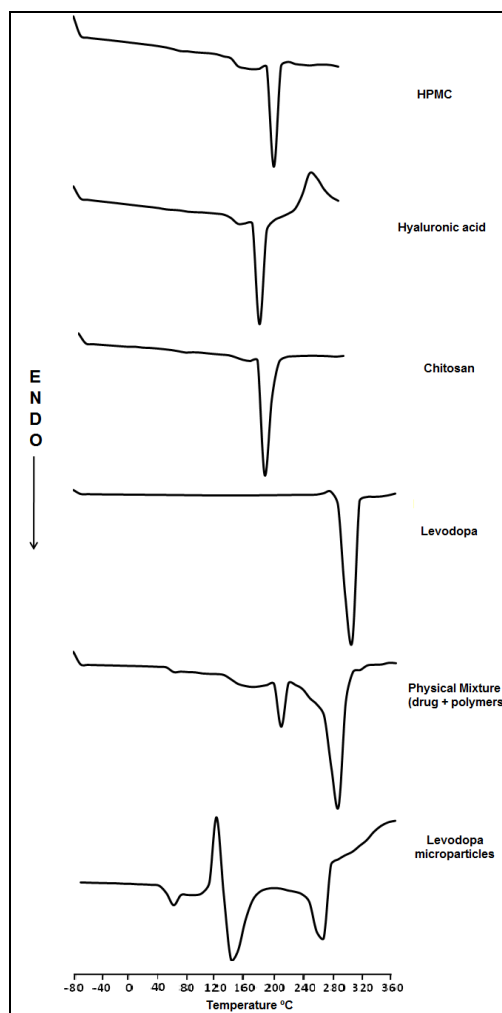


Fig.1. DSC thermogram of the polymers (HPMC, hyaluronic acid chitosan), levodopa, physical mixture (levodopa and polymers) and spray-dried levodopa microparticles.

The results showed that all pure substances presented higher melting points compared to the mixed substances. Conventionally, the melting enthalpy represents the level of crystallinity of a substance. When two substances are mixed, the purity of each is reduced and lower melting points appear in the DSC thermograph. Any large shift in melting points indicates that a strong solid-solid interaction has occurred, although it

does not necessarily indicate an incompatibility (Budavari *et al.*, 1999). The decrease in the enthalpy also suggests that levodopa is encapsulated in the spray-dried formulation.

Table 3: Melting temperature and heat of enthalpy of levodopa peaks in different samples.

Samples	Tm (°C)	ΔH (J/g)
Levodopa	305.77	516.3
Levodopa + chitosan	294.51	360.8
Levodopa + hyaluronic acid	287.54	344.6
Levodopa + HPMC	282.69	172.75
Levodopa + hyaluronic acid + HPMC	288.69	216.9
Levodopa + chitosan+ hyaluronic acid + HPMC	290.75	203.2
Levodopa microparticles	267.58	92.76

3.2.3 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was used to visualize the particle diameter, structural and surface morphology of the spray-dried powders. The spray-dried powders consisted of microparticles having a round shape characterized by an irregular dented surface. The micrograph of the spray-dried formulation shows some spherical particles but most of them were crumpled. All the particles present smooth surface. Most of the particles show a diameter less than 10 μm. The spray-drying method produced microparticles with a promising morphology as shown in Fig. 2. The particles cavities in the interior are the result of the extraction of the water droplets from within the matrix. This feature is important to reduce the density and to obtain favorable aerodynamic diameter (Giovagnoli *et al.*, 2007). The appearance of much smaller particles located on the surface of larger particles was observed.

The spray drying technique reproducibly yielded dry powders comprised of fine and spherical particles. The SEM images indicated that the powders formed were amorphous in nature; this was as expected, as powders generated through spray-drying

are known to be predominately amorphous in nature (Corrigan, 1995). In general, no crystalline structure was observed. Given the amorphous nature of the powders, all samples were stored at room temperature in a desiccator immediately after spray-drying to limit crystallization of the samples.

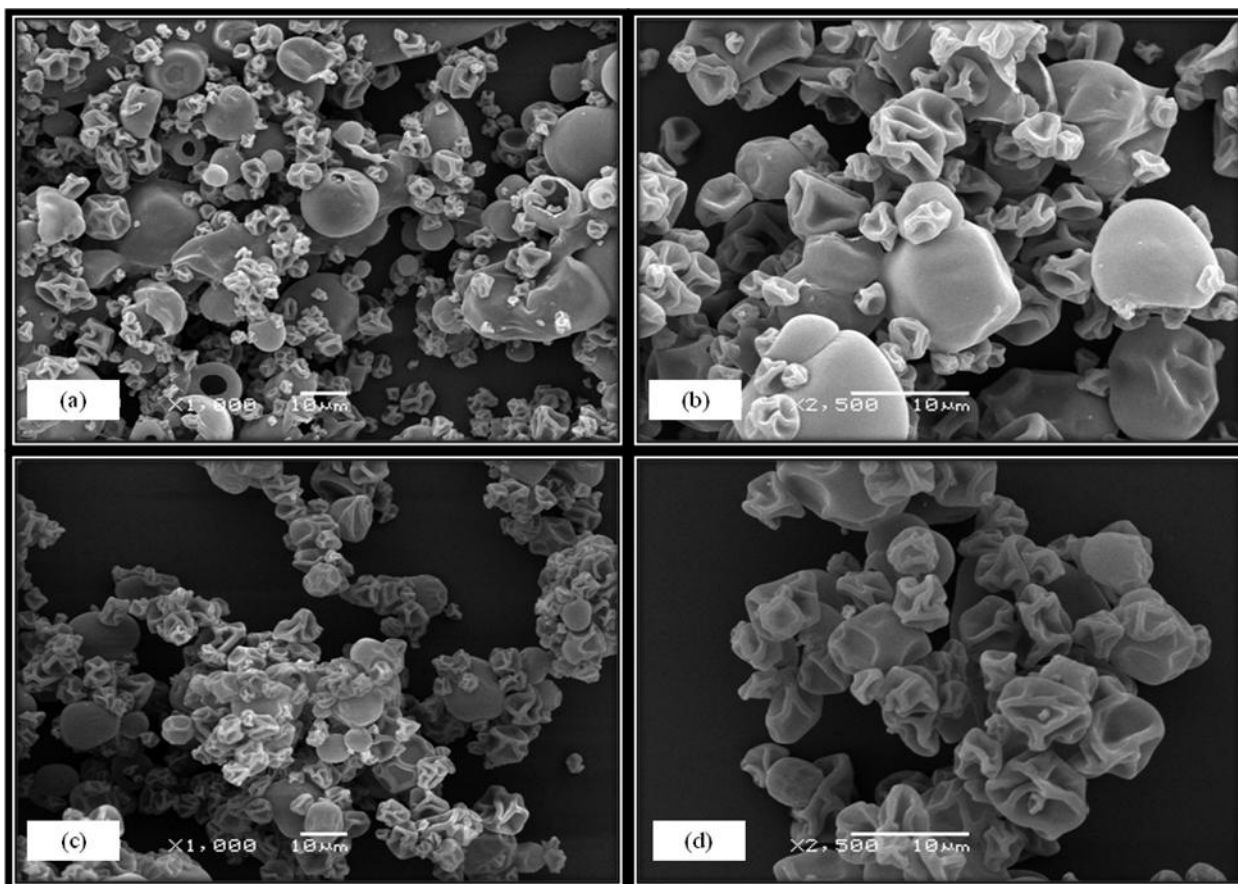


Fig.2. SEM microphotographs of microparticles prepared by spray-drying containing: (a) and (b) levodopa, chitosan, HPMC and hyaluronic acid; (c) and (d) chitosan, HPMC and hyaluronic acid.

3.3 Respiratory tract toxicity study *in vivo* - analysis of bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavage is a useful and safe method for sampling cellular and biochemical components from the lung. Therefore, BAL study was performed in order to investigate if levodopa formulated with chitosan, HPMC and hyaluronic acid causes any biochemical or cellular changes in the lungs.

For the BAL studies, SDS was used as positive control, an anionic surfactant known for its harsh effect on the biological membrane. This agent has been shown to cause lung damage and release lung injury markers such as lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) (Henderson *et al.*, 1985; Hussain and Ahsan, 2005). In this regard, the safety of levodopa formulation was assessed and compared with SDS and levodopa powder by monitoring the changes in the markers of lung injury in BAL fluid (Fig. 3).

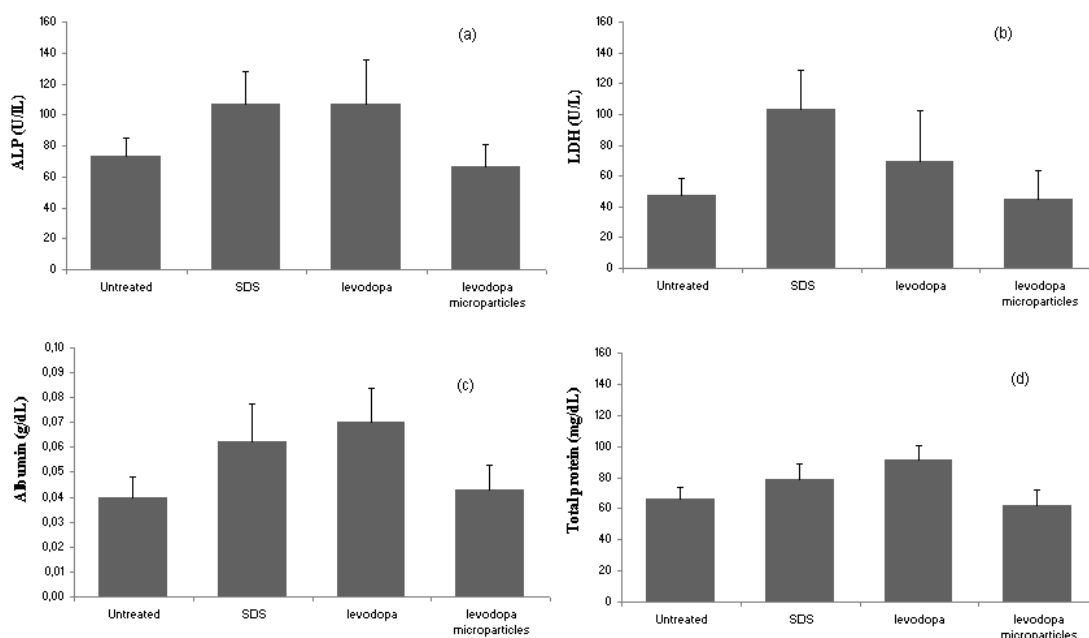


Fig.3. Enzyme activities of ALP (a), LDH (b), albumin (c) and total protein levels (d) following bronchoalveolar lavage fluid analysis at 4 hours after pulmonary administration of different formulations: air insufflation (untreated), sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.1%), levodopa powder (4.5 mg/kg) and levodopa (4.5 mg/kg) + chitosan + HPMC + hyaluronic acid microparticles. Data represent mean \pm S.D., n=4.

