

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

***DRY POWDERS INHALERS (DPI) OBTIDOS A PARTIR DE
NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO BUDESONIDA:
CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO *IN VIVO* EM MODELO ANIMAL DE ASMA
E DA TOXICIDADE *IN VITRO* EM CULTURA CELULAR***

MANOEL ORTIZ

PORTO ALEGRE, 2016.

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

***DRY POWDERS INHALERS (DPI) OBTIDOS A PARTIR DE
NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO BUDESONIDA:
CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO *IN VIVO* EM MODELO ANIMAL DE ASMA
E DA TOXICIDADE *IN VITRO* EM CULTURA CELULAR***

Tese apresentada por **Manoel Ortiz**
para obtenção do título de doutor em
ciências farmacêuticas.

Orientadora: Prof. ^a Dr. ^a Sílvia S. Guterres

Co-orientadora: Dr. ^a Andressa Bernardi

PORTO ALEGRE, 2016

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada, com voto de louvor, em 19 de Agosto de 2016, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Oliveira Battastini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fabio Klamt

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fabio Sovinco

Università degli Studi di Parma

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky

Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ortiz, Manoel

DRY POWDERS INHALERS (DPI) OBTIDOS A PARTIR DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO BUDESONIDA: CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO IN VIVO EM MODELO ANIMAL DE ASMA E DA TOXICIDADE IN VITRO EM CULTURA CELULAR / Manoel Ortiz. -- 2016.

188 f.

Orientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

Coorientadora: Andressa Bernardi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Nanocapsulas. 2. pulmonary drug delivery. 3. budesonida. I. Guterres, Silvia Stanisçuaski, orient. II. Bernardi, Andressa, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo SNAF – Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos, no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, no Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, e a parte de cultivo celular em Dublin, Irlanda, na Trinity College Dublin (TCD), e contou com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE – CAPES.

À minha mãe, Liliana.

Agradecimentos

À Professora Sílvia Guterres pela oportunidade única concedida nestes 10 anos de laboratório, desde a iniciação científica, mestrado, até a conclusão do doutorado. Por todo o conhecimento compartilhado, compreensão e incentivo costumeiro. Me sinto privilegiado por nunca ter ouvido um “não” dela, seja pedido financeiro ou por uma ideia nova. Com certeza, é uma pessoa diferenciada!

À Doutora Andressa Bernardi pela co-orientação e amizade durante todo esse período de doutorado.

À Professora Adriana Pohlmann por ter aberto as portas do grupo de pesquisa lá em 2006, no início da minha vida científica e por toda a colaboração na produção científica nestes últimos anos.

Ao Professor Carsten Ehrhardt por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, em Dublin no doutorado sanduíche. Por todo o conhecimento e oportunidades disponibilizadas.

Aos colegas do laboratório 405: em especial à Karina Paese e Karine Coradini pela amizade inigualável. Aos colegas da FIOCRUZ: em especial ao Prof. Marco Aurélio Martins, Everton, Diego, Ana Paula e Bia; Aos colegas de Dublin: Stephany Micallef, Sabrina Nickel, Melissa Daily, Michelle Lowry, Sadhbh O’Neil e Caoimhe Clerkin por toda a ajuda e amizade no dia-a-dia.

Em especial: à Denise Jornada por todo conhecimento compartilhado, amizade e companhia em todos esses anos. Ao amigo Frantiescoli Dimer pela amizade dentro e fora do laboratório, por toda a colaboração científica e a produção da nossa patente. Ao amigo Lucas Rigo pela amizade, discussões científicas e parceria nas quartas-feiras de futebol, janta e cerveja gelada.

À Fernanda por tudo. Pela companhia, carinho e dedicação. Pela amizade dourada que tive o prazer de conquistar, pois é uma pessoa que vale a pena estar ao lado.

À minha família pelo suporte costumeiro, por acreditar sempre em mim com a certeza de que o melhor sempre estava sendo feito, em especial à minha mãe e vó que são a base de tudo.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro, no Brasil e na Europa.

Resumo

A asma é definida como uma doença inflamatória crônica de caráter multifatorial, caracterizada pela obstrução reversível das vias aéreas, denso infiltrado inflamatório e hiper-reatividade brônquica a estímulos externos. Clinicamente, a doença é marcada por sintomas episódicos de dispneia, sibilo, tosse seca e sensação de aperto no peito. A terapia convencional da asma compreende o uso de anti-inflamatórios e broncodilatadores. A budesonida é um glicocorticoide esteroide e é dos fármacos mais utilizados na terapêutica da asma. No entanto, a budesonida apresenta baixa biodisponibilidade oral e o uso prolongado pode levar a efeitos adversos graves como afinamento da pele e supressão adrenocortical. No desenvolvimento de novas formulações, a avaliação da toxicidade é de extrema importância. Por conseguinte, o uso de cultura celular é de grande valia no desenvolvimento de protocolos para avaliação da toxicidade de novas formulações. Adicionalmente, a nanotecnologia é uma ferramenta importante para resolver problemas de biodisponibilidade e para contornar efeitos adversos da terapêutica convencional. Desta forma, o objetivo desta tese foi desenvolver um novo sistema nanoestruturado na forma de pó seco para inalação (*Dry powders inhalers* – DPI), obtido por aspensão contendo budesonida encapsulada, visando o tratamento da asma aguda e crônica. Essa proposta foi baseada na obtenção de um sistema pulverulento nanoestruturado com tamanho reduzido e controlado, visando a entrega pulmonar da budesonida. Na etapa de pré-formulação foi realizado um estudo fatorial avaliando diferentes métodos de preparação das nanocápsulas e os adjuvantes de secagem utilizados. As análises de tamanho de partícula, da formulação selecionada (nanocápsulas contendo budesonida e secas por aspensão com leucina) mostraram um tamanho reduzido e adequado para a administração pulmonar (2,7 μm). A morfologia demonstrou que estas partículas possuem um tamanho reduzido, forma esférica e superfície irregular, características importantes para a administração pulmonar. Quando analisada a distribuição pulmonar *in vitro*, em Impactador de Andersen, a formulação apresentou uma fração de partículas finas (*Fine Particle Fraction* – FPF) de 28%. Analisando os resultados dos

experimentos em modelos de asma aguda e crônica induzidos por ovalbumina, os resultados da mecânica respiratória e função pulmonar mostraram uma diminuição na resistência e na elastância pulmonar, quando a budesonida nanoencapsulada foi utilizada, quando comparada com uma formulação comercial de budesonida, nas duas doses utilizadas (0,5 e 1,0 mg/Kg). Esse tratamento com nanocápsulas também mostrou eficiência na redução da inflamação, pela redução do número de leucócitos totais no fluido de lavagem bronco alveolar (*Broncho Alveolar Lavage Fluid* – BALF) e, principalmente, redução significativa no número dos eosinófilos no infiltrado pulmonar. Corroborando esses resultados, a quantificação da eotaxina – 1 e das citocinas pró-inflamatórias foram reduzidas, quando comparadas ao tratamento comercial. A análise histopatológica mostrou que quando o tratamento com as nanocápsulas foi utilizado, a produção de muco foi reduzida, bem como a produção de fibrose sub-epitelial, sugerindo um possível efeito sobre o remodelamento tecidual. Os resultados de toxicidade utilizando linhagem celular epitelial pulmonar (H441) mostrou uma redução na toxicidade da budesonida, quando encapsulada nas nanopartículas, tanto na forma de suspensão como na forma pulverulenta. Essa redução da toxicidade foi de 75% e de 50%, na dose de 100 µg/mL, para a suspensão e para o DPI, respectivamente. O conjunto dos resultados obtidos mostrou a potencial aplicabilidade da budesonida nanoencapsulada para o tratamento da asma, utilizando esse novo sistema DPI.

Palavras-chaves: asma, budesonida, nanocápsulas, *spray-drying*, pós-secos, cultura celular, H441.

Abstract

Asthma is characterized as a chronic inflammatory disease developed by multifactorial aspects such as genetic predisposition and exposure to environmental factors such as pollution, smoke and microorganisms. The conventional asthma therapy comprises the use of bronchodilators and anti-inflammatory. Budesonide is a glucocorticoid and is the most frequently used therapy in the treatment of asthma. However, this drug has low oral bioavailability and long term use may lead to adverse effects such as skin thinning and adrenal suppression. The evaluation of the toxicity of new formulation has critical role in the pharmaceutical development. The use of cell culture experiments can help this aspect. Additionally, nanotechnology is an important tool to solve problems regarding bioavailability and to circumvent adverse effects of conventional therapy. The aim of this work was to develop a nanostructured system as dry powder inhaler (DPI) containing budesonide loaded, obtained by spray-drying, targeting the treatment of acute and chronic asthma. This proposal was based on obtaining a nanostructured powder system with reduced and controlled size, aiming an alternative to treatment of asthma. A factorial study comparing different methods to produce the nanocapsules as well as the type of drying adjuvants was performed. The particle size of the selected formulation was 2.7 μm , an adequate reduced size suitable for pulmonary administration. The morphology of these particles showed a small size, spherical shape and irregular surface. All these characteristics are important for pulmonary administration. When analyzed the in vitro pulmonary distribution of the DPI, using an Andersen Cascade Impactor, showed a fine particle fraction (FPF) of 28%. Analyzing the results of the biological experiments, the mechanical respiratory and pulmonary function showed a decrease in lung elastance and resistance when budesonide was used nanoencapsulated compared with a commercial formulation of budesonide in two doses (0.5 and 1.0 mg / kg). Both treatments also showed nanocapsules efficiency in reduction of inflammation by reducing the total of leukocytes in the bronchial alveolar lavage fluid (BALF) and especially significant reduction in eosinophil infiltration in the lung tissue. Corroborating with these results, the quantification of eotaxin - 1 and proinflammatory cytokines was reduced when

compared to commercial budesonide treatment. Histopathological analysis showed that when treatment with the nanocapsules was used, mucus production was reduced and reversed the phenomena of airway remodeling. The cytotoxicity assay by Alamar blue using the bronchial epithelium cell line (H441) showed a reduction on the toxicity of budesonide when the nanocapsules were used even in suspension or in the DPI. The cytotoxicity reduction were 75 and 50%, at 100 µg/mL, for the suspension and the DPI, respectively. All these results show that budesonide-loaded nanocapsules in dry powder inhaler is a promising approach for the treatment of asthma.