SDS and levodopa powder produced an increase in all biochemical markers 4 h after the treatment compared to untreated animals. The LDH activities with the spray-dried powder were significantly less than those with SDS, positive control, and as low as the negative control. Similar results were obtained when ALP levels were measured

(Fig. 3). In fact, the increase in ALP levels for the SDS-treated group correlated well with the increased LDH levels. Levodopa powder and SDS-treated rats also produced an increase in albumin and total protein levels 4 h after the treatment. However, no increase in albumin and total protein levels was observed in the spray-dried formulation group, as well as the negative group. Furthermore, the differences between the LDH, ALP, albumin and total protein levels produced in the untreated group and levodopa microparticles-treated rats were not statistically significant ($p>0.05$) analysed by Student-Newman-Keuls method. The statistical study also showed no difference between the animals treated with levodopa and SDS.

The biochemical changes that may occur in response to pulmonary exposure of a drug and pharmaceutical adjuvants have been studied by monitoring the changes in enzymatic activities in bronchoalveolar lavage fluid (Henderson *et al.*, 1985). Of the enzymes studied, LDH and ALP are known to provide important insights as to the cell injury produced by exogenous substances. Protein can leak into the alveolar space because of loss of the epithelial integrity. These reactions can be reflected by increasing the cell counts, LDH and concentrations of total protein in BALF.

LDH, a cytoplasmic enzyme, should be extracellular in bronchoalveolar lavage fluid only if cell lysis or cell membrane damage has occurred (Henderson, 1984). When cells are damaged or destroyed, the release of LDH into the blood stream or extracellular fluid causes its level to rise. Therefore, LDH is used as a general injury marker. Similarly, ALP, a membrane-bound indicator of type II cell secretory activity, is used as a sensitive marker of compromised cellular integrity or toxicity induced by cell damage or pathological conditions. It has been considered as an indicator of alveolar

type II cell proliferation in response to type I cell damage (DeNicola *et al.*, 1981; Henderson *et al.*, 1985; Todo *et al.*, 2001).

As discussed above, the LDH and ALP levels in SDS-treated rats imply that damage to lung cells was evident 4 h after the treatment. However, levodopa microparticles-treated rats showed enzymatic profiles similar to non-treated rats. Altogether, the positive control used in the study produced significant damage to the lung tissue as well as levodopa powder, whereas levodopa formulation did not cause any damage. These data are consistent with the hypothesis that the excipients are relatively safe for use in a pulmonary formulation. Overall, the BAL study demonstrates that the formulation is well tolerated by the respiratory epithelium. Taken together, this study opens up the possibility of using this novel formulation as an efficacious carrier for the delivery of levodopa through the pulmonary route, if formulated judiciously.

Conclusion

These investigations demonstrate that it is possible to generate respirable powders for Parkinson's disease treatment with good characteristics by using a simple spray-drying method. Although, the formulation respirability was not proven, the properties in terms of morphology, size and drug content were satisfactory and are supposed to influence positively in the aerodynamic features. These powders would be predicted to deposit predominately in the central and peripheral regions of the lung following inhalation, with minimal oropharyngeal deposition, thereby maximizing the dose delivered to the lung. The cytotoxicity study *in vivo* proves that this novel formulation do not cause lung injury, however further studies are still necessary.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Brazil) for the financial support and Colorcon for the provision of HPMC.

References

1. Bartus, R.T., Emerich, D., Belt-Snodgrass, P., FU, K.; Brenhouse, H.S., Lafreniere, D., Novak, L., Cooper, T., Basile, A.S. A pulmonary formulation of L-dopa enhances its effectiveness in a rat model of Parkinson's disease. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 310, 828-835, 2004.
2. Bosquillon, C.; Lombry, C.; Preat, V.; Vanbever, R. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Control. Release*, 70, 329-339, 2001.
3. Bosquillon, C.; Preat, V.; Vanbever, R. Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats. *J. Control. Release*, 96, 233-244, 2004.
4. Budavari, Z.; Zelko, R.; Racz, I.; Marton, S. Compatibility study between folic acid, vitamin B6 and tablet excipients using differential scanning calorimetry. *Pharmazie*, 54, 861-862, 1999.
5. Clark, A. Formulation of proteins and peptides for inhalation. *Drug Deliv. Syst. Sci.*, 2, 73-77, 2002.
6. Chew, N. Y.; Tang, P.; Chan, H. K.; Raper, J. A. How much particle surface corrugation is sufficient to improve aerosol performance of powders? *Pharm. Res.*, 22, 148-152, 2005.

7. Colombo, G., Terzano, C., Petroianni, A., Ricci, A., Buttini, F. Methacholine dry powder inhaler as a new tool for bronchial challenge test. *Int. J. Pharm.*, 352, 165-171, 2008.
8. Cook, R.O., Pannu, R.K., Kellaway, I.W. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. *J. Control. Release*, 104, 79-90, 2005.
9. Corrigan, O. J. Thermal analysis of spray-dried products. *Thermochim. Acta*, 248, 245-258, 1995.
10. Courrier, H.M., Butz, N., Vandamme, T.F. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 19, 425-498, 2002.
11. DeNicola, D. B.; Rebar, A. H.; Henderson, R. F. Early damage indications in the lung. V. Biochemical and cytological response to NO₂ inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 60, 301-312, 1981.
12. De Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology*, 54 (11), S21-S23, 2000.
13. Dornish, M., Hagen, A., Hansson, E., Peucheur, C., Vedier, F., Skaugrud, O. Safety of ProtasanTM: Ultrapure chitosan salts for biomedical and pharmaceutical use. In: Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K.M. (Eds.), *Advances in Chitin Science*, 664–670, 1997.
14. Forzese, D. Managing common adverse effects of levodopa. *Consult. Pharm.*, 12, 400-412, 1997.

15. Giovagnoli, S.; Blasi, P.; Schoubben, A.; Rossi, C.; Ricci, M. Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.*, 333, 103-111, 2007.
16. Goole, J., Amighi, K. Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease: An overview. *Int. J. Pharm.*, 380, 1-15, 2009.
17. Guyot, J.C.; Arnaud, P.; Becourt, P., Cassiere, J.P.; Chulia, D.; Duchêne, D.; Ferrand, D.; Gouaihardou, J.; Langlois, C.; Lequien, C.; Malfroid, F.; Pourcelot, Y.; Renoux, R.; Sergot, S.; Tore, P. Commentaires relatifs aux methods generals d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 5 (6), 482-494, 1995.
18. Hwang, S.M.; Kim, D.D.; Chung, S.J.; Shim, C.K. Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis. *J. Control. Release*, 129, 100-106, 2008.
19. Hausner, H.H. Friction condition in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy*, 3, 7-13, 1967.
20. He, L.; Gao, Y.; Lin, Y.; Katsumi, H.; Fujita, T.; Yamamoto, A. Improvement of pulmonary absorption of insulin and other water-soluble compounds by polyamines in rats. *Journal of Controlled Release*, 122, 94-101, 2007.
21. Henderson, R.F. Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. *Environ. Health Perspect.*, 56, 115-129, 1984.
22. Henderson, R. F.; Benson, J. M.; Hahn, F. F.; Hobbs, C. H.; Jones, R. K.; Muaderly, J. L.; McClellan, R. O.; Pickrell, J. A. New approaches for the

- evaluation of pulmonary toxicity: Bronchoalveolar lavage fluid analysis. *Fund. Appl. Toxicol.*, 5, 451-458, 1985.
23. Henderson, R.F. Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57, 155-159, 2005.
24. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. *Polym. Mater. Sci. Eng.*, 59, 897-901, 1988.
25. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I. Chitosan: a bio-compatible material for oral and intravenous administration. *Prog. Biomed. Polym.*, 283-289, 1990.
26. Hussain, A.; Ahsan, F. State of insulin self-association does not affect its absorption from the pulmonary route. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 289-298, 2005.
27. ICH. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology. In: *Proceedings of the International Conference on Harmonization*, 2005.
28. Jain, K.K. Drug delivery systems – an overview. *Methods Mol. Biol.*, 437, 1-50, 2008.
29. Jankovic, J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov. Disord.*, 20 (11), S11–S16, 2005.
30. Knapczyk J., Krowczynski L., Krzek J., Brzeski, M. Nurnberg, E., Schnek, O., Struszyk, H. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications, in: G. Skak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford (Eds.), *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, 657-663, 1989.

31. Katzung, B.G. Pharmacological management of parkinsonism and other movement disorders. In: Basic and Clinical Pharmacology, eighth ed. Lange Medical Books/McGraw Hill Companies, Inc., 2001.
32. Kim, T. K., Kang, W., Chun, I.K., Oh, S. Y., Lee, Y. H., Gwak, H. S. Pharmacokinetic evaluation and modeling of formulated levodopa intranasal delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 38 (5), 525-532, 2009.
33. Learoyd, T.P.; Burrows, J.L.; French, E.; Seville, P. Modified release of beclometasone dipropionate from chitosan-based spray-dried respirable powders. *Powder technology*, 187 (3), 231-238, 2008a.
34. Learoyd, T.P.; Burrows, J.L.; French, E.; Seville, P. Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 224-234, 2008b.
35. LeWitt, P.A. Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. *Parkinsonism Relat. D.*, 15 (1), S31-S34, 2009.
36. Lim, S.T.; Martin, G.P.; Berry, D.J.; Brown M.B. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *J. Control. Release*, 66, 281–292, 2000.
37. Matute-Bello, G.; Frevert, C. W.; Martin, T. R. Animal models of acute lung injury. *J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 295, 379-399, 2008.
38. Murata, M. Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. D.*, 15, S17-S20, 2009.

39. Ngwuluka, N., Pillay, V., Toit, L.C.D., Ndesendo, V., Choonara, Y., Modi, Naidoo, D. Levodopa delivery systems: advancements in delivery of the gold standard. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7 (2), 203-224, 2010.
40. Nyholm, D. Pharmacokinetic Optimization in the Treatment of Parkinson's Disease – An update. *Clin. Pharmacokinet.*, 45 (2), 109-136, 2006.
41. Olanow, C.W., Agid, Y., Mizuno, Y. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov. Disord.*, 19 (9), 997-1005, 2004.
42. Patton, J.S., Platz, R.M. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8, 179-196, 1992.
43. Puente, V., De Fabregues, O., Oliveras, C., Ribera, G., Pont-Sunyer, C., Vivanco, R., Cucurella, G., Giralt, E., Delgado, T., Garcia, C., Seoane, A., Campo, R. Eighteen month study of continuous intraduodenal levodopa infusion in patients with advanced Parkinson's disease: Impact on control of fluctuations and quality of life. *Parkinsonism Relat. D.*, 16 (3), 218-221, 2010.
44. Seeberger, L.C.; Hauser, R.A. Optimizing bioavailability in the treatment of Parkinson's disease. *Neuropharm.*, 53, 791-800, 2007.
45. Simuni, T., Lyons, K.E., Pahma, R., Hauser, R.A., Comella, C., Elmer, L., Weintraub, D. Treatment of Early Parkinson's Disease Part 1. *Eur. Neurol.*, 61, 193-205, 2009.
46. Singh, N.; Pillay, V.; Choonara, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81, 29-44, 2007.
47. Sivadas, N., O'Rourke, D., Tobin, A., Buckley, V., Ramtoola, Z., Kelly, J.G., Hickey, A.J., Cryan, S.A. A comparative study of a range of polymeric

- microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins. *Int. J. Pharm.*, 358, 59-167, 2008.
48. Stahl, K.; Claesson, M.; Lilliehorn, P.; Linden, H.; Backstrom, K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray-dried insulin intended for inhalation. *Int. J. Pharm.*, 233, 227-237, 2002.
49. Steckel, H., Rasenack, N., Villax, P., Müller, B.W. In vitro characterization of jet-milled and in-situ-micronized fluticasone-17—propionate. *Int. J. Pharm.*, 258, 65-75, 2003.
50. Taylor, G., Kellaway, I. Pulmonary drug delivery. In: Hillery, A., Lloyd, A., Swarbrick, J. (Eds.), *Drug Delivery and Targeting*, 269–300, 2001.
51. Todo, H.; Okamoto, H.; Lida, K.; Danjo, K. Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats. *Int. J. Pharm.*, 220, 101-110, 2001.
52. USP, *US Pharmacopeia 32*, 2009. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
53. Yokochi, M. Reevaluation of levodopa therapy for the treatment of advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. D.*, 15, S25-S30, 2009.

5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS DE LEVODOPA.

5.1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade torna-se uma ferramenta imprescindível na área farmacêutica, pois a partir dele pode-se garantir um medicamento seguro e eficaz. Assim sendo, o controle de qualidade inclui o desenvolvimento e validação de métodos analíticos sensíveis, específicos e confiáveis, além do estudo da estabilidade (SETHI, 1999).

Os métodos analíticos utilizados nas determinações qualitativas e quantitativas, desde a matéria-prima até as especialidades farmacêuticas, incluindo todas as fases do desenvolvimento do fármaco, desde a pesquisa até o controle de qualidade, devem ser devidamente validados (SWARTZ e KRULL, 1998). O objetivo da validação de um método é demonstrar, por meio de estudos experimentais, que o mesmo é apropriado para as aplicações analíticas pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003, ICH, 2005; USP, 2009).

Diferentes grupos têm definido os parâmetros analíticos para validação. Na tentativa de harmonizar as divergências encontradas entre as definições, representantes das indústrias e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão, por meio da ICH (International Conference on Harmonisation), definiram os parâmetros e requerimentos para a validação de métodos analíticos para produtos farmacêuticos (ICH, 1996, 2005). As diretrizes contidas nas guias publicadas pela ICH são quase integralmente adotadas na Farmacopéia Americana (USP, 2009) e no texto da Resolução Específica nº 899/2003 da ANVISA.

Os parâmetros analíticos, ou características de desempenho, tipicamente avaliados durante o processo de validação são: especificidade, linearidade e faixa de trabalho, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade da substância em análise e robustez (BRASIL, 2003).

- *Especificidade*: representa a capacidade do método de avaliar de forma inequívoca a substância em análise na presença de componentes que podem interferir na sua determinação, tais como excipientes, impurezas ou produtos de degradação;

- *Linearidade*: corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma faixa de variação conhecida;
- *Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)*: o LD representa a concentração mais baixa do fármaco que o processo analítico pode diferenciar, mas não quantificar com precisão sob condições experimentais e o LQ a menor concentração da substância em análise precisamente avaliada pelo método, com exatidão e precisão aceitáveis;
- *Precisão*: representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade quanto da repetibilidade de um método analítico. A reprodutibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo. A repetibilidade é determinada através de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa as variações intra-laboratoriais, com o mesmo procedimento realizado em diferentes dias, analistas ou equipamentos;
- *Exatidão*: representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Pode ser expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida. Este parâmetro deve ser analisado após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, podendo ser calculada como a percentagem de recuperação da quantidade conhecida da substância química de referência adicionada à amostra;

- *Robustez*: corresponde à capacidade de um método não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. Para cromatografia líquida de alta eficiência, por exemplo, pode-se alterar a coluna cromatográfica, temperatura de análise, a proporção dos componentes e o pH da fase móvel.

O teste de estabilidade fornece informações sobre como a qualidade do produto varia frente a diversos fatores, como, por exemplo, temperatura, umidade, luz, reações de hidrólise e oxidação (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). Além disso, a estabilidade depende das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos fármacos, excipientes e materiais de acondicionamento utilizados (MATTHEWS, 1999).

Estudos de degradação forçada fornecem informações sobre mecanismos de degradação e potenciais produtos de degradação. Estas informações podem ser utilizadas para os processos de fabricação ou para selecionar embalagens adequadas (KLICK *et al.*, 2005). As reações de degradação de um produto farmacêutico ocorrem em velocidades definidas, são de natureza química e dependem de várias condições, como, por exemplo, concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalisadores.

Levodopa microparticles for pulmonary delivery: photodegradation kinetics and LC stability-indicating method.

Rúbia L. Pereira*, Clésio S. Paim, Aline B. Barth, Renata P. Raffin, Sílvia S. Guterres, Elfrides E. S. Schapoval.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre-RS, Brazil, CEP 90610-200.

* Corresponding author: Tel: +55 51 33085214; Fax: +55 51 33085378

E-mail address: rlperei@yahoo.com.br (Rubia Lazzaretti Pereira)

ABSTRACT

Levodopa is considered the gold standard treatment of Parkinson's disease (PD). However, the efficacy of oral levodopa becomes problematic with the progression of PD due to its poor pharmacokinetics. Pulmonary delivery represents a novel approach to reduce this problem. The aim of this study was to develop and validate a stability-indicating LC method for quality control of the levodopa microparticles as well as to determine the drug photodegradation kinetics in solution. The analytical column ACE[®] RP-18 was operated with 0.01 M KH₂PO₄ as mobile phase, pH 3.0, at a flow rate of 1.0 mL/min and UV detection at 280 nm. Linearity was obtained over the concentration range of 10-60 µg/mL ($r^2=0.9999$) ($\alpha=5\%$). The quantification and detection limits were 208 ng/mL and 46.8 ng/mL, respectively. Excipient ingredients and resulting degradation products had no interference in the levodopa elution. Adequate results were found for repeatability, inter-day precision (<2% RSD), accuracy and robustness. The recovery results were in the range of 100.01% to 100.93%. The drug photodegradation kinetics was also determined and follows second order reaction kinetics. The developed and validated method could be used for the analyses of raw material and for the novel formulation developed, as well as for protocols of levodopa stability study.

Keywords: levodopa, pulmonary, microparticles, spray-drying, analytical method.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurodegenerative movement disorder and comprises both motor and non-motor symptoms at all stages of the disease. Tremors, rigidity, slow movement (bradykinesia), poor balance, and difficulty walking are characteristic primary symptoms of PD. The scope of non-motor manifestations is broad, and includes disturbance in mood, sleep, impulse control, cognition, perceptual changes and autonomic function [1]. Nowadays, PD is considered the second most common progressive neurodegenerative disorder and is a leading cause of neurologic disability. It has a world-wide distribution and has no gender of preference [2,3].

The symptoms and signs of PD are related to a progressive loss of dopamine in the basal ganglia. Therefore, exogenous substitution with dopamine agonists or the dopamine's prodrug, levodopa, chemically (S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoic acid (Fig. 1), is used to correct the mechanical disorder at the early stage of the disease. After administration, levodopa is converted into dopamine and stored in dopaminergic neurons. This storage capacity buffers the fluctuations in plasma levels of levodopa that result from its variable oral bioavailability [3,4]. Nevertheless, levodopa is the most effective pharmacological treatment for PD [5-12].

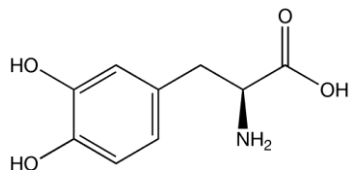


Fig. 1. Levodopa chemical structure.

The decrease in the duration of responsiveness to levodopa is related to the progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons and the subsequent loss of dopamine buffering, resulting in motor complications as fluctuations, dyskinesia and “on-off” effects. The appearance of the “on-off” effect is largely dependent on the dosage and the frequency of levodopa administration [4]. Studies showed that the highest levodopa dose was the most efficacious, but it also resulted in a significantly greater incidence of dyskinesia compared to placebo [10].

The problems with oral levodopa administration have prompted researchers to find alternative routes of administration [3,5,13]. Therefore, a novel spray-dried formulation of levodopa microparticles containing chitosan, hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) for pulmonary delivery has been developed focused on the concept of slowing and targeting the release of levodopa to prolong the therapeutic effect, to reduce dose and the number of administrations. The pulmonary route is a non-invasive way of administration that may provide rapid and efficient delivery of levodopa to the brain due to the fast drug absorption through the alveoli and also avoids the first-pass liver metabolism [14]. In a study published by Bartus and collaborators [15], it was demonstrated several advantages of pulmonary delivery of levodopa over the oral route and established the concept that an inhalable formulation may provide a relatively simple and effective means for improving the treatment of PD patients.

The advantages for sustained release (SR) formulations for pulmonary drug delivery are numerous, and include extended duration of action, improved management of therapy, reduced dosing frequency, improved patient compliance, reduction in side

effects, together with potential cost savings that exists for SR therapy [16,17]. Mucoadhesive polymers such as chitosan and hyaluronic acid act as a drug release modifier and also have been found to increase pulmonary absorption by delaying mucociliary clearance [17-20]. Therefore, they appear to be useful excipients when preparing sustained release formulations for pulmonary drug delivery. Indeed, chitosan has well-documented relevant properties as biocompatibility, low toxicity and biodegradability [21-24]. HPMC was chosen since it had previously been used as particle stabilizer [25] and as a particle shaper for dry powder inhaler [26].

Spray-drying is a one-step constructive process that provides greater control over particle size, particle morphology and powder density. Besides, dry powders generated by spray-drying have been investigated by a number of researchers for suitability as dry powder inhaler (DPI) formulations [17].