Key words: asthma, budesonide, dry powder inhaler (DPI), nanocapsules, cell culture, H441.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação das trocas gasosas.	34
Figura 2	Sensibilização na asma.	42
Figura 3	Fórmula estrutural da budesonida.	45
Figura 4	Impactador em Cascata de Andersen de 8 estágios.	67
Figura 5	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via úmida) das suspensões de nanocápsulas (volume).	81
Figura 6	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via úmida) das suspensões de nanocápsulas (número).	82
Figura 7	Distribuição de tamanho, por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas (intensidade).	82
Figura 8	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via seca) da formulação BudNC – Lac (volume).	85
Figura 9	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via seca) da formulação BudNC – Lac (número).	85
Figura 10	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via seca) da formulação BudNC – Mal (volume).	86
Figura 11	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via seca) da formulação BudNC – Mal (número).	87
Figura 12	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via seca) da formulação BudNC – Leu (volume).	88
Figura 13	Distribuição de tamanho, por difração de laser (via seca) da formulação BudNC – Leu (número).	88
Figura 14	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação BudNC – Leu, na magnificação de 5000x.	90
Figura 15	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação BudNC – Leu, na magnificação de 10000x.	91
Figura 16	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação BudNC – Leu, na magnificação de 20000x.	92
Figura 17	Curva de calibração da budesonida (n=3).	93
Figura 18	Perfil de distribuição em impactador em cascata de Andersen.	94
Figura 19	Resistência pulmonar (asma aguda).	96

Figura 20	Área sob a curva (AUC) da resistência pulmonar (asma aguda).	98
Figura 21	Elastância pulmonar (asma aguda).	99
Figura 22	Área sob a curva (AUC) da elastância pulmonar (asma aguda).	100
Figura 23	Contagem dos leucócitos totais no BALF (asma aguda).	102
Figura 24	Contagem diferencial das células inflamatórias no BALF. Eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos (asma aguda).	104
	Análise histopatológica de secções pulmonares corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS). Análise da produção de muco.	107
	Análise histopatológica de secções pulmonares corados com Tricômio de Gomori (TG). Análise da fibrose.	109
	Análise histopatológica de secções pulmonares corados com Sirius Red (SR). Análise do infiltrado celular.	111
	Quantificação da quimiocina eotaxina – 1 e citocinas pró-inflamatórias IL-5 e IL-13 e citocina anti-inflamatória IL-10. (asma aguda).	113
Figura 29	Resistência pulmonar (asma crônica).	116
Figura 30	Área sob a curva (AUC) da resistência pulmonar (asma crônica).	117
Figura 31	Elastância pulmonar (asma crônica).	119
Figura 32	Área sob a curva (AUC) da elastância pulmonar (asma crônica).	120
Figura 33	Contagem dos leucócitos totais no BALF (asma crônica).	121
Figura 34	Contagem diferencial das células inflamatórias no BALF. Eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos (asma crônica).	123
Figura 39	Análise histopatológica de secções pulmonares corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS). Análise da produção de muco.	126
	Análise quantitativa da produção de muco	127
	Análise histopatológica de secções pulmonares corados com Tricômio de Gomori (TG). Análise da fibrose.	128
	Análise quantitativa da fibrose sub-epitelial	129
	Quantificação da quimiocina eotaxina – 1 e citocinas pró-inflamatórias IL-5 e IL-13 e citocina anti-inflamatória IL-10. (asma crônica).	130
	Viabilidade celular da linhagem H441 frente à suspensão de nanocápsulas após 4 horas de tratamento.	132

	Viabilidade celular da linhagem H441 frente ao pó redisperso após 4 horas de tratamento.	134
Figura 42	Captação celular utilizando nanocápsulas marcadas com rodamina, na linhagem celular H441	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de secagem para obtenção dos pós-secos a partir de nanocápsulas poliméricas.	65
Tabela 2	Valores de tamanho de partícula e span das formulações desenvolvidas.	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1	Anatomia do sistema respiratório	35
3.2	Via pulmonar	37
3.3	Asma	42
3.4	Nanopartículas: sistemas coloidais e secagem por aspersão destes sistemas	47
3.5	Secagem de sistemas nanoestruturados	49
3.6	Cultura celular: citotoxicidade e captação celular	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	Materiais	61
4.1.1	Matérias-primas	61
4.1.2	Aparelhos e equipamentos	61
4.1.3	Solventes, reagentes e outros materiais	62
4.2	Métodos	63
4.2.1	Estudo fatorial para preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico (BudNC) e obtenção dos pós-secos por aspersão	63
4.2.2	Preparação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico (BudNC)	64
4.2.2.1	Caracterização das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo budesonida (BudNC)	65
4.2.2.2	Análises de tamanho de partícula por difração de laser (LD)	65
4.2.2.3	Análises de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	65
4.2.3	Secagem das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico (BudNC)	66

	Caracterização dos pós-secos (<i>Dry powders inhalers</i> - DPI),	
4.2.3.1	obtidos a partir da secagem por aspersão das suspensões de nanocápsulas	67
4.2.3.2	Rendimento do processo de secagem	67
4.2.3.3	Análise do tamanho de partícula dos pós-secos (DPI) por difração de laser (LD)	68
4.2.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	68
4.2.3.5	Deposição, <i>in vitro</i> , dos pós-secos (DPI) em Impactador em cascata de Andersen	69
4.2.3.6	Quantificação da budesonida nos pós-secos (DPI) por HPLC	70
4.2.4	Avaliação do efeito dos pós-secos (DPI) em modelo animal de asma aguda e crônica	71
4.2.4.1	Animais	71
4.2.4.2	Modelo <i>in vivo</i> de inflamação pulmonar alérgica aguda induzida por ovalbumina	71
4.2.4.3	Modelo <i>in vivo</i> de inflamação pulmonar alérgica crônica induzida por ovalbumina	73
4.2.4.4	Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	74
4.2.4.5	Análise do fluido de lavagem bronco alveolar (BALF)	74
4.2.4.6	Contagem de leucócitos totais e diferencial	74
4.2.4.7	Análise histopatológica	75
4.2.4.8	Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar	75
4.2.4.9	Cultura Celular: H441	76
4.2.4.10	Toxicidade celular: Alamar Blue	77
4.2.4.11	Captação celular	78
4.2.4.12	Análise estatística	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	Estudo fatorial	81
5.2	Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico (BudNC)	82
5.3	Remoção do solvente e/ou secagem das suspensões de nanocápsulas e caracterização dos pós	85

5.3.1	Rendimento do processo de secagem	91
5.3.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	92
5.3.3	Quantificação da budesonida por HPLC	95
5.3.4	Deposição, <i>in vitro</i> , dos pós-secos (DPI) em Impactador em Cascata de Andersen	95
5.4	Modelo <i>in vivo</i> de inflamação pulmonar alérgica aguda induzida por ovalbumina	97
5.4.1	Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	97
5.4.2	Contagem de leucócitos totais e diferencial	103
5.4.3	Análise histopatológica	107
5.4.4	Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar	114
5.5	Modelo <i>in vivo</i> de inflamação pulmonar alérgica crônica induzida por ovalbumina	117
5.5.1	Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	117
5.5.2	Contagem de leucócitos totais e diferencial	123
5.5.3	Análise histopatológica	126
5.5.4	Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar	131
5.5.5	Toxicidade celular (Alamar Blue)	134
5.5.6	Captação celular	137
6	CONCLUSÕES	139
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
8	ANEXOS	157
	Anexo 1: Patente de Processo. Processo one pot de síntese de nanocápsulas poliméricas, seus usos, suas formas secas, composições farmacêuticas de nanocápsulas poliméricas e seus usos	155

1. Introdução

O sistema respiratório compreende os órgãos de conexão entre o meio externo e o organismo para as trocas gasosas. Esse sistema é constituído, basicamente, pelas vias aéreas superiores e inferiores. As vias aéreas superiores são formadas pelo nariz, cavidade oral, laringe e faringe; e as vias aéreas inferiores são formadas pela árvore bronco-traqueal e zona respiratória (alvéolos respiratórios) (1).

A via pulmonar tem sido amplamente estudada nos últimos anos como sendo uma via de administração de fármacos alternativa às vias convencionais. A via pulmonar apresenta vantagens importantes para a obtenção de ação local ou sistêmica de fármacos, como: elevada área superficial alveolar, aumento da biodisponibilidade local, possibilidade de redução de frequência de dose e de efeitos adversos, entre outros (2-4).

O desenvolvimento de novos sistemas para a administração de fármacos é uma ferramenta importante na terapêutica de doenças sistêmicas e, principalmente, doenças pulmonares locais. No entanto, algumas características importantes são necessárias para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas visando a via pulmonar. A forma, características de superfície e o tamanho reduzido (1 – 5 μm) são os principais aspectos no desenvolvimento de novos sistemas. Entre os sistemas desenvolvidos para a administração pulmonar, destacam-se os pós-secos para inalação (*dry powders inhalers* – DPI) (2, 5, 6).