Even though levodopa is a relatively old drug it still provides the most relief of the motor signs and symptoms of PD and it is considered the gold standard of treatment. There are a few analytical studies of levodopa for quality control [27, 28] and no photodegradation kinetics studies described in the literature for levodopa were found.

According to the official guideline [29], stress testing of the drug substance can help to identify the likely degradation products, which can cooperate to establish the degradation pathways and the intrinsic stability of the molecule. In agreement with this guide, the light testing should be an integral part of the stress testing. Therefore, studies of levodopa and levodopa microparticles photodegradation kinetics in solution were performed in order to provide evidence on how the quality of the drug varies by the time under the influence of light. To conduct this study, the developed stability-indicating

method was applied. A stability-indicating method is necessary to quantify the drug in the presence of its degradation products, and the method should be capable of resolving and detecting photolytic degradants that appear during the study [29,30].

The aim of this study was to prepare novel microspheres composed of hyaluronic acid, HPMC and chitosan, and to develop and validate a stability-indicating LC method for quality control of the levodopa microparticles as well as to determine the drug photodegradation kinetics in solution.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Levodopa (99.99%) was purchased from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Chitosan, low molecular weight (LMW: 50kDa) was sourced from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, USA), hyaluronic acid was purchased from Purebulk (Oregon, USA) and Methocel[®] E3 (HPMC) was kindly donated by Colorcon (Pennsylvania, USA). All other solvents or chemicals were of LC or analytical grade. Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV (Molsheim, France).

2.2 Preparation of spray-dried powders

Formulations for spray-drying were prepared by the addition of levodopa to a 0.5% (v/v) glacial acetic acid aqueous solution containing hyaluronic acid and HPMC.

The solution was prepared by mixing 0.16 g of hyaluronic acid and 3.12 g of HPMC in 500 mL glacial acetic acid aqueous solution (0.5% v/v) under mechanical agitation until completely dissolved. After that, 2.5 g of levodopa were added into the

solution. The prepared formulation was subsequently spray-dried (LM-MSD1.0: Labmaq São Paulo, Brazil) using the following operating conditions: inlet temperature, 120 °C; spray flow rate, 0.3 L/h and air pressure, 50 KPa. The equipment is equipped with a 0.7 mm pressurized nozzle. These conditions resulted in an outlet temperature between 75-85°C.

Two grams of the resultant spray-dried powder were resuspended in 150 mL glacial acetic acid aqueous solution (0.5% v/v) and mixed with 50 mL of another solution of glacial acetic acid (0.5% v/v) containing 0.2 g chitosan low molecular weight. The prepared formulation (200 mL) was subsequently spray-dried using the following operating conditions: inlet temperature, 120 °C; spray flow rate, 0.2 L/h and air pressure, 50 KPa. The recovered particles were stored in a desiccator at room temperature until further use. It was necessary to spray-dry the solution twice due to the incompatibility of chitosan (cationic) and hyaluronic acid (anionic). These two polymers formed an insoluble complex in the solution.

2.3 Liquid chromatography (LC) assay of levodopa and levodopa microparticles

Method development, optimization and validation were conducted on an Agilent 1200 series LC (Santa Clara, USA) consisted of a G1311A quaternary pump, G1322A vacuum degasser, G1316A thermostat column compartment, G1329A standard auto sampler and G1315B diode array detector set at 280 nm. The analytical column ACE[®] RP-18 octadecyl silane (250 x 4.6 mm I.D. particle size 5 µm) was operated with 0.01 M monobasic potassium phosphate adjusted to a pH value 3.0 with phosphoric acid 85%

at a flow rate of 1.0 mL/min. The temperature was set at 25 °C in the column oven. The sample injection volume was 20 µL and the run time was 10 minutes.

2.4 Sample preparation for liquid chromatography analysis

The stock solution of levodopa (0.2 mg/mL) was prepared in mobile phase. The working standard solution (40 µg/mL) was also obtained by the dilution of the stock solution in mobile phase.

For the sample solution, a quantity equivalent of 10 mg levodopa was transferred to a 50 mL volumetric flask, and then it was added 15 mL of mobile phase, followed by 20 minutes in ultrasonic bath and 20 minutes in mechanical shaker. After that, the volume was completed with mobile phase and an aliquot of 2 mL of this solution was diluted in a 10 mL volumetric flask to give a final concentration of 40 µg/mL. Both microparticles and standard solutions were then filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore®) prior to the injection.

The stability of both solutions in closed vial was verified for 15 h at room temperature.

2.5 Validation procedure

The method was validated for specificity, linearity, detection and quantification limits, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, robustness and system suitability.

2.5.1 Specificity

The interference of the excipients was evaluated by comparing the chromatograms obtained from the microparticles and the standard solution with those obtained from excipients (chitosan, HPMC and hyaluronic acid). Forced degradation studies were also performed to provide an indication of the method stability and specificity [30,31].

The accelerated degradation conditions applied were: UV-A and UV-C light, thermal stress (dry heat), acid, basic and oxidant media for both levodopa reference standard and levodopa microparticles solutions. Samples were analyzed against a freshly prepared control sample (with no degradation treatment) and under light protection. Excipient solutions were submitted to the same degradation conditions in order to demonstrate no interference.

Effect of UV-A and UV-C light: 0.5 mL of a solution containing 1 mg/mL of levodopa in mobile phase was placed in a closed 1 cm quartz cell. The cells were exposed to a UV chambers (100 x 18 x 17 cm) with internal mirrors and UV fluorescent lamps, one emitting radiation at 352 nm (UV-A) and the other at 254 nm (UV-C). The same procedure was done for the control sample simultaneously, which was wrapped in aluminum foil in order to protect from light. After the degradation treatment, the samples were diluted to 40 µg/mL with mobile phase and immediately analyzed.

Effect of thermal stress: the stock solutions (1 mg/mL) were prepared in mobile phase and kept for 7 days at 60 °C in closed test tubes. A 2.0 mL aliquot of this solution was diluted in mobile phase to a final concentration of 40 µg/mL.

Effect of acid hydrolysis: the samples were dissolved in mobile phase (1 mg/mL) and an aliquot of this solution was diluted in HCl 0.1 M (0.2 mg/mL) , allowed to react for 4 days, neutralized with NaOH 0.01 M and diluted in mobile phase to a final concentration of 40 µg/mL.

Effect of alkaline hydrolysis: 20 mL of the stock solution (1 mg/mL) was transferred to a 100 mL volumetric flask and the volume was completed with NaOH 0.005 M. After 30 minutes, one aliquot of the solution was neutralized with HCl 0.005 M and diluted with mobile phase until the final concentration of 40 µg/mL.

Effect of oxidation: initial studies were performed in 3% H₂O₂ at room temperature for 48 h. Subsequently, the drug was exposed to 10% H₂O₂ for a period of 60 h at room temperature, but no degradation was observed. Finally, samples were dissolved in mobile phase (1 mg/mL) and 5 mL of this solution was transferred to a volumetric flask, where hydrogen peroxide solution (30%) was added (0.2 mg/mL). After 48 hours the solution was diluted until the final concentration of 40 µg/mL, filtered and analyzed.

2.5.2 Linearity

To test linearity, standard plots were constructed with six concentrations in the range of 10-60 µg/mL of the drug prepared in triplicates. The linearity was evaluated by linear regression analysis that was calculated by the least square regression and by variance analysis (ANOVA) for compliance of the linear model.

2.5.3 Quantification and detection limits

The quantification (LOQ) and detection (LOD) limits were obtained based on signal-to-noise approach. The background noise was obtained after injection of the blank, observed over a distance equal to 20 times the width at half-height of the peak in a chromatogram obtained by the injection of 40 µg/mL of the reference standard [32,33]. The signal-to-noise ratio applied was 10:1 for the LOQ and 3:1 for the LOD. The results were verified experimentally.

2.5.4 Precision

The precision determination was done by analyzing six sample solutions of levodopa microparticles in the same day for intra-day precision (repeatability) and on three different days for inter-day precision (intermediate precision). The relative standard deviation (RSD %) was determined.

2.5.5 Accuracy

The accuracy was determined by the recovery of known amounts of levodopa reference standard added to the placebo solution. The added levels were 75, 100 and 125% of the nominal drug concentration (40 µg/mL). The results were expressed as the percentage of levodopa reference standard recovered.

2.5.6 Robustness

The robustness of the analytical method was performed in order to evaluate the susceptibility of measurements due to deliberate variations in analytical conditions. It

was determined by analyzing the standard and sample solutions with the following deliberate changes to the chromatographic conditions: column temperature ± 5 °C, flow rate ± 0.2 mL/min, mobile phase pH ± 0.2 unit variation and column of a different serial number .

2.5.7 System suitability

The system suitability was verified through the evaluation of the obtained parameters for the standard solution, such as theoretical plates, peak asymmetry, resolution and retention factor, verified in different days of the method validation. The injection precision was calculated according to US Pharmacopeia [34] and the resolution between the drug and the main photodegradation product was calculated by the LC software.

2.6 Levodopa photodegradation kinetics

The photodegradation kinetics was carried out with quartz cells containing 0.5 mL of levodopa in mobile phase at a concentration of 0.1 mg/mL exposed to UV-C radiation (254 nm). The experiment conditions for the drug irradiation were the same described for the specificity analysis under UV light in section 2.5.1. At pre-established times (0, 12, 24, 48 and 72 hours), the solutions (n=3) were diluted in mobile phase to achieve the final theoretical concentration of 40 μ g/mL. These solutions were protected from light and analyzed by LC, employing the validated method.

In order to evaluate the contribution of thermally induced degradation, protected samples prepared from the standard and the levodopa microparticles were wrapped in

aluminum foil and exposed to the same conditions described above. They were kept in the chamber until the withdrawn of the last samples and analyzed. In addition, the temperature inside the chamber was controlled during the experiment in both cases.

The levodopa photodegradation kinetic rate was determined by plotting the drug concentration (zero-order process), the log (first-order process) and the reciprocal (second-order process) concentration versus time. The determination coefficients (R^2) were obtained and the best observed fit indicated the reaction order. The kinetic parameters such as apparent order degradation rate constant (k), half-life ($t_{0.5}$) and t_{90} (i.e. time were 90% of original concentration of the drug is left unchanged) were calculated. Each experiment was done in triplicate (analysis by LC method).

3. Results and Discussion

3.1 Validation of LC method

First studies were done using levodopa and levodopa tablets LC assay described in US Pharmacopeia [34]. However, the results of system suitability parameters were not adequate and levodopa peak presented an asymmetry due to the high concentration of the standard solution proposed in the assay (0.4 mg/mL). Then, a new method was developed and validated to quantify levodopa in the microparticles formulation.