A asma é uma doença multifatorial decorrente de fatores genéticos e exposição a fatores ambientais, como fumaça e micro-organismos. É caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica das vias aéreas e apresenta hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas. A reação inflamatória no tecido pulmonar é exacerbada e caracterizada pela quantidade elevada de leucócitos no infiltrado pulmonar, principalmente, por eosinófilos (7-9).

O tratamento de primeira escolha da asma é o uso de glicocorticoides, principalmente, a budesonida. No entanto, a administração deste fármaco pela via oral apresenta uma baixa biodisponibilidade, além de promover efeitos adversos graves, como afinamento da pele e imunossupressão (10).

A nanotecnologia é a aplicação de uma ciência multidisciplinar, largamente estudada atualmente, que oferece vantagens no desenvolvimento de novos sistemas para carreamento de fármacos. O uso de nanosistemas proporciona características peculiares, frente aos sistemas convencionais de administração de fármacos, como por exemplo, o aumento da biodisponibilidade de fármacos, a diminuição de efeitos adversos, a possibilidade de redução de dose, o aumento na estabilidade de fármacos, entre outros (11-13).

O uso de modelos de cultura celular epitelial apresenta diversas vantagens no seu uso. Em particular, células das vias aéreas podem ser usadas para avaliar mecanismos de absorção, metabolismo e transporte de fármacos (14, 15). O uso de linhagens celulares epiteliais pulmonares é de relevante importância para a avaliação de novas formulações em termos de toxicidade e internalização celular (16, 17).

Neste contexto, é de grande interesse o desenvolvimento de novos sistemas DPI aliando várias tecnologias. No presente trabalho, propomos o uso de sistemas inovadores de DPI baseados em nanotecnologia para a administração via pulmonar como uma nova plataforma tecnológica para o tratamento da asma. Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um novo sistema DPI a base de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo budesonida produzidas na forma de pó respirável, visando ao tratamento da asma.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O desenvolvimento de uma formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo budesonida na forma pulverulenta veiculadas como *dry powders inhalers* (DPI) e avaliar o efeito deste novo sistema em modelos animais de asma aguda e crônica e a toxicidade *in vitro* utilizando linhagens celulares pulmonares. A hipótese do trabalho é de que a formulação desenvolvida permitirá um tratamento seguro e mais eficaz do que o apresentado pelo produto comercial.

2.2 Objetivos específicos

- Realização de um estudo fatorial de pré-formulação, avaliando a preparação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico e os adjuvantes de secagem utilizados;
- Caracterização físico-química das suspensões e dos pós-secos obtidos;
- Estudo do efeito da formulação nanoestruturada escolhida em modelo animal de asma aguda e crônica, avaliando:
 - Mecânica respiratória e função pulmonar em termos de resistência e elastância pulmonar;
 - Avaliação do fluido de lavagem bronco alveolar (BALF) para contagem de leucócitos totais e análise diferencial no infiltrado pulmonar;
 - Quantificação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar;
 - Análise histopatológica do tecido pulmonar.
- Avaliação da toxicidade *in vitro* da formulação escolhida utilizando cultura celular em linhagens pulmonares: bronquial epitelial (H441) e de monócitos diferenciados em macrófagos (THP-1);

- Avaliação da captação celular na linhagem bronquial epitelial (H441) utilizando a formulação selecionada e polímero marcado com rodamina (PCL-Rod).

3. Revisão de Literatura

3.1 Anatomia do sistema respiratório

A conexão entre o meio ambiente e os pulmões ocorre através das vias aéreas, que são divididas em superiores e inferiores. As vias aéreas superiores são constituídas pelo nariz, cavidade oral, laringe e faringe. Estas partes iniciais do sistema respiratório possuem 4 funções importantes: condução do ar inspirado e expirado, umidificar e aquecer o ar inspirado, prevenção da entrada de partículas estranhas até a árvore brônquica e funções de fala e olfato (18, 19).

As vias aéreas inferiores são constituídas pela árvore bronco-traqueal que é dividida em duas grandes partes: zona de condução que é formada pela traqueia, brônquio principal, brônquio segmentado, bronquíolos e bronquíolos terminais; e a zona respiratória que é formada pelos bronquíolos respiratórios, dutos alveolares e sacos alveolares (19).

A parte distal do sistema respiratório é formada por 3 partes essenciais: os brônquios respiratórios, dutos alveolares e os sacos alveolares, que são a parte principal e funcional da troca gasosa entre o meio externo e o organismo humano (19, 20). Existem cerca de 300 milhões de alvéolos, em um adulto, com cerca de 75 – 300 μm de diâmetro e cerca de 95% desta área alveolar é revestida por capilares alveolares, local onde ocorrem as trocas gasosas (19).

O órgão que comporta parte do sistema respiratório, principalmente as vias aéreas inferiores, são os pulmões. O pulmão direito é maior e mais pesado do que o esquerdo e é dividido em 3 lobos, enquanto o pulmão esquerdo possui 2 lobos (19).

A ventilação é definida como o processo que move os gases respiratórios do meio externo para os pulmões e vice-versa. Envolve a entrada de oxigênio do meio ambiente para os alvéolos pulmonares e a saída do dióxido de carbono dos pulmões para o meio externo. Para o entendimento do processo de ventilação é preciso abordar os 4 seguintes aspectos: as diferenças de pressão através dos pulmões; as propriedades elásticas intrínsecas dos pulmões; as características dinâmicas dos pulmões que afetam a ventilação e situações normais e anormais de ventilação (19).

O gradiente de pressão existente entre a atmosfera e os pulmões é o responsável pela entrada e saída de ar e ainda pela manutenção (Figura 1) e um

nível basal inflado dos pulmões. O fluxo de ar sempre vai de um local com uma pressão maior para um de menor pressão. A Figura 1 ilustra, resumidamente, a troca gasosa de oxigênio e de gás carbônico entre o meio externo e os pulmões.

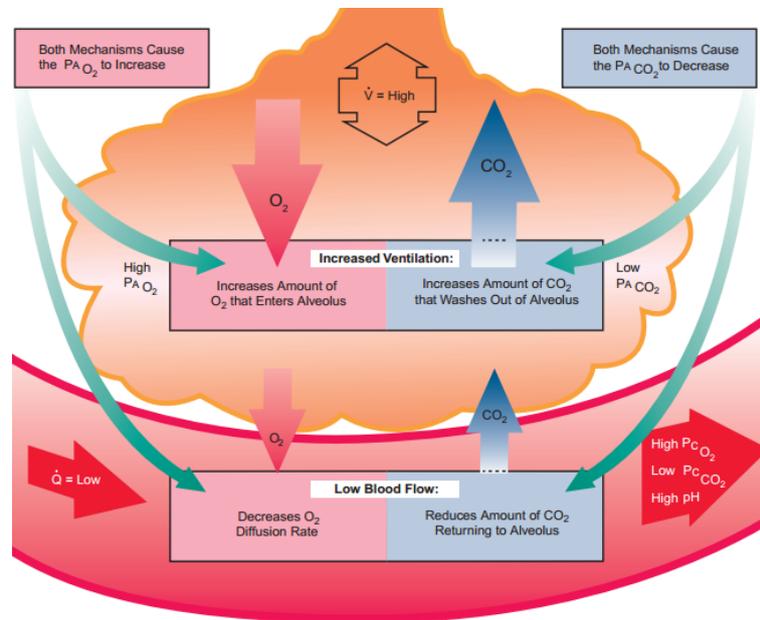


Figura 1. Representação da troca gasosa mostrando o aumento da PO_2 alveolar e a concomitante diminuição da PCO_2 alveolar (retirado de Fishman 2008).

A entrada e saída de ar da atmosfera para o sistema respiratório e vice-versa ocorrem devido à pressão através das vias aéreas e à pressão transpulmonar em resposta da ação do diafragma, que é o principal músculo respiratório. No momento da inspiração ocorre a contração do diafragma e posterior movimento deste músculo para baixo, proporcionando um aumento no volume torácico e uma diminuição das pressões intra-pleural e intra-alveolar, permitindo, assim, a entrada do ar da atmosfera através da árvore bronco-traqueal para os pulmões. Por outro lado, no momento da expiração ocorre o relaxamento do diafragma que volta para a posição inicial, proporcionando uma diminuição no volume do tórax e aumento das pressões intra-pleural e intra-alveolar (19, 21).

Os pulmões possuem uma capacidade elástica própria assim como a parede torácica, no entanto os movimentos de elasticidade de cada sistema elástico são opostos. O tórax tem uma tendência a se expandir decorrente do

movimento dos ossos do tórax e dos músculos torácicos. Por outro lado, os pulmões convergem para movimentos de contração devido às propriedades elásticas do tecido pulmonar (19).

Duas propriedades importantes dos pulmões são a resistência e a complacência. A resistência é matematicamente definida como sendo a diferença de pressão entre a boca e os alvéolos dividida pela taxa de fluxo de ar, ou seja, é o fluxo que um volume de ar passa pelas vias aéreas, uma função de gradiente de pressão e a resistência criada pelas vias aéreas à entrada do ar. Por outro lado, a complacência é definida como sendo a facilidade de acomodação dos pulmões durante o processo de respiração. Por sua vez, a elastância é o inverso da complacência, definida como a resistência de um objeto à deformação (19).

3.2 Via pulmonar

O uso da via pulmonar para administração de fármacos tem sido foco de inúmeras pesquisas nas últimas duas décadas. Esta via se apresenta como sendo uma via de primeira escolha para o tratamento de doenças das vias aéreas e infecções locais e, ainda, para tratamentos sistêmicos (2, 4, 5, 22, 23). A via pulmonar aparece como uma das principais vias de administração alternativa às vias convencionais como a oral e intravenosa, pois apresenta diversas vantagens como a extensiva vascularização tecidual, grande potencial para produzir um máximo benefício terapêutico, fina barreira epitelial (0,1 – 0,2 μm), grande área superficial alveolar para a absorção de fármacos (100 m^2), baixa atividade metabólica, ausência de metabolismo de primeira passagem, aumento da biodisponibilidade de fármacos, possibilidade de diminuição dos efeitos adversos de certos fármacos e de diminuição de frequência de dose (3, 6, 24-26).

As principais vantagens do tratamento pulmonar local são: a diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos e as altas doses da medicação aplicada no sítio de ação de fármacos. Por outro lado, mesmo sendo uma das vias mais utilizadas para o tratamento de doenças respiratórias, apresenta algumas desvantagens como a rápida depuração mucociliar e a necessidade de aplicação de 3 ou 4 doses diárias de fármaco (2, 6, 27, 28). As principais doenças pulmonares que

são alvo da administração de fármacos pela via pulmonar visando ao tratamento local são a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica, a hipertensão arterial pulmonar, a silicose, o câncer e a fibrose cística (4, 6, 24, 29-31).

O tamanho de partícula é um dos parâmetros mais importantes a ser levado em consideração no desenvolvimento de novos sistemas para administração pulmonar, juntamente com a distribuição de tamanho, forma, superfície, carga, densidade e higroscopicidade, sendo o diâmetro de partícula o fator mais determinante para uma deposição pulmonar adequada (6, 26, 30).

Os mecanismos de impactação e de distribuição das partículas no trato respiratório estão relacionados com o tamanho de partícula. A tendência de impactação aumenta com o aumento da velocidade do ar inspirado, taxa de respiração, tamanho de partícula ($>5 \mu\text{m}$) e densidade. Por sua vez, partículas com tamanhos inferiores a $5 \mu\text{m}$ podem ser transportadas para dentro da traqueia (2, 6, 26, 32, 33). Para alcançar as partes mais profundas dos pulmões e aperfeiçoar a deposição pulmonar dos fármacos, esses sistemas desenvolvidos devem apresentar um diâmetro aerodinâmico entre 1 e $5 \mu\text{m}$. Essa faixa de tamanho é relatada na literatura como a faixa ideal para sistemas candidatos à administração pulmonar, pois partículas com tamanho superior a $5 \mu\text{m}$ usualmente ficam depositadas na região orofaríngea e são ingeridas e/ou expelidas; por outro lado, partículas com diâmetro inferiores a $1 \mu\text{m}$ podem não chegar às partes mais profundas dos pulmões devido ao movimento Browniano que adquirem no fluxo de ar e podem ser exaladas na expiração (2, 5, 25-27, 29, 34).

O uso de adjuvantes carreadores de partículas para a administração pulmonar visa evitar a formação de aglomerados devido à coesão destas partículas e aumentar o fluxo dos pós melhorando a aerolização (5). A disponibilidade de adjuvantes que melhorem as características de aerossol de um fármaco candidato para a administração pulmonar é limitada. Neste contexto, desenvolve-se a busca por estratégias alternativas como a engenharia de partículas que apresentem propriedades adequadas e boa dispersibilidade (6, 26).

Tendo em vista que a escolha e o uso de adjuvantes que podem melhorar o comportamento aerossol de formulações pulverulentas para a administração

pulmonar é restrito, o desenvolvimento de novos sistemas particulados carreadores de fármacos têm recebido uma atenção diferenciada nas pesquisas científicas. Esse desenvolvimento de partículas planejadas melhora parâmetros importantes como o tamanho, a morfologia e a estrutura das partículas. Os principais objetivos deste desenvolvimento é a obtenção de partículas com estreita faixa de distribuição de tamanho, melhor dispersibilidade, aumento na estabilidade e na biodisponibilidade de fármacos, além da obtenção de perfis de liberação controlados/sustentados e vetorização precisa (6, 26).

Existem várias opções para a redução de tamanho de partículas sólidas pulverulentas, sendo a primeira, geralmente, a micronização. Porém, poucas técnicas de micronização conseguem produzir partículas com tamanho controlado na faixa de 1 – 5 μm (35). Por outro lado, podem ser obtidos pós-secos a partir de soluções ou dispersões por *spray-drying*, *spray-freeze-drying* ou *nanospray-drying*, técnicas que permitem a obtenção de partículas de tamanho reduzido e com faixa de distribuição controlada, além de apresentar uma desaglomeração e formação de aerossol mais adequada para a administração pulmonar (2, 6, 25, 26).

Dispositivos para administração de fármacos pela via pulmonar podem ser divididos em 3 categorias: nebulizadores, inaladores de dose-medida pressurizados (MDI) e inaladores de pó-seco (DPI). Um bom dispositivo deve gerar um aerossol adequado, com partículas de tamanho controlado (1 – 5 μm), além de promover a estabilidade química e física do fármaco na formulação, ser simples, conveniente, ter baixo custo, ser portátil e de fácil manuseio (2, 4, 6, 24, 26, 31, 36).

Os nebulizadores foram os primeiros dispositivos desenvolvidos disponíveis no mercado. No entanto, esses dispositivos apresentam desvantagens importantes, como a baixa eficiência, baixa reprodutibilidade e alta variabilidade de dose. Além disso, o tempo elevado para a obtenção do efeito (cerca de 30 min), a ausência de portabilidade e a limpeza do dispositivo são desvantagens inerentes da técnica (6).

Inaladores do tipo MDI (inaladores de dose-medida pressurizados) foram desenvolvidos, principalmente, para o uso no tratamento da asma na década de 50. Todavia, estes dispositivos são, reconhecidamente, agressores do meio

ambiente, pois são produzidos com gases do tipo cloro flúor carbono (CFC) e apenas uma pequena parte do fármaco que sai do dispositivo chega às partes mais profundas do pulmão, devido à combinação da alta velocidade que o fármaco sai do atuador e a má coordenação entre o dispositivo e a inalação. A quantidade de fármaco que fica na boca e na região orofaríngea é variável a partir deste tipo de dispositivo. Trabalhos na literatura mostram que a perda, usando dispositivo do tipo MDI, é superior a 70%, podendo chegar até 90% (2, 6, 36).

Devido aos problemas apresentados pelos dispositivos supracitados, foi desenvolvido um sistema inalatório simples, pequeno, sem uso de propelentes e ambientalmente correto, utilizando pós-secos para inalação (*Dry powder inhalers* – DPI). Dispositivos do tipo DPI combinam a tecnologia da forma farmacêutica pó com o desenvolvimento de dispositivos para dispersar os pós-secos como um aerossol no fluxo de ar respiratório dos pacientes. Portanto, requerem pouco ou nenhuma coordenação entre o atuador e a inalação e resultam, na maioria das vezes, em uma melhor administração e distribuição pulmonar de fármacos, quando comparados com dispositivos do tipo MDI (6, 24).

O desenvolvimento de DPI's é preferido por apresentarem melhor estabilidade, processamento, fácil manuseio e, geralmente, são produzidos em uma única fase e em estado sólido. São os preferidos para o uso no tratamento da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica. Atualmente, existem três tipos principais de DPI's: dose unitária única (cápsulas em dose única), dose unitária múltipla e dose múltipla acomodadas em blíster ou em reservatório de fármaco de onde as doses serão administradas (2, 4, 6, 28, 36).

A produção de DPI's depende de quatro fatores principais, complexos e interligados: 1) das propriedades do fármaco ou do material particulado que carrega o fármaco, como o fluxo do pó, o tamanho de partícula, a distribuição de tamanho, a densidade, as forças de coesão/adesão, a forma e a propriedade de superfície; 2) do desempenho e do desenvolvimento do atuador (geometria e tamanho) – desempenho, capacidade de desaglomeração do pó e a formação do aerossol no momento da liberação da forma farmacêutica a partir do atuador; 3) da correta inalação que proporcione deposição correta nos pulmões, da forma, do tamanho e do correto posicionamento da cápsula no dispositivo e 4) do perfil

inalatório e da taxa de fluxo respiratório do paciente através do inalador que vai gerar o fluxo de ar para o trato respiratório. Evidentemente, essas características não podem ser observadas de forma separada e, sim, de forma concomitante (2, 5, 6, 25, 26, 28, 29, 33, 34, 36, 37).

No entanto, é difícil prever se uma partícula com velocidade e massa conhecidas vai realmente se distribuir de forma adequada nas vias aéreas, em certas bifurcações dos pulmões, porque o fluxo de ar, já no interior do trato respiratório, não pode ser mensurado adequadamente e as partículas podem ter posições de partida diferentes nas vias aéreas. Além disso, após a passagem pelas vias aéreas superiores, boca e traqueia, e com a diminuição do fluxo do ar devido ao aumento do número de bifurcações nos pulmões, a força de sedimentação das partículas se torna muito importante para a chegada às partes mais profundas dos pulmões (2, 36).

O local de deposição das partículas é um dos fatores levados em consideração no planejamento de sistemas particulados para definir o tamanho preferido. Alguns parâmetros considerados no desenvolvimento de partículas são: 1) o local de ação das partículas nos pulmões (local e/ou sistêmico), levando em consideração a morfologia, fisiologia e anatomia do pulmão dos pacientes; 2) a ocorrência e a severidade de efeitos adversos e 3) a eficiência de desaglomeração do pó durante a inalação (2, 36).