The new method developed showed adequate system suitability parameters. The analysis of the levodopa reference standard solution evaluated at each day presented the approximate results: 16.259 theoretical plates, 7.34 resolution between the drug and

the main degradation product, 0.85 peak asymmetry or tailing factor and 2.04 for the retention factor. The levodopa RSD area peak of six injections was 0.05%, demonstrating the injection repeatability. The obtained results establish that the LC system and procedure are capable of providing data of acceptance quality [35,36].

Besides that, a stability test was performed with two solutions: one of them containing the reference standard and the other containing the levodopa microparticles, both in mobile phase and prepared according to section 2.4. After 15 h of analysis there was no significant alteration in the measured areas.

3.1.1 Specificity

Placebo injections were performed to demonstrate the absence of excipients components interference with levodopa elution. The results showed that LC method did not suffer interference by the formulation excipients, since there was not another peak in the same retention time of levodopa, as presented in Fig. 2.

The samples solutions (levodopa microparticles and standard reference) were submitted to different stress conditions to induce degradation. Initially, samples were exposed to UV-A radiation but no degradation was observed. Therefore, samples were exposed to UV-C radiation, and after 4 hours the samples exhibited an area decrease of 13.71% (levodopa microparticles) and 9.98% for reference standard. Only after 72 hours of UV-C light exposure a product degradation peak appeared at a retention time of 5.23 minutes corresponding to 22.53% of levodopa area peak, other small peaks also appeared around 3 and 4 minutes, as shown in Fig. 2. These samples presented an area decrease of 70.08% for levodopa microparticles and 57.78% for reference standard

in 6.7 min. The results obtained in this preliminary stability study shows that levodopa is susceptible to the photodegradation. Probably, the higher degradation of the formulation samples should be caused by the excipients.

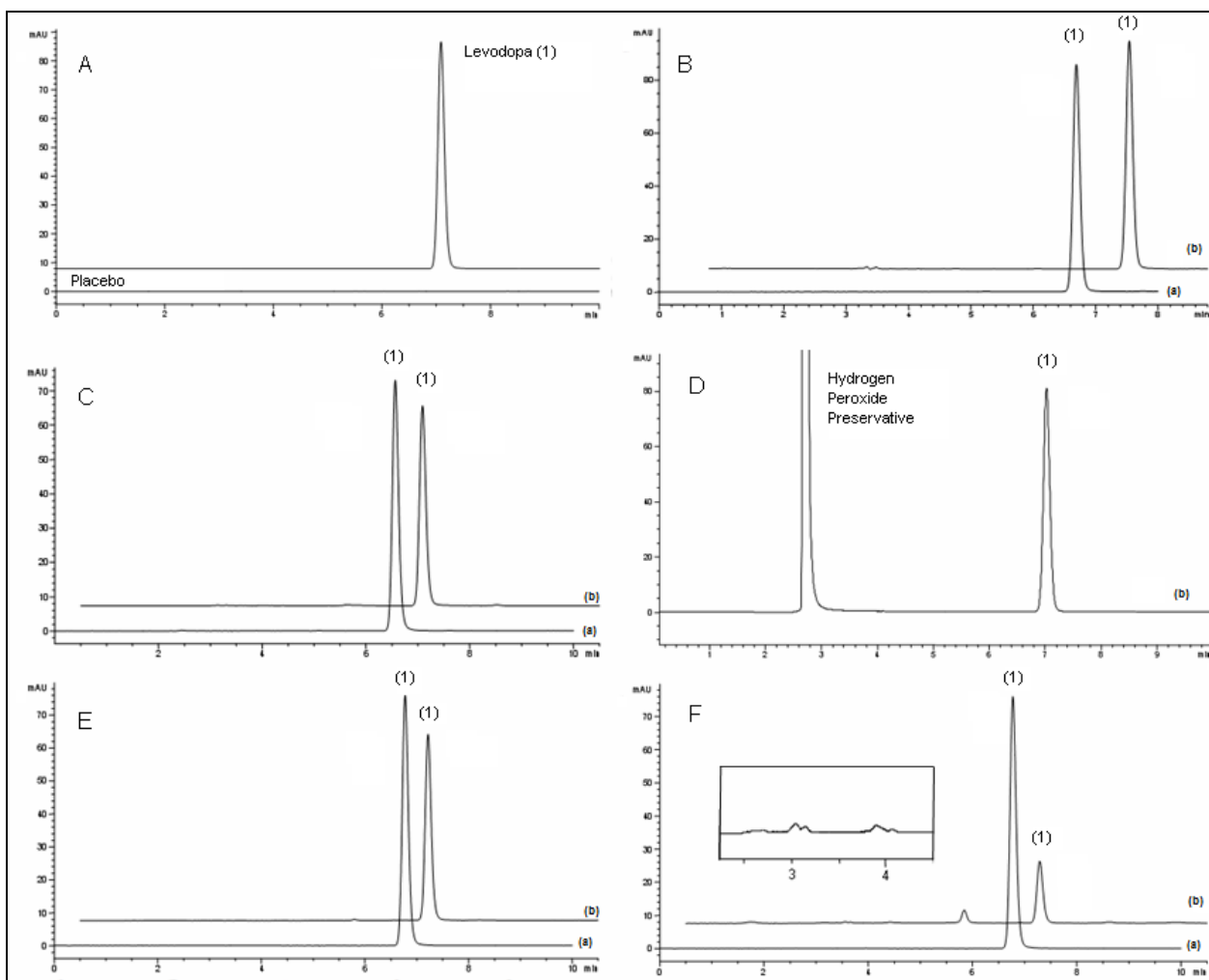


Fig. 2. Chromatograms obtained during specificity study: (A) formulation excipients and reference substance ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$); (B) (a) acid hydrolysis (HCl 0.1 M) and (b) acid hydrolysis (HCl 0.1 M) after 4 days; (C) (a) basic hydrolysis (0.01 M NaOH) and (b) basic hydrolysis (0.01 M NaOH) after 30 min; (D) oxidative degradation (30% H_2O_2) after 48h; (E) (a) dry heat 60°C and (b) dry heat 60°C for 7 days; (F) (a) photodegradation (UVC) and (b) photodegradation (UVC) after 72h.

When submitted to 60 °C for 7 days, the samples showed an area reduction of 21.83% and 24.23% for the reference standard and levodopa microparticles solution, respectively.

The alkaline degradation in 0.005 M NaOH presented an instantaneous degradation that could be seen as the formation of a yellow color in the solution, which increased along the exposure time. After 30 minutes, it was observed that 15.83% of the drug degraded in the levodopa microparticles and 14.90% in the reference standard solution, but there was no corresponding formation of degradation products as compared to the drug standard solution without degradation.

Under the acid conditions exposed, HCl 0.1 M for 4 days, the samples remained stable. In a study published by Kankkunen *et al.* [37], at pH 10.0 the oxidation of levodopa was fast. At pH 7.4 the oxidation was a slower process than at pH 10.0. As presumed, even after 50 h in the more acidic solutions (pH 2.0 or 4.0), levodopa remained almost completely in an unoxidized form. When levodopa is oxidized, the hydrogen atoms come off and, therefore, in an acidic environment the oxidation of levodopa is hindered.

The drug was found to be stable in 3% H₂O₂ for 48 h and in 10% H₂O₂ for 60 h at room temperature. After 48 hours in oxidation media, H₂O₂ 30%, it remained 93.44% of levodopa in the levodopa microparticles and 98.45% in the standard solution. This higher degradation in sample solution can be due to the action of one or more excipient ingredients that facilitate the degradation reaction.

The structure of levodopa is similar to hydroquinone structure (double-OH-substituted aromatic ring). Hydroquinones can be oxidized to quinones which involve a

two-one electron transfer step [38]. The oxidation process proceeds with very mild oxidizing agents, such as Ag^+ or Fe^{+3} present, e.g. in moisture or water. The oxidation of levodopa can be observed also visually, because the hydroquinones are colorless and the quinones are colored [37].

For most degradation conditions no degradation peaks were detected. Such a situation can either arise due to the formation of non-chromophoric products or due to decomposition of drug to low molecular weight fractions [31]. The chromatographic peak purity tool was applied to all levodopa peaks, and demonstrated that they were pure in all cases, confirming the absence of other substance coeluting in the same retention time. Since the main peak of levodopa was not found attributable to any other substance, the method proves to be a stability indication.

3.1.2 Linearity, LOD and LOQ

The method demonstrated to be linear in the concentration range of 10 – 60 $\mu\text{g/mL}$, with a correlation coefficient of 0.9999. The slope and the intercept obtained from the three standard curves analyzed together were 16.0643 and 0.3634, respectively. The analysis of variance revealed that the obtained results correspond to a linear regression and showed no-significative linearity deviation ($\alpha=5\%$). Regarding the intercept, it was not significantly different from the theoretical zero value, therefore, there is no interference on the validation [32]. LOQ and LOD were 208.0 and 46.8 ng/mL , respectively.

3.1.3 Precision

Repeatability and intermediate precision results are expressed as relative standard deviations (RSD %). The results are presented in Table 1 for both the repeatability and the intermediate precision. The variability of the results was low with RSD % values less than 2% to intra-day and 0.28% to inter-day, indicating the precision of the developed method.

Table 1
Precision studies.

	Intra-day precision (%)	RSD (%)
Day 1	101.19	0.27
Day 2	100.80	1.01
Day 3	101.50	0.61
	Inter-day precision (%)	RSD (%)
	101.16	0.28

3.1.4 Accuracy

The data for accuracy was expressed in terms of levodopa percentage recoveries from the known quantities added to the placebo solution. For each level of levodopa concentration three determinations were performed. These results are summarized in Table 2. The mean recovery data were within the range of 100.01 to 100.93% and the mean RSD % was 0.23, satisfying the acceptance criteria for the study.

Table 2
Recovery studies of levodopa (n=9).

Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean recovery (%) \pm RSD (%)
30	100.22 \pm 0.11
40	100.41 \pm 0.47
50	100.32 \pm 0.11

3.1.5 Robustness

The calculated response factors of the peaks of interest and the performance of the chromatographic system were not influenced by the modified operational parameters.

3.2 Levodopa photodegradation kinetics

In this study, the levodopa kinetics photodegradation was carried out through the employment of stress conditions. The exposure to light was found to be an important adverse stability factor. The LC method was used to the determination of the drug in the degraded samples. The levodopa photodegradation profile was evaluated at different time intervals. The effect of light on the residual concentration of levodopa in degraded samples is shown in Table 3. It was observed that around 30% of the drug degraded in the microparticles solution after 12 hours of light exposure; however, there was no corresponding formation of degradation products. The solutions developed a yellow color, which increased along the exposure time. The temperature inside the chamber was always below 32 °C. The chromatograms of the placebo solutions did not present any peak. Therefore, there is no influence of the excipients in the determination of the kinetics of photodegradation of this drug.

Table 3

The effect of light on the residual concentration of levodopa in degraded samples: (A) levodopa reference standard solution and (B) levodopa microparticles.

Time (h)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$) (A)	Drug content (%) (A)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$) (B)	Drug content (%) (B)
0	40.00	100.00	40.00	100.00
6	33.25	88.12	33.13	82.82
12	29.98	74.94	29.78	74.45
24	27.06	67.65	25.27	63.18
48	21.40	53.51	15.08	37.53
72	16.89	42.22	12.02	29.92

The photodegradation kinetics was calculated through the decrease in drug concentration by the time. The drug remaining concentration was calculated at each time interval for the three replicates in comparison with the mean concentration of the standard solution.

Through the evaluation of the determination coefficients obtained by plotting the drug concentration (zero-order process), the log (first-order process) and the reciprocal (second-order process) concentration versus time, the degradation of levodopa in mobile phase solutions could be better described as second order kinetic for both the reference standard solution and the formulation, under the applied experimental conditions. Therefore, the degradation speed is proportional to either the concentration of a reactant squared, or the product of concentrations of two reactants [39]. The obtained degradation rate constants (k), half-life ($t_{0.5}$) and t_{90} are described in Table 4.

Table 4

Degradation rate constant (k), half-life ($t_{0.5}$) and t_{90} of levodopa and levodopa microparticles solutions.

	k ($\text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L}$)	$t_{0.5}$ (h)	t_{90} (h)
Levodopa reference standard solution	0.000453	55.16	6.13
Levodopa microparticles solution	0.000838	29.84	3.32

4. Conclusion

A stability-indicating LC method was developed and validated to evaluate the performance of the microparticles containing levodopa. The validation parameters revealed that accuracy, intermediate precision and repeatability are within the general ranges for acceptance. The LC method proposed was also simple, fast, linear, robust and specific and it is a powerful tool to investigate chemical stability of levodopa and levodopa microparticles. The validated method can be successfully applied for the analyses of raw material and for the novel formulation developed, as well as for protocols of levodopa stability study.

The method applicability to stability studies was proved through the evaluation of the main factors that affect the drug content in solution and through the levodopa degradation kinetics in mobile phase solution exposed to UV-C light. Both solutions of levodopa, reference standard and formulation, were stable to acid condition. Mild degradation of the drug occurred in oxidative stress. Levodopa was found to degrade significantly in alkaline condition, thermal exposure and in the presence of light. The drug kinetics photodegradation was also determined and follows second order reaction kinetics, establishing that its speed is dependent on two factors.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Brazil) for the financial support and Colorcon for the provision of HPMC.

References

- [1] T. Simuni, K.E. Lyons, R. Pahma, R.A. Hauser, C. Comella, L. Elmer, D. Weintraub, Treatment of Early Parkinson's Disease Part 2, *Eur. Neurol.* 61 (2009) 206-215.
- [2] B.S. Shastri, Parkinson disease: etiology, pathogenesis, and future of gene therapy, *Neurosci. Res.* 41 (2001) 5-12.
- [3] J. Goole, K. Amighi, Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease: An overview, *Int. J. Pharm.* 380 (2009) 1-15.
- [4] S. Fahn, Levodopa in the treatment of Parkinson's disease, *J. Neural. Transm.* 71 (2006) 1-15.
- [5] D. Nyholm, Pharmacokinetic Optimization in the Treatment of Parkinson's Disease: An update, *Clin. Pharmacokinet.* 45 (2006) 109-136.
- [6] L.C. Seeberger, R.A. Hauser, Optimizing bioavailability in the treatment of Parkinson's disease, *Neuropharm.* 53 (2007) 791-800.
- [7] M. Murata, Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. D.* 15 (2009) S17-S20.
- [8] P.A. LeWitt, Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. *Parkinsonism Relat. D.* 15 (2009), S31-S34.
- [9] M. Yokochi, Reevaluation of levodopa therapy for the treatment of advanced Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. D.* 15 (2009) S25-S30.
- [10] T. Simuni, K.E. Lyons, R. Pahma, R.A. Hauser, C. Comella, L. Elmer, D. Weintraub, Treatment of Early Parkinson's Disease Part 1, *Eur. Neurol.* 61 (2009) 193-205.
- [11] V. Puente, O. De Fabregues, C. Oliveras, G. Ribera, C. Pont-Sunyer, R. Vivanco, G. Cucurella, E. Giralt, T. Delgado, C. Garcia, A. Seoane, R. Campo, Eighteen month

study of continuous intraduodenal levodopa infusion in patients with advanced Parkinson's disease: Impact on control of fluctuations and quality of life, *Parkinsonism Relat. D.* 16 (2010) 218-221.

[12] N. Ngwuluka, V. Pillay, L.C.D Toit, V. Ndesendo, Y. Choonara, D.M., Naidoo, Levodopa delivery systems: advancements in delivery of the gold standard, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 203-224.

[13] T.K. Kim, W. Kang, I.K. Chun, S.Y. Oh, Y.H. Lee, H.S. Gwak, Pharmacokinetic evaluation and modeling of formulated levodopa intranasal delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38 (2009), 525-532.

[14] K.K. Jain, Drug delivery systems – an overview, *Methods Mol. Biol.* 437 (2008) 1-50.

[15] R.T. Bartus, D. Emerich, P. Belt-Snodgrass, K. FU, H.S. Brenhouse, D. Lafreniere, L. Novak, T. Cooper, A.S. Basile, A pulmonary formulation of L-dopa enhances its effectiveness in a rat model of Parkinson's disease, *J. Pharm. Exp. Ther.* 310 (2004) 828-835.

[16] R.O. Cook, R.K. Pannu, I.W. Kellaway, Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery, *J. Control. Release* 104 (2005) 79-90.

[17] T.P. Learoyd, J.L. Burrows, E. French, P. Seville, Modified release of beclometasone dipropionate from chitosan-based spray-dried respirable powders, *Powder Tech.* 187 (2008) 231-238.

[18] S.T. Lim, G.P. Martin, D.J. Berry, M.B. Brown, Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan, *J. Control. Release* 66 (2000) 281-292.

- [19] N. Sivadas, D. O'Rourke, A. Tobin, V. Buckley, Z. Ramtoola, J.G. Kelly, A.J. Hickey, S.A. Cryan, A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins, *Int. J. Pharm.* 358 (2008) 59-167.
- [20] S.M. Hwang, D.D. Kim, S.J. Chung, C.K. Shim, Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis, *J. Control. Release* 129 (2008) 100-106.
- [21] S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations, *Polym. Mater. Sci. Eng.* 59 (1988) 897–901.
- [22] J. Knapczyk, L. Krowczynski, J. Krzek, M. Brzeski, E. Nurnberg, O. Schnek, H. Struszyk, Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications, in: G. Skak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford (Eds.), *Chitin and Chitosan: Sources Chem. Biochem. Phys. Prop. Appl.* (1989) 657-663.
- [23] S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, Chitosan: a bio-compatible material for oral and intravenous administration, *Prog. Biomed. Polym.* (1990) 283-289.
- [24] M. Dornish, A. Hagen, E. Hansson, C. Peucheur, F. Vedier, O. Skaugrud, Safety of Protasan™: Ultrapure chitosan salts for biomedical and pharmaceutical use. In: Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K.M. (Eds.), *Adv. Chitin Sci.* (1997) 664–670.
- [25] H. Steckel, N. Rasenack, P. Villax, B.W. Müller, In vitro characterization of jet-milled and in-situ-micronized fluticasone-17-propionate, *Int. J. Pharm.* 258 (2003) 65-75.
- [26] G. Colombo, C. Terzano, A. Petroianni, A. Ricci, F. Buttini, Methacholine dry powder inhaler as a new tool for bronchial challenge test, *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 165-171.

- [27] J.B. Kafil, B.S. Dhingra, Stability-indicating method for the determination of levodopa, levodopa-carbidopa and related impurities, *J. Chromatogr. A* 667 (1994) 175-181.
- [28] W. Shihong, J. Weizhe, C. Yong, H. Xingzhen, W. Yi, L. Jianfeng, Experimental study on forced degradation of levodopa, *Zhongguo Yaoye* 17 (2008), 20-21.
- [29] International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, stability testing of new drug substance and products, Q1A (R2), 2003.
- [30] International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), step 4 2005.
- [31] M. Bakshi, S. Singh, S., Development of validated stability-indicating assay methods: critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1011-1040.
- [32] G.P. Carr, J.C. Wahlich, A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (1990) 613 – 618.
- [33] Ermer, J., Burgess, C., Detection and Quantification Limit. in: J. Ermer, J.H.McB. Miller (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, Weinheim, 2005, pp. 101-119.
- [34] United States Pharmacopeia 32, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2009.
- [35] US Food and Drug Administration, Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.

- [36] G.A. Shabir, Validation of high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the difference and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 56–66.
- [37] T. Kankkunen, I. Huupponen, K. Lahtinen, M. Sundell, K. Ekman, K. Kontturi, J. Hirvonen, Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 273-280.
- [38] S.W. Hovorka, C. Schöneich, Oxidative degradation of pharmaceuticals: Theory, mechanisms and inhibition, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 253–269.
- [39] N.E.S. Nudelman, *Estabilidad de Medicamentos*, 1st ed., El Ateneo, Buenos Aires, 1975, 5-22.

A literatura apresenta estudos empregando ácido hialurônico, hidroxipropilmetilcelulose e quitosana no desenvolvimento de formulações para a via pulmonar (GRENHA *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2008; LEAROYD *et al.*, 2008; SIVADAS *et al.*, 2008). Diversos trabalhos mostram as vantagens do uso destes polímeros como carreadores de fármacos, especialmente pelo aumento da absorção pulmonar, devido à atividade mucoadesiva que proporciona um atraso na depuração mucociliar (SAKAGAMI *et al.*, 2001). Além disso, são biodegradáveis, biocompatíveis, não-imunogênicos e não-tóxicos, podendo ser considerados promissores excipientes para esta via (OH *et al.*, 2010). No entanto, não foram encontrados trabalhos utilizando estes três polímeros em conjunto. Outros adjuvantes como leucina, hidroxipropilcelulose (HPC), gelatina, alginato, albumina, poli (DL-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) também têm sido foco de estudos para esta via (HUANG *et al.*, 2002; COOK *et al.*, 2005; SIVADAS *et al.*, 2008).

Inicialmente, testou-se a possibilidade de preparação da formulação em uma única etapa de secagem, contudo, devido à incompatibilidade do ácido hialurônico (aniônico) e da quitosana (catiônica) em solução, realizou-se o processo de secagem por aspersão em duas etapas. Muzzarelli e colaboradores (2004) produziram microesferas de quitosana e ácido hialurônico em uma única etapa por spray-drying, em solução alcalina. Entretanto, nesta condição ocorreria degradação da levodopa, a qual é instável em meio alcalino. Além disso, foram utilizados reagentes para a preparação de um sal de quitosana que seriam inviáveis para a via pulmonar.