A determinação da faixa de diâmetro aerodinâmico (d_{aero}) ideal para administração pulmonar de fármacos ou sistemas carreadores de fármacos pode ser estimada por modelos matemáticos de deposição nos pulmões, estudos de deposição *in vivo* ou a partir de estudos clínicos combinado com métodos farmacocinéticos (2, 36). O diâmetro aerodinâmico pode ser definido como o diâmetro de uma esfera com densidade unitária que, ao ser submetida a um jato de ar, alcança a mesma velocidade que uma partícula não esférica de densidade arbitrária (38).

A aerolização de um pó para inalação pode ser aumentada através da redução do d_{aero} . Isto pode ser feito de várias formas: a mais óbvia e utilizada é a redução do diâmetro geométrico (d_{geo}) das partículas, desde que a densidade seja mantida; no entanto, isso pode aumentar a compactação das partículas por aumentar as forças de coesão e, conseqüentemente, uma maior

aglomeração e possibilidade de redução da aerolização da formulação pulverulenta. Outra forma de reduzir o daero é mantendo o dgeo e modificando a densidade da partícula, por exemplo: aumentando a porosidade ou aumentando o fator forma aerodinâmica, por exemplo: modificando as partículas para o formato de agulha (5).

3.3 Asma

A asma é caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, por apresentar remodelamento e hiper-reatividade brônquica, resposta imune por células Th2 a agentes alergênicos inalados. Ocorre obstrução do fluxo de ar, secreção de muco e elevada infiltração de eosinófilos, neutrófilos e células T CD4+, hipertrofia da musculatura lisa e hiperplasia, além de aumento da deposição subcelular de colágeno e fibras elásticas (1, 7-9, 39).

Esta doença é considerada uma síndrome, pois é resultado de várias manifestações e fatores distintos: clínicos, fisiológicos e patológicos. Pode ser dividida em asma intermitente, persistente leve, persistente moderada e persistente grave (1).

A asma atinge cerca de 10% da população mundial. Estudos epidemiológicos apontam para um aumento importante no número de casos de asma no mundo, nas últimas cinco décadas, principalmente, pelo aumento da exposição das pessoas a agentes alérgicos e à poluição. No Brasil, o crescimento dos casos de asma está acima (13%) do índice mundial e esta doença é considerada um grave problema de saúde pública (9).

A resposta asmática é caracterizada pela associação de fatores genéticos e ambientais. Estudos apontam uma região cromossômica responsável pela produção de Imunoglobulina do tipo E (IgE), que é um dos maiores fatores de risco associado ao desenvolvimento da doença. Usualmente, a asma se inicia na infância com a sensibilização das vias aéreas pela ação de alérgenos como ácaros, fungos, pólen, que desencadeiam respostas imunológicas que geram inflamação das vias aéreas. Portanto, o desenvolvimento do quadro asmático é uma soma de fatores importantes como o genótipo do paciente associado ao

tipo, tempo de exposição e dose do alérgeno, infecções paralelas e qualquer fator que possa promover este processo (40, 41).

O processo de sensibilização de um indivíduo até um quadro estabelecido de asma é muito complexo e envolve vários mecanismos e liberação de quimiocinas intracelulares (Figura 2). Tudo começa com a inalação de um alérgeno que quando em contato no epitélio pulmonar é captado pelas células dendríticas presentes no epitélio e submucosa. Após a captação pelas células dendríticas, este antígeno é processado e apresentado aos receptores de células T CD4+ pelo sistema principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (1, 8, 9). Após a apresentação do antígeno e diversas sinalizações, ocorre uma ativação e diferenciação das células nativas T no tipo T “helper” do tipo 2 (Th2). Isso ocorre, principalmente, pela capacidade das células dendríticas de produzir interleucina IL-12 que favorece a maturação do tipo Th2. Os linfócitos Th2, nesta etapa, são produtores potentes de citocinas, principalmente, interleucinas: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 (9, 41). Pode-se dizer que as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 são as responsáveis pelo desenvolvimento da doença. A IL-5 favorece o aumento da população de eosinófilos ao estimular a diferenciação e sobrevivência destas células. A IL-13 promove diretamente a hiperreatividade das vias aéreas, além de atuar sobre outras células das vias respiratórias induzindo a produção de fatores pró-inflamatórios e a secreção de muco. A IL-4, além de contribuir para diferenciação de linfócitos para o perfil Th2, atua em conjunto com a IL-13 na indução da troca de classes em linfócitos B, estimulando o rearranjo de segmentos genéticos que codificam a cadeia pesada de imunoglobulina, culminado com a produção de imunoglobulina E (IgE) específica, a qual distribui-se sistemicamente através dos vasos linfáticos. Após obter acesso ao tecido pulmonar, a IgE liga-se ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) expresso na membrana de mastócitos ou basófilos residentes. Esse processo é conhecido como sensibilização e é assintomático (8, 9).

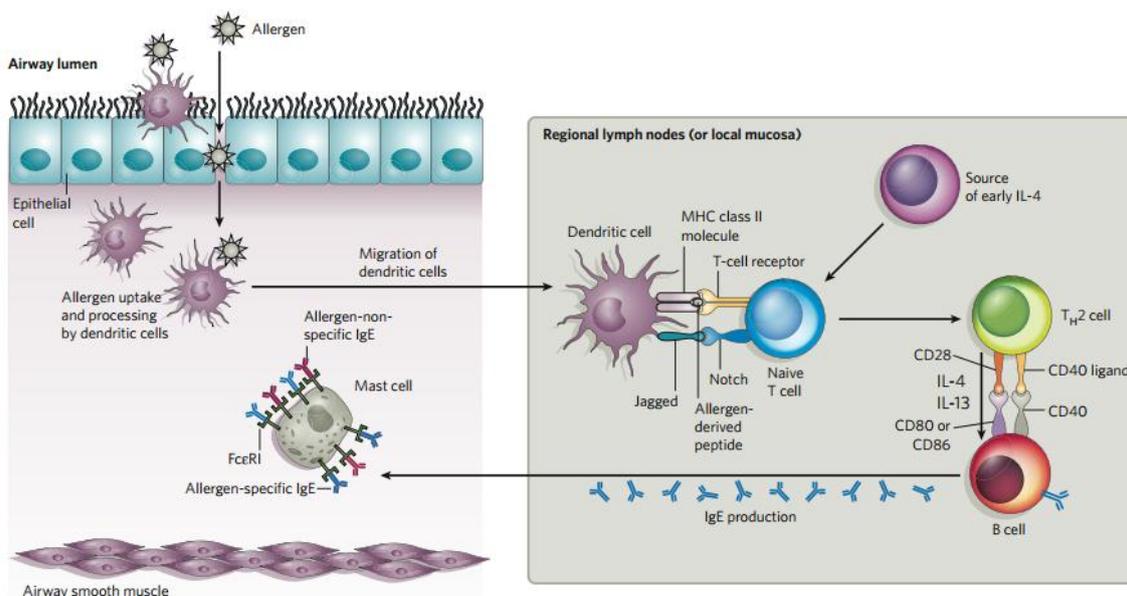


Figura 2. Sensibilização na asma (retirado de Galli et. al. 2008)

O processo de desenvolvimento do quadro asmático é dividido em três etapas principais: fase de indução, fase imediata e fase tardia. Cada fase é caracterizada pela produção e interação de vários mediadores derivados celulares. A fase de indução, previamente descrita, consiste na sensibilização por efeito de alérgenos e liberação de citocinas por meio de linfócitos T. A fase imediata inicia-se com uma nova exposição ao alérgeno em indivíduos já sensibilizados previamente, sendo caracterizada pela ativação de basófilos e mastócitos. A atividade dos mastócitos ocorre através da liberação dos grânulos intracelulares de mediadores como histamina e serotonina, além da produção de citocinas, proteases e hidrolases, leucotrienos e fator ativador de plaquetas que promovem vasodilatação, aumento na permeabilidade celular, broncoespasmo e hipersecreção de muco para a luz das vias aéreas (8, 9). Além disso, cabe ressaltar que histamina liberada é a principal responsável pela contração das células endoteliais dos vasos e contração da musculatura lisa ocasionando a broncoconstrição das vias aéreas. Nesta fase imediata, ocorre a proliferação, maturação e ativação de células Th2, eosinófilos e mastócitos pela ação de diversas citocinas produzidas nesta etapa, como: fator de necrose tumoral (TNF), eotaxina – 1 e de interleucinas IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. A produção destes mediadores e de células pró-inflamatórias resulta no acúmulo de mais mediadores inflamatórios que estão envolvidos na fase tardia do quadro

asmático, que consiste em uma produção exacerbada de inflamação e remodelamento significativo das vias aéreas. O remodelamento tecidual é caracterizado pelo aumento no tamanho das células caliciformes brônquicas, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso das vias aéreas, descolamento epitelial, espessamento da camada reticular da membrana basal, fibrose sub-epitelial, fragmentação das fibras elásticas, angiogênese e aumento da permeabilidade vascular. Padrões celulares e moleculares relacionados ao remodelamento das vias aéreas na asma são complexos, interativos e variáveis. Nesta fase ocorre uma resposta eosinofílica exacerbada no tecido pulmonar, o que está diretamente ligado à severidade da asma (1, 8, 9, 41).

A presença de eosinófilos no tecido pulmonar é característica na reação alérgica inflamatória. Essas células são responsáveis pela inflamação e aumento na hiper-reatividade das vias aéreas, hipersecreção de muco e broncoespasmo. O recrutamento de eosinófilos é decorrente, principalmente, de hipersecreção de IL-3 e IL-5. O interior destas células apresentam uma grande quantidade de grânulos proteicos, peroxidases, leucotrienos, citocinas e quimiocinas. A presença destas células no tecido pulmonar causa dano neurogênico que contribui para a contração do músculo liso das vias aéreas e, principalmente, o recrutamento de mais eosinófilos e células Th2 (9, 41).

O remodelamento das vias aéreas, em quadros asmáticos estabelecidos, é o principal responsável pelos sintomas clínicos da asma. O remodelamento é um conjunto de modificações estruturais associadas à tentativa de reparo dos danos causados pela inflamação local. A interação entre as células estruturais do sistema respiratório e as células inflamatórias que migraram para a luz das vias aéreas, principalmente eosinófilos, linfócitos Th2 e mastócitos, resulta no processo de remodelamento das vias aéreas. Estudos apontam que o número elevado de eosinófilos no lúmen das vias aéreas seja responsável pelos danos estruturais como dano epitelial, espessamento da membrana basal e liberação de mediadores que resultam em indução da fibrose subepitelial, hiperplasia da musculatura lisa dos brônquios, angiogênese e hiperplasia das células produtoras de muco (7-9). O remodelamento das vias aéreas pode explicar a perda progressiva da função pulmonar em asmáticos, uma vez que a presença de muco e células inflamatórias no lúmen das vias aéreas associados ao

espessamento do epitélio brônquico resulta no aumento da obstrução do fluxo de ar nas vias aéreas. A hiper-reatividade das vias aéreas é definida como um aumento da resposta broncoconstritora a estímulos não específicos, levando aos sintomas clínicos de falta de ar, sibilo e tosse em asmáticos. A resposta pode ser medida experimentalmente, utilizando estímulos não seletivos que provocam broncoconstrição em asmáticos e é geralmente realizada por meio de curvas de dose-resposta por inalação de agentes pró-espasmódicos, tais como metacolina.

Como a asma é uma doença heterogênea e complexa, a investigação dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à fisiopatologia, se faz necessária, visando à identificação e validação de intervenções terapêuticas. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de modelos experimentais capazes de mimetizar as características da doença. Modelos animais vêm sendo utilizados a mais de 100 anos (42), sendo os modelos animais de asma provavelmente os melhores caracterizados em termos de processos inflamatórios e de remodelamento (43).

A maioria dos modelos murinos asmáticos utilizam alérgenos que levam à expressão principal do fenótipo Th2, que é caracterizado por altos níveis de IgE específica, inflamação eosinofílica das vias aéreas e um padrão de citocinas típico caracterizado pelo aumento dos níveis de IL-4, IL5 e IL-13 (42). Camundongos são facilmente sensibilizados com antígenos aos quais eles não são expostos rotineiramente. A ovalbumina (OVA) é o antígeno mais utilizado para o desenvolvimento da inflamação alérgica. Em condições de sensibilização e desafio de camundongos, ratos ou cobaias com OVA, os eosinófilos são as principais células inflamatórias recuperadas no lavado broncoalveolar (42, 44). Outros alérgenos são também bastante empregados, a exemplo do uso de ácaros, considerado clinicamente mais relevante, uma vez que 50 a 85% dos asmáticos são tipicamente alérgicos a poeira caseira que contem ácaros (43).

A primeira escolha para o tratamento da asma é o uso de glicocorticoides. Os fármacos utilizados para o tratamento da asma incluem broncodilatadores, que atuam principalmente inibindo a contração do músculo liso das vias respiratórias, e os fármacos anti-inflamatórios esteroides, os quais suprimem a inflamação pulmonar. Os glicocorticoides são considerados a classe mais efetiva no tratamento, principalmente, da asma crônica (45). A ação dos glicocorticoides

ocorre na prevenção das exacerbações da doença, reduzindo a inflamação das vias aéreas, edema, secreção de muco, extravasamento vascular e a hiperreatividade da musculatura bronquial. É importante ressaltar que alguns pacientes asmáticos graves são inteiramente refratários ao tratamento, mesmo quando submetidos a altas doses de glicocorticoides administrados por via oral.

A budesonida (Figura 3) é classificada como sendo um corticosteroide não halogenado com elevada afinidade pelo receptor glicocorticoide e prolongada retenção tecidual, sendo considerado de primeira escolha para o tratamento da asma (10). A budesonida exerce seus efeitos genômicos através de mecanismos de transativação e transrepressão, reduzindo o recrutamento de leucócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células nas vias aéreas. Entretanto, a inalação frequente deste fármaco pode ocasionar efeitos adversos graves, como afinamento da pele, redução da densidade mineral óssea e catarata. Seu uso sistêmico pode ocasionar efeitos indesejados como supressão adrenocortical, síndrome de Cushing e osteoporose (46, 47). Esses problemas apontam a necessidade de novas alternativas terapêuticas para um tratamento mais eficaz e seguro dessa doença.

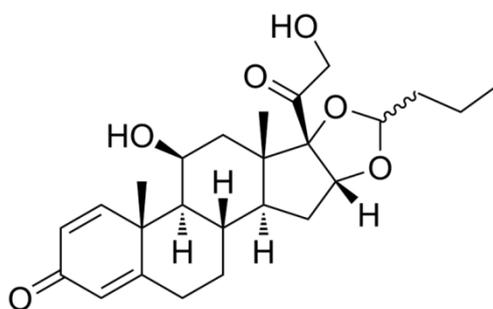


Figura 3. Fórmula estrutural da budesonida.

Como apresenta uma baixa biodisponibilidade oral (cerca de 10%) e uma alta ligação às proteínas plasmáticas (cerca de 88%), a budesonida é um fármaco candidato à administração pulmonar.

3.4 Nanopartículas: sistemas coloidais

A redução do tamanho de partícula de compostos ou ainda a produção de novos sistemas em escala nanométrica confere propriedades importantes e

diferenciadas a estes nanossistemas, frente aos sistemas convencionais já conhecidos (48). O uso da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações para o uso pulmonar tem apresentado grande interesse na área científica nas últimas décadas.

A nanoencapsulação de fármacos apresenta propriedades particulares e importantes em comparação com os sistemas de administração convencionais. O uso da nanotecnologia para veiculação de fármacos promove uma liberação controlada de fármacos a partir das nanopartículas e visa à vetorização a alvos específicos no organismo, aumento da estabilidade e da biodisponibilidade de fármacos, além da possibilidade de redução de dose e diminuição dos efeitos adversos, redução na toxicidade e uma maior adesão do paciente aos tratamentos (11-13, 49, 50).

Os carreadores nanoestruturados com diâmetros de partícula entre 1 – 1000 nm, para veiculação de fármacos, têm sido frequentemente estudados nos últimos anos. As nanopartículas poliméricas são divididas em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas matriciais compostos, majoritariamente, por uma rede polimérica onde o fármaco está homogeneamente disperso na rede polimérica. Por sua vez, as nanocápsulas são definidas como sistemas poliméricos compostos por uma parede polimérica e um núcleo lipofílico com função reservatória, podendo o fármaco estar completamente dissolvido ou disperso no núcleo e/ou na parede polimérica (11, 13, 50, 51).

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa, Jäger e colaboradores (2009) avaliaram a influência da concentração dos componentes do núcleo das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona – PCL). O estudo avaliou as variações das concentrações de monoestearato de sorbitano (Span 60[®]), que possui funções tensoativas, e óleo dos triglicerídeos de cadeia média (TCM). Estes nanocarreadores foram denominados de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e consistem em uma dispersão do lipídio sólido no óleo que resulta em um núcleo com características de organogel. Esta característica confere papel importante no controle da liberação do fármaco das nanocápsulas (51).

Por sua vez, no trabalho desenvolvido por Venturini e colaboradores (2011) foi proposta uma otimização das nanocápsulas de núcleo lipídico. Após o

desenvolvimento de várias formulações com variações quantitativas dos triglicerídeos de cadeia média e do monoestearato de sorbitano, avaliações de diâmetro de partícula e avaliação do gradiente de densidade, foi possível evidenciar a presença de nanocápsulas e nanoemulsões nas formulações. No entanto, após estes estudos, foi proposto que quando a proporção (1:4,1:2,6 m/m) de Span 60[®], TCM e PCL, é utilizada, é possível obter exclusivamente nanocápsulas de núcleo lipídico, sem a presença simultânea de dispersões de Span 60[®] ou, ainda, de nanoemulsões (52).

3.5 Secagem de sistemas nanoestruturados

Sistemas nanoestruturados em formas farmacêuticas líquidas possuem uma limitação na questão da estabilidade. Dessa forma, a remoção da água destes sistemas líquidos por secagem por aspersão promove um aumento na estabilidade físico-química das formulações (53-57). O processo de secagem por aspersão (*spray-drying*) é uma ferramenta muito importante na obtenção de formas farmacêuticas sólidas a partir de formas líquidas, como soluções, emulsões, suspensões ou dispersões (53, 54, 57). É uma técnica rápida, de baixo custo, realizada em etapa única e passível de transposição para escala piloto e industrial (55, 57). A secagem de formas farmacêuticas líquidas para obtenção de nanopartículas pode ser abordada, de forma geral, em 3 grandes grupos: 1) secagem de soluções para obtenção de nanopartículas (processo tipo “bottom up”); 2) secagem de emulsões/dispersões para obtenção de nanopartículas e 3) secagem de nanopartículas pré-formadas (57).

A primeira abordagem, geralmente, compreende o uso de solventes miscíveis com a água e polímeros hidrofílicos solubilizados formando soluções verdadeiras. Por outro lado, também é relatado o uso de polímeros hidrofóbicos para a preparação de nanopartículas usando solventes orgânicos como o diclorometano. Essa abordagem de secagem de soluções permite a produção de pós-secos de nanopartículas com propriedades importantes de liberação controlada e com aumento da estabilidade da forma farmacêutica sólida (57).