Após esta etapa de incorporação dos excipientes em solução, diversos testes pilotos foram efetuados para o ajuste da formulação, incluindo a redução da temperatura de secagem de 150 °C para 120 °C, alterações na pressão do equipamento, fluxo de alimentação, concentração de fármaco e polímeros.

Primeiramente, foram selecionadas as formulações que apresentaram teor adequado (entre 90 e 110%). O segundo aspecto considerado foi o diâmetro aerodinâmico, formulações com resultados superiores a 5 µm foram excluídas, devido ao fato de ser um critério fundamental para deposição na via pulmonar. Após os ajustes realizados na formulação, a amostra que apresentou resultados satisfatórios foi

caracterizada quanto ao teor de umidade, morfologia por microscopia eletrônica de varredura, tamanho de partícula e distribuição granulométrica por difratometria a laser.

Na avaliação morfológica observou-se algumas partículas de superfície lisa e sem poros. A presença de concavidades pode ser devido à ação de capilaridade da superfície seca das partículas no momento da extração do líquido para o exterior que acontece uniformemente ao redor da gotícula, criando uma pressão interna sub-atmosférica, resultando em partículas colabadas. Além disso, pode-se atribuir o fato ao impacto das partículas úmidas na parede da câmara de secagem (WALTON, 2000).

A determinação das interações entre os constituintes da formulação foi analisada por calorimetria exploratória diferencial. Os resultados obtidos por esta análise sugeriram que o fármaco encontrava-se encapsulado.

Com a finalidade de complementar esta primeira fase do trabalho, foi realizado um estudo de toxicidade pulmonar da formulação em ratos pela técnica de lavagem bronco-alveolar. Após a análise estatística (Student-Newman-Keuls, $\alpha=5\%$), a formulação apresentou-se igual ao controle negativo e significativamente diferente do controle positivo. Para fins de comparação, realizou-se, também, o estudo com levodopa pó, o qual apresentou resultados semelhantes ao controle positivo. Demonstrando assim, que a formulação exerceu um efeito protetor aos danos causados pelo fármaco e não provocou efeito prejudicial ao trato respiratório inferior.

Portanto, os resultados obtidos nesta fase demonstraram a aplicabilidade destas micropartículas para a via pulmonar, embora estudos complementares ainda sejam necessários para garantir a eficácia e segurança da formulação.

Na etapa seguinte (Capítulo II), foi realizada a validação do método analítico, estudos de degradação forçada e a determinação da cinética de degradação em condições fotolíticas.

Na literatura, constam diversos métodos analíticos por CLAE para detecção da levodopa em plasma e outros fluídos biológicos (WIKBERG, 1991; WU, 2000; MUZZI *et al.*, 2008), entretanto apenas dois estudos foram encontrados para matéria prima. Um método indicativo de estabilidade para determinação de levodopa e levodopa-carbidopa publicado por Kafil e Dhingra (1994) avalia somente a degradação da solução do fármaco em temperatura ambiente por 24 h. O segundo trabalho publicado por Shihong

e colaboradores (2008), avalia o fármaco em condições de degradação forçada por ácido, base, oxidação, calor e luz, está redigido em língua chinesa.

Na Farmacopéia Americana encontra-se descrita a monografia da levodopa para matéria-prima e comprimidos, utilizando pH e fase móvel diferentes do método desenvolvido. A partir de 2008, a Farmacopéia Britânica também descreve um método para levodopa matéria-prima.

Estudos preliminares foram realizados utilizando o método descrito na Farmacopéia Americana (USP, 2009) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para levodopa matéria prima e comprimidos. Entretanto, o resultado de adequabilidade do sistema para a simetria do pico demonstrou-se inadequado, provavelmente devido à alta concentração de levodopa proposta pelo método farmacopéico (0,4 mg/mL). Assim sendo, desenvolveu-se e validou-se novo método analítico alterando pH, fase móvel e concentração de trabalho para quantificar o fármaco nas formulações de micropartículas. O método demonstrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto. A validação do método por CLAE permitiu a determinação qualitativa e quantitativa da substância ativa de uma maneira rápida e eficiente.

Os estudos de degradação forçada, com a solução de amostra e padrão de levodopa, foram realizados a fim de determinar a especificidade do método, proporcionando a validação de um método indicativo de estabilidade. Os resultados obtidos nos ensaios de degradação demonstraram a instabilidade da levodopa em condições fotolíticas e alcalinas.

Contudo, para definir a ordem e a velocidade de reação são necessários estudos de cinética química, os quais podem ser classificados em reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (LACHMAN *et al.*, 2001). A determinação da cinética de degradação, em condições fotolíticas, definida como segunda ordem possibilitou prever o grau de transformação ocorrido durante o período do estudo. A velocidade de degradação do fármaco em solução permitiu detectar a labilidade da formulação em condições fotolíticas, informação importante para a produção, controle de qualidade e armazenamento da formulação.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O desenvolvimento de pós de levodopa para liberação pulmonar, preparados por secagem por aspersão, usando ácido hialurônico, HPMC (Methocel E3[®]) e quitosana como adjuvantes, permitiu a obtenção de formulações com boas propriedades aerodinâmicas devido ao reduzido diâmetro aerodinâmico e à baixa densidade de compactação das formulações;
- A eficiência de encapsulação foi de aproximadamente 98%. Os diâmetros médios das micropartículas apresentaram valores entre 15,2 e 16,2 μm com SPAN em torno de 2. A análise da morfologia das partículas, através de microscopia eletrônica de varredura, mostrou que a formulação apresentou formato arredondado, estrutura oca, superfície lisa, com várias concavidades na mesma partícula e algumas partículas colapsadas;
- O emprego em conjunto do ácido hialurônico, HPMC e quitosana apresentou resultados positivos e mostrou a aplicação inédita destes polímeros em formulações;
- A densidade de compactação apresentou valores entre 0,06 e 0,08 g/cm^3 e diâmetro aerodinâmico inferior a 5 μm , ideal para a deposição das partículas nas regiões mais profundas do trato respiratório;
- A avaliação da toxicidade pulmonar das micropartículas contendo levodopa mostrou que a administração intratraqueal da formulação não causou toxicidade aguda em ratos. Os indicadores de toxicidade desidrogenase láctica, albumina, fosfatase alcalina e proteínas totais para estes grupos foram significativamente menores que o controle-positivo e apresentaram níveis similares ao controle-negativo. Desta forma, os resultados sugerem que a administração pulmonar poderia ser uma nova e promissora via de administração para este fármaco;

- O método por CLAE indicativo de estabilidade demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto, ou seja, adequado para o controle de qualidade da formulação e quantificação de levodopa nas micropartículas;
- A degradação da amostra de micropartículas contendo levodopa, em condições fotolíticas, obedeceu a uma cinética de segunda ordem, ou seja, a velocidade de reação é dependente de dois fatores. A velocidade de reação é proporcional a concentração de dois reagentes ou a segunda potência de um deles.

8. REFERÊNCIAS

AHSAN, F.; RIVAS, I.P.; KHAN, M.A.; SUAREZ-TORRES, A. I. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 29–40, 2002.

AKHATAR, S.; LEWIS, K. J. Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 57–67, 1997.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARTUS, R. T.; EMERICH, D.; BELT-SNODGRASS, P.; FU, K.; BREHOUSE, H.S.; LAFRENIERE, D.; NOVAK, L.; COOPER, T.; BASILE, A.S. A pulmonary formulation of L-dopa enhances its effectiveness in a rat model of Parkinson's disease. **Journal of Pharmacology Experiments and Therapy**, p. 828-835, 2004.

BENEDETTI, L. M. New biomaterials from hyaluronic acid. **Medical Device Technology**, v. 5, n. 9, p. 32-37, 1994.

BILLON, A.; BATAILLE, B.; CASSANAS, G.; JACOB, M. Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1-2, p. 159-168, 2000.

BORCHARD, G.; LUEBEN, H. L.; DE BOER, A. G.; VERHOEF, J. C.; LEHR, C. M.; JUGINGER, H. E. The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 39, p. 131–138, 1996.

BOSQUILLON, C.; LOMBRY, C.; PREAT, V.; VANBEVER, R. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 329-339, 2001.

BOSQUILLON, C.; PREAT, V.; VANBEVER, R. Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats, **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 233–244, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Consulta Pública SAS/MS nº 10, de 04 de novembro de 2002. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença de Parkinson**. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/parkinson_pcdt.pdf>. Acesso em 01.09.2010.

BROWN, R. A.; SHANKER, L. S. Absorption of aerosolized drugs from the rat lung. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 11, n. 4, p. 355-360, 1983.

CLARK, A. Formulation of proteins and peptides for inhalation. **Drug Delivery Systems and Science**, v. 2, p. 73–77, 2002.

CHOW, A. H. L.; TONG, H. H. Y.; CHATTOPADHYAY, P.; SHEKUNOV, B. Y. Particle engineering for pulmonary drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 3, p. 411-437, 2007.

CONTE, U.; CONTI, B.; GIUNCHEDI, P.; MAGGI, L. Spray-dried polylactide microsphere preparation – influence of the technological parameters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20, n.3, 235-258, 1994.

COURRIER, H.M.; BUTZ, N.; VANDAMME, T.F. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. **Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 425–498, 2002.

CRYAN, S. A.; SIVADAS, N.; GARCIA-CONTRERAS, L. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1133-1151, 2007.

DUSZYK, M. CFTR and lysozyme secretion in human airway epithelial cells. **European Journal of Physiology**, v. 443, p. S45–S49, 2001.

EDWARDS, D. A.; VALENTE, A. X.; MAN, J.; TSAPIS, N. Recent Advances Related to the Systemic Delivery of Therapeutic Molecules by Inhalation. In: **Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology**, 2a ed., Nova York: M. Dekker, 2003.

ESPOSITO, E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmacy**, v.242, p.329-334, 2002.

EVORA, C.; SORIANO, I.; ROGERS, R.A.; SHAKESHEFF, K.M.; HANES, J.; LANGER, R. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. **Journal of Controlled Release**, v. 51, p. 143–1152, 1998.

GEHR, P.; GREEN, F.H.Y.; GEISER, M.; HOF, V.I.; LEE, M.M.; SCHURCH, S. Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. **Journal of Aerosol Medicine**, v. 9, p. 163–181, 1996.

GILANI, K.; NAJAFABADI, A. R.; BARGHI M.; RAFIEE-TEHRANI, M. Aerosolisation of beclomethasone dipropionate using spray dried lactose/polyethylene glycol carriers, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 595–606, 2004.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 25, p. 427-437, 2005.