Nanopartículas secas por *spray-drying* também podem ser obtidas a partir de suspensões, emulsões e dispersões. Os principais estudos sobre obtenção

de nanopartículas, por secagem, são a partir de microemulsões, dispersões coloidais ou emulsões.

Foram desenvolvidas nanopartículas na forma pulverulenta contendo fármaco insolúvel e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), visando um aumento da biodisponibilidade devido ao aumento da área superficial do pó obtido por secagem (58). A obtenção dessas nanopartículas, secas por *spray-drying* a partir dessas dispersões e emulsões, pode ser empregada para administração pulmonar, assim como para produção de comprimidos juntamente com outros adjuvantes, para uso pela via retal, oral, ou pós redispersíveis para uso pela via oftálmica ou parenteral (59).

A terceira abordagem para obtenção de nanopartículas secas por secagem por aspersão refere-se à secagem de suspensões de nanopartículas, previamente formadas para a obtenção de pós. Para isso, são utilizados adjuvantes que auxiliam na secagem dessas nanopartículas, que são facilmente redispersíveis e o tamanho nanométrico permanece inalterado (57).

O primeiro estudo de secagem de nanopartículas previamente formadas foi desenvolvido e patenteado por Guterres e colaboradores (1999). O uso da secagem de suspensões de nanopartículas poliméricas, nanocápsulas ou nanoesferas, é uma alternativa tecnológica importante visando à melhoria na estabilidade físico-química dessas suspensões, tendo em vista a possibilidade de sedimentação de partículas ou a degradação química dos componentes da formulação coloidal. Além disso, esta técnica também pode ser utilizada para a obtenção de produtos intermediários para produção de formas farmacêuticas finais, possibilitando a aplicação industrial dessas formas secas de nanopartículas (60, 61). Neste primeiro estudo, foi realizada a secagem de suspensão de nanocápsulas poliméricas, contendo fármaco ou não, juntamente com adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal (0,5 – 5 % m/v), em câmara de secagem, sob parâmetros previamente estabelecidos. Esses nebulizados obtidos podem ser utilizados para preparação de formas farmacêuticas ou como material de enchimento de cápsulas ou para compressão (12, 60).

No ano 2000, Muller e coautores desenvolveram nanocápsulas poliméricas, na forma pulverulenta, de PCL e Eudragit S90(R) devido à instabilidade físico-química das suspensões. A secagem foi realizada com o uso

de dióxido de silício coloidal, como descrito anteriormente por Guterres (1999), sendo possível obter pós redispersíveis. Também foi evidenciada a integridade física das nanocápsulas no aglomerado com dióxido de silício, por microscopia eletrônica de varredura, e ainda, que o tamanho das nanopartículas não foi alterado após a secagem por aspersão (61).

Em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, foram desenvolvidas suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo PCL ou poli (D,L – ácido láctico) (PLA) e como fármaco modelo foi utilizada a indometacina nanoencapsulada. Essas suspensões foram secas em *spray-dryer* utilizando dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem, sendo realizado um estudo comparativo de estabilidade. Os resultados mostraram um decaimento significativo na concentração de indometacina nas nanocápsulas da forma de suspensão coloidal. Por outro lado, na forma pulverulenta a recuperação de fármaco foi total, mostrando a importância da secagem das suspensões na estabilidade das formulações (62).

Em um estudo desenvolvido por Guterres (2001) foi mostrado, pela primeira vez, a capacidade gastroprotetora de suspensões de nanocápsulas ou de nanoesferas poliméricas de PCL, secas por *spray-drying*, frente ao uso do anti-inflamatório não esteroide, o diclofenaco ácido. O uso do diclofenaco, por via oral em modelos animais, quando nanoencapsulado, mostrou uma maior proteção ao tecido gástrico frente ao fármaco na sua forma não encapsulada (63).

Pohlmann e colaboradores (2002) desenvolveram um estudo comparativo de diferentes suspensões de nanocápsulas e nanoesferas, de PCL e PLA, secas por *spray-drying*, contendo ou não indometacina como fármaco modelo. Neste trabalho, foi avaliada a estabilidade, características físico-químicas e foi proposto um modelo estrutural de organização das nanopartículas poliméricas. Neste trabalho, o modelo desenvolvido sugere as nanoesferas como sendo sistemas bifásicos onde o surfactante encontra-se disperso na matriz polimérica (64).

Na década passada, foi proposto um sistema de nanorrevestimento de microaglomerados de dióxido de silício coloidal. Duas abordagens principais foram utilizadas: 1) um núcleo contendo um fármaco adsorvido e dióxido de silício coloidal revestido com nanocápsulas poliméricas, vazias, de Eudragit

S100® e 2) um núcleo de dióxido de silício coloidal revestido com nanocápsulas de Eudragit S100® com fármaco encapsulado. Os resultados obtidos mostraram a efetividade do nanorrevestimento com nanocápsulas de Eudragit S100® em modelo animal de gastroproteção frente ao uso de anti-inflamatórios não-esteroides (65, 66).

Nanocápsulas poliméricas de Eudragit S100 contendo melatonina encapsulada foram produzidas por Schaffazick e colaboradores (2006). No entanto, a estabilidade físico-química destas formulações foi muito limitada, assim como a eficiência de encapsulação da melatonina. Visando a resolução deste problema, essa suspensão de nanocápsulas foi transformada na forma farmacêutica pó, obtida por secagem por aspensão. Desta forma, foi possível aumentar a eficiência de encapsulação da melatonina, obter um perfil de liberação controlado da melatonina a partir das nanocápsulas quando comparadas a uma solução de melatonina pura, além de um aumento na estabilidade físico-química por 12 meses (67).

Tewa-Tagne (2006) desenvolveu nanocápsulas de PCL e avaliou a influência da concentração de nanocápsulas e do adjuvante de secagem. Foi testado a variação de nanocápsulas na concentração de 1 ou 4% (m/v) e do adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal) na concentração de 1,5 ou 3% (m/v). Quando fixado em 1% de NC, os pós-secos por aspensão, apresentaram distribuição de tamanho de partícula monomodal, independente da concentração de dióxido de silício coloidal. Por outro lado, quando fixado em 4% de NC, a distribuição de tamanho de partícula da formulação com 1,5% de sílica, foi bimodal. Já a formulação com 4% de NC e 3% de sílica apresentou perfil monomodal. Esses resultados mostram a importância da composição quantitativa dos componentes da formulação no momento da secagem destas suspensões de NC (53).

No ano posterior (2007a), o mesmo autor desenvolveu um estudo fatorial para secagem de nanocápsulas poliméricas. Neste estudo foi proposto um fatorial 2⁴, onde foram avaliados aspectos quali- e quantitativos das formulações e parâmetros do processo de secagem. O autor observou que tão importante quanto os aspectos de pré-formulação, onde são avaliadas as variações quali- e quantitativas das formulações, são também os parâmetros do processo de

secagem, como a temperatura, fluxo de ar, pressão do ar e taxa de alimentação da formulação no *spray-dryer* (68).

Em outro estudo de Tewa-Tagne e colaboradores (2007b) foi avaliada a influência quali- e quantitativa do adjuvante de secagem. Neste trabalho foram utilizados os seguintes adjuvantes de secagem hidrofílicos: lactose, maltodextrina, manitol (açúcares), polivinilpirrolidona (K30-PVP e K90-PVP), hidropropilcelulose (HPC) e hidropropilmetilcelulose (HPMC) (polímeros). O melhor resultado obtido foi quando fixado a proporção de 1% de NC e 10% de lactose (m/v), pela análise de tamanho de partícula, após a redispersão dos pós-secos em água, foi a única formulação que retomou o tamanho nanométrico de forma monomodal (69).

Após os relatos de Beck (2004, 2005 e 2007), Domingues e colaboradores (2008), desenvolveram, por secagem por aspersão e em uma única etapa, um sistema de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas de PCL ou Eudragit RS100, para modelo de fármaco lipofílico, a indometacina. Os microaglomerados revestidos com nanocápsulas de Eudragit RS100 mostraram um maior controle na liberação da indometacina, quando comparados aos microaglomerados revestidos com nanocápsulas de PCL. Além disso, foi possível verificar a integridade das nanocápsulas após a secagem, por microscopia eletrônica de varredura, característica importante para a manutenção do controle nanotecnológico da formulação (70).

Neste contexto, o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas na forma farmacêutica de pó, obtidas por secagem por aspersão, tem grande interesse na obtenção de novos sistemas de liberação para a via pulmonar (2, 5).

No trabalho de Beck-Broichsitter e colaboradores (2012) foi desenvolvida uma formulação de nanopartículas que, posteriormente, foi seca por *spray-drying*. Uma suspensão coloidal formada por PLGA, cumarina e PVA, como estabilizante, foi nebulizada utilizando o equipamento Nano Spray Dryer B-90 para obtenção de formas secas de nanopartículas visando à administração pulmonar. Os resultados obtidos foram promissores, com um diâmetro aerodinâmico dentro da faixa adequada para a administração pulmonar (~ 3 µm), partículas com superfície irregular e uma distribuição com elevado FPF utilizando

impactador em cascata, sugerindo a adequabilidade do uso desta formulação para a administração pulmonar (71).

Cheow e coautores (2011) realizaram a secagem de uma suspensão de nanopartículas poliméricas de PCL, PVA ou manitol e levofloxacino como fármaco modelo, por *spray-freeze-drying*. Os resultados obtidos mostraram que quando o manitol é utilizado como adjuvante de secagem, as nanopartículas estão dispersas na matriz de manitol. Por outro lado, quando o PVA é utilizado como adjuvante de secagem, as partículas estão revestidas pelo PVA e partículas com maior rendimento e melhor redispersão são obtidas, sendo a formulação mais adequada (72).