GOODAMN, L. S.; GILMAN, A. The pharmacological basis of therapeutics, 6th Ed. Macmillan Publishing, New York, USA.

GU, M; OWEN, A. D.; TOFFA, S. E. K. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases . **Journal of the Neurological Sciences**, v. 158, p. 24-29, 1998.

HAUSSEN, S.R.; SCHÖNWALD, S.V. Antiparkinsonianos. In: FUCHS, F.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B. (Ed). **Farmacologia Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 348-359.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLNUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 53-65, 1999.

HENDERSON, R. F.; BENSON, J. M.; HAHN, F. F.; HOBBS, C. H.; JONES, R. K.; MAUDERLY, J. L.; MCCLELLAN, R. O.; PICKRELL, J. A. New approaches for the evaluation of pulmonary toxicity: bronchoalveolar lavage fluid analysis. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 451-458, 1985.

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.

HIRANO, S.; SEINO, H.; AKIYAMA, Y.; NONAKA, I. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. **Polymer Materials Science & Engineering**. v. 59, p. 897-901, 1988.

HWANG, S. M.; KIM, D. D.; CHUNG, S. J.; SHIM, C. K. Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis. **Journal of Controlled Release**, v.129, p. 100-106, 2008.

ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Q2B. Validation of analytical procedures: methodology**, 1996.

ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.

KAFIL, J. B.; DHINGRA, B. S. Stability-indicating method for the determination of levodopa, levodopa-carbidopa and related impurities. *Journal of Chromatography A*, v. 667, p. 175-181, 1994.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; GRIEND, C. S.; BELD, C.; SOMSEN, G. W. DE JONG, G. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-66, 2005.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. Trends in stability testing with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-858, 1999.

KOWAL-BIELECKA, O.; KOWAL, K.; HIGHLAND, K. B.; SILVER, R. M. Bronchoalveolar lavage fluid in scleroderma interstitial lung disease: Technical Aspects and Clinical Correlations. **Arthritis and Rheumatis**, v. 40, n. 1, p. 73-88, 2010.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; GUDMUNDSSON, O.; INGVARSDÓTTIR, K. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 137, p. 159-165, 1996.

KURKURI, M. D.; AMINABHAVI, T. M. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 9– 20, 2004.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588-599, 2003.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2, Cap.26, p. 1277-1355.

LANG, A.E.; OBESO, J.A. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. **The Lancet Neurology**, v.3, n° 5, p. 309-31, 2004.

LEAROYD, T. P.; BURROWS, J. L.; FRENCH, E.; SEVILLE, P. Modified release of beclometasone dipropionate from chitosan-based spray-dried respirable powders. **Powder technology**, v. 187, n. 3, p. 231-238, 2008a.

LEAROYD, T.P.; BURROWS, J.L.; FRENCH, E.; SEVILLE, P. Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p.224-234, 2008b.

LEVINA M.; RAJABI-SIAHBOOMI, A. R. The influence of excipients on drug release from hydroxypropyl methylcellulose matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 11, p. 2746–54, 2004.

LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, p. 43–48, 1992.

LIM, S. T.; MARTIN, G. P.; BERRY, D. J.; BROWN, M. B. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 281-292, 2000.

LIU, J.; FU, H.; WANG, C.; WANG, X.; CHEN, Q.; ZHANG, Q.; HE, QIN.; ZHANG, Z. Solid Lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.356, p.333-344, 2008.

LORENZO-LAMOSA, M. L.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 109-118, 1998.

MANCA, M.L.; MOURTAS, S.; DRACOPOULOS, V.; FADDA, A.M.; ANTIMISIARIS, S.G. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery? A comparative study of particle stability during nebulization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.62, p. 220-231, 2008.

MAKINO, K.; YAMAMOTO, N.; HIGUCHI, K.; HARADA, N.; OHSHIMA, H.; TERADA, H. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. **Colloids and Surfaces**, v. 27, p. 33–39, 2003.

MATTHEWS, B. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.

MEDIFOCUS. Medifocus Guidebook: Parkinson's disease. Disponível em: <http://www.parkinsonsdisease-guidebook.com>. Acesso em 01.07.10.

MUCHMORE, D. B.; GATES, J. R. Inhaled insulin delivery – where are we now? **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 634–642, 2006.

MUZZARELLI, C.; STANIC, V., GOBBI, L., TOSI, G.; MUZZARELLI, R. A. A. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 73–82, 2004.

MUZZI, C.; BERTOCCI, E.; TERZUOLI, L.; PORCELLI, B.; CIARI, L.; PAGANI, R.; GUERRANTI, R. Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and α -methyldopa by HPLC Dossier: Neurological disorders: Clinical challenges and controversies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p. 253-258, 2008.

NAJAFABADI, A.; GILANI, K.; BARGHI M.; RAFIEE-TEHRANI, M. The effect of vehicle on physical properties and aerosolisation behavior of disodium cromoglycate microparticles spray dried alone or with l-leucine, **International Journal of Pharmaceutics**, v.285, p. 97–108, 2004.

NYHOLM, D. Pharmacokinetic optimization in the treatment of Parkinson's disease. An update. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 45, p. 109-136, 2006.

PALMIERI, G. F.; WEHRLE, P.; STAMM, A. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, p. 2859-2879, 1994.

PALMIERI, G., BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P; MARTELLI, S. Spray-Drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. Water-soluble drugs. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 195-204, 2001.

PATTON, J. S.; PLATZ, R. M. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 8, p. 179–196, 1992.

PATTON, J. S.; FISHBURN, C. S.; WEERS, J. G. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, p. 338-344, 2004.

PATTON, J. S. Pulmonary delivery of insulin. **Current Medical Research and Opinion**, v. 22, n. 3, p. s5-s11, 2006.

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

PILCER, G.; VANDERBIST, F.; AMIGHI, K. Correlations between cascade impactor analysis and laser diffraction techniques for the determination of the particle size of aerosolized powder formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 75-81, 2008.

OH, E. J.; PARK, K.; KIM, K. S.; KIM, J.; YANG, J.; KONG, J.; LEE, M. Y.; HOFFMAN, A. S.; HAHN, S. K. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. **Journal of Controlled Release**, n. 141, p. 2–12, 2010.

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

RABBANI, N.R.; SEVILLE, P.C. The influence of formulation components on the aerolisation properties of spray-dried powders. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 130-140, 2005.

RIOS, A.; GORDILLO, M.E.; BOCANEGRA, C.; MALDONADO, J.A. Administracion nasal e inhalatoria. In: Ramos, B.S., Aznar, M.D. (Eds.), **Administración de medicamentos: Teoría y práctica**, p. 131–149, 1994.

ROGRIGUES, M.; CAMPOS, L. C. Estratégias para o tratamento com levodopa na doença de Parkinson. **Revista Analytica**, n. 23, p. 44-51, 2006.

RUDT, S.; MÜLLER, R.H. In vitro phagocytosis of nano- and microparticles by chemiluminescence. Effect of analytical parameters, particle size and particle concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 22, p. 263–272, 1992.

SAKAGAMI, M. *In vivo*, *in vitro* and *ex vivo* models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1030-1060, 2006.

SEEBERGER, L.C.; HAUSER, R.A. Optimizing bioavailability in the treatment of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v.53, p.791-800, 2007.

SCHAPIRA, A. H. V.; COOPER, J. M. Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. **Mutation Research**, v. 275, p. 133-143, 1992.

SCHEUCH, G.; KOHLHAEUFL, M. J.; BRAND, P.; SIEKMEIER, R. Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p.996-1008, 2006.

SETHI, P. D.; CHAREGAONKAR, P. **Identification of drugs in pharmaceutical formulations by Thin-Layer Chromatography**, 2nd ed., CBS Publishers & Distributors, New Dehli, p.253, 1999.

SEVILLE, P. C.; LI, H. Y.; LEAROYD, T. P. Spray-dried powders for pulmonary drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 24, n. 4, p. 307-360, 2007.

SHAM, J. O. H.; ZHANG, Y.; FINLAY, W. H.; ROA, W. H.; LOBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 457-467, 2004.

SHIHONG, W.; WEIZHE, J.; YONG, C.; XINGZHEN, H.; YI, W.; JIANFENG, L. Experimental study on forced degradation of levodopa. *Zhongguo Yaoye*, 17(21), 20-21, 2008.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, p. 29-44, 2007.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WASHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.

SIVADAS, N.; O'ROURKE, D.; TOBIN, A.; BUCKLEY, V.; RAMTOOLA, Z.; KELLY, J. G.; HICKEY, A. J.; CRYAN, S. A. A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 159-167, 2008.

STANDAERT, D.; YOUNG, A. Tratamento dos distúrbios degenerativos do sistema nervoso central. In: Hardman, J.; Limbird, L (Ed). **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapia**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 411-419.

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

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TAYLOR, G.; KELLAWAY, I. Pulmonary drug delivery. In: Hillery, A., Lloyd, A., Swarbrick, J. (Eds.), **Drug Delivery and Targeting**, p. 269–300, 2001.

THE MERCK Index. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologics**. Version 13. New Jersey: Merck & Co. Inc., 2000. Levodopa. CD ROM.

TLIUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1326-1331, 1998.

TURNER, C.; SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and ageing. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 487, p. 229-251, 2001.

USP 32. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, p. 999-1022, 2007.

VON WICHERT, P; SEIFART, C. The lung, an organ for absorption? **Respiration**, v. 72, n. 5, p. 552-558, 2005.

WALLACE, D. C. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? **Science**, v. 256, n. 5057, p. 628-32, 1992.

WALTON, D. E. The morphology of spray-dried particles: a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.

WAN, L. S. C.; HENG, P. W. S.; CHIA, C. G. H. Spray-drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 9, p. 997-1011, 1992.

WIKBERG, T. Simultaneous determination of levodopa, its main metabolites and carbidopa in plasma by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, n. 2, p. 167-176, 1991.

WU, G. The Determination of Levodopa in Plasma by HPLC: a Cautionary Note. **Chromatographia**, v. 52, p. 371-372, 2000.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008118

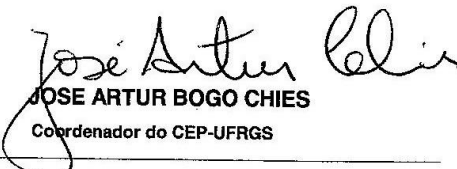
Título : Avaliação da Toxicidade Pulmonar in vivo de Forma Farmacêutica Pó para Inalação Contendo Levodopa

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL	PESQ RESPONSÁVEL	00001341@ufrgs.br	33085218
RÚBIA LAZZARETTI PEREIRA	PESQUISADOR	riperei@yahoo.com.br	
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES	PESQUISADOR	00006741@ufrgs.br	33085218

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 56 , ata nº 136 , de 24/9/2009 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 28 de setembro de 2009


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador do CEP-UFRGS