Em um estudo proposto por El-Sherbiny (2012) foram preparadas nanopartículas de PLGA, para encapsular curcumina como fármaco modelo, com superfície modificada com um copolímero de PEG e quitosana utilizando *spray-drying* visando à administração pulmonar. Neste estudo foi possível obter pós-secos de um novo sistema nano-micro com características aerodinâmicas adequadas para a administração pulmonar da curcumina (73).

Em 2011, Lehardt e colaboradores desenvolveram nanopartículas poliméricas, nebulizadas em *spray-dryer*, sem surfactantes. A estratégia utilizada foi preparar nanopartículas de PLGA e realizar a secagem com 3 diferentes tipos de adjuvantes: manitol, lactose, α - ciclodextrina (CD), formando microagregados de nanopartículas. Os resultados mostraram pós-secos com boas características aerodinâmicas para administração pulmonar. No entanto, o uso da CD gerou a forma sólida de melhor capacidade de redispersão das partículas em água sem alteração no diâmetro da partícula primária e melhor performance aerosol (74).

O trabalho desenvolvido por Tewes e co-autores (2010) avaliou o uso de nanopartículas poliméricas para liberação pulmonar de peptídeos e proteínas. Foi desenvolvida uma formulação, obtida na forma de pó por *spray-drying*, composta por polietilenoglicol (PEG) linear ou ramificado, PVP como estabilizante e calcitonina como peptídeo modelo. Os autores demonstraram que quando o PEG ramificado era utilizado, um diâmetro aerodinâmico maior era obtido, além de um FPF muito baixo. Por outro lado, quando o PEG linear era utilizado, valores de diâmetro aerodinâmico e FPF, menor e maior,

respectivamente, eram obtidos, mostrando a adequabilidade do sistema obtido para liberação pulmonar de proteínas e peptídeos (75).

Outra abordagem para administração pulmonar de peptídeos e proteínas foi estudada por Schoubben e colaboradores (2009). Neste trabalho, os autores desenvolveram pós-secos por homogeneização à alta pressão, seguido de secagem por aspersão. Partículas de PLGA para encapsulação da capreomicina foram desenvolvidas, visando o tratamento da tuberculose por inalação. Os resultados obtidos mostraram partículas com tamanho em torno de 6 μm , estando ligeiramente fora da faixa recomendada para a administração pulmonar. No entanto, os autores concluem que, mesmo o tamanho estando fora da faixa adequada, análise realizada por espectroscopia de correlação de fótons, existe uma parte da população das partículas com diâmetro $< 5 \mu\text{m}$. Este resultado foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura – MEV, mostrando adequabilidade para administração pulmonar de capreomicina (76).

Um trabalho desenvolvido por Wang e co-autores (2012) propôs o desenvolvimento de uma sistema nanoparticulado híbrido, formado por lipídios e polímeros, secos por *spray-drying*, visando a via pulmonar. Essas nanopartículas poliméricas eram formadas por PLGA (polímero), lecitina (lipídio) e levofloxacino como fármaco modelo. A secagem desta formulação nanoestruturada gerou microaglomerados de nanopartículas usando diferentes tipos de adjuvantes de secagem (manitol, PVA e leucina). Os resultados mostraram que para o ensaio de redispersão dos pós em água, o melhor desempenho foi quando o PVA foi utilizado, quando comparado ao manitol. Por outro lado, quando a leucina foi utilizada como suporte de secagem, foi a melhor formulação em termos de aerolização e redução na agregação das nanopartículas nos microaglomerados. As conclusões do trabalho foram que o uso do PVA, como adjuvante de secagem, apresentou um melhor desempenho, em termos de reconstituição, mas que, no entanto, foi essencial o uso da leucina, juntamente com o PVA, para obtenção de uma formulação final para inalação com boas propriedades de aerolização, tamanho, rendimento, fluidez e reconstituição dos nanoagregados (77).

Com relação à budesonida, existem poucos trabalhos descritos na literatura quanto à sua nanoencapsulação. O trabalho desenvolvido por Carr e

colaboradores (2011) mostrou que foi possível obter nanoesferas secas contendo budesonida, utilizando água subcrítica (pura ou misturada com álcoois), obtidas por *spray-drying* utilizando lactose ou PEG 400 como adjuvantes de secagem. A partir dos dados obtidos em impactador em cascata foi possível determinar o diâmetro aerodinâmico dessas partículas, que ficou na faixa entre 3 e 6 μm (78).

Jin Oh (2011) desenvolveu nanopartículas poliméricas porosas de PLGA, para a encapsulação da budesonida. Essas partículas foram secas por *spray-drying* visando a inalação desses pós-secos na forma de DPI, para o tratamento da asma. Os resultados obtidos mostraram a estruturação destas partículas na forma de microaglomerados de nanopartículas, assim como anteriormente descrito. Além disso, foi possível evidenciar que as características aerodinâmicas dos microaglomerados foram adequadas para a administração pulmonar e os testes *in vivo*, em modelos animais de asma, mostraram uma redução nas células inflamatórias, no fluido de lavagem bronco alveolar (BALF), além de redução da hiper-reatividade bronquial, quando a budesonida foi utilizada na forma nanoencapsulada (79).

Outro trabalho visou à preparação de uma nanossuspensão de budesonida pelo método de precipitação, com posterior liofilização para a obtenção de partículas sólidas. Estas partículas apresentaram um diâmetro geométrico de aproximadamente 4 μm e um diâmetro aerodinâmico de aproximadamente 2 μm (10).

3.6 Cultura Celular: citotoxicidade e captação celular

O uso da cultura celular é de grande importância no desenvolvimento de novos fármacos, medicamentos e formulações farmacêuticas. Os protocolos de cultivo celular para avaliar diversos aspectos referentes a novos medicamentos, fármacos ou formulações farmacêuticas têm grande aceitação na indústria farmacêutica devido as diversas vantagens oferecidas como a rapidez nos resultados (14, 15). O uso dos diversos testes realizados em linhagens celulares apresenta importantes vantagens, como: 1) são necessárias pequenas quantidades do material testado; 2) fácil manuseio, reprodutibilidade e economicamente favorável; 3) as condições ambientais (pH, temperatura)

podem ser controladas, entre outras. Por outro lado, o uso da cultura celular apresenta algumas limitações importantes, como: 1) as linhagens utilizadas são, geralmente, um único tipo de células; 2) nem todas as linhagens formam “tight junctions”; 3) os ciclos celulares podem não ser representativos (14). O desenvolvimento da cultura celular de monocamadas de células epiteliais para poder mimetizar as vias aéreas superiores e região alveolar têm sido foco nas pesquisas, nos últimos 15 anos. As principais técnicas desenvolvidas em cultura celular permitem avaliar aspectos muito importantes no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, quando em contato com o epitélio, como: 1) ligação de novos fármacos ao tecido; 2) internalização celular; 3) mecanismos de transporte celular (incluindo: taxa de internalização e mecanismo); 4) metabolismos nos pulmões (14-17).

O epitélio das vias aéreas superiores é constituído por, pelo menos, 6 tipos de células epiteliais: ciliadas, clara, Goblet (muco), serosas, basal, granulada de núcleo denso. A interface célula – ar, nas vias aéreas superiores é majoritariamente formada por células ciliadas colunares intercaladas por células de Goblet. Essa região é a responsável pelo contato de todas as substâncias que poderão ser internalizadas pelo epitélio pulmonar. Já as vias aéreas inferiores, são formadas por células ciliadas cuboídes intercaladas por células clara (14, 15).

Muitas linhagens celulares podem reproduzir (*in vitro*), com grande fidelidade, propriedades do epitélio do trato respiratório. Entre as principais linhagens celulares pulmonares, destacam-se a 16HBE14o2 e a Calu-3 como sendo modelos para ensaios de absorção e a BEAS-2B como modelo de metabolismo de fármacos (14). A Calu-3 é uma das mais importantes e utilizadas linhagens celulares para avaliação de novos fármacos e formulações para o trato respiratório. Essa linhagem é representativa na região das vias aéreas superiores, é produtora de muco e desenvolve função barreira (*tight junctions*) (80, 81).

Como alternativa ao uso da Calu-3, o uso de uma nova linhagem celular bronquial epitelial tem sido alvo da pesquisa em cultura celular. A linhagem H441 foi originalmente isolada do fluido pericardial de um paciente com adenocarcinoma pulmonar e apresenta características de células do tipo clara,

semelhante às encontradas no epitélio bronquiolar. Possui características importantes no desenvolvimento de novos protocolos para avaliação da absorção, transporte, metabolismo e de toxicidade. Uma característica importante desta linhagem celular é que quando cultivada em suporte semi-permeável é capaz de formar monocamada (*tight junctions*) servindo como um adequado modelo de transporte celular através do epitélio. Salomon e colaboradores (2014) mostraram a capacidade da linhagem H441 de servir como modelo de monocamada para avaliar a permeação da rodamina 123 (16).

Outra linhagem importante para a avaliação do metabolismo celular frente novos fármacos e formulações farmacêuticas é linhagem de monócitos THP-1. Essa linhagem foi isolada há mais de 30 anos e é de grande relevância, pois, quando tratada adequadamente, se diferencia em macrófagos funcionais (82, 83). O processo de diferenciação em macrófagos a partir da linhagem THP-1 é bem descrito na literatura. O tratamento da linhagem THP-1, que se encontra em suspensão no meio de cultura, com o composto "*phorbol-12-myristate-13-acetate* – PMA" por 48 horas, proporciona a diferenciação em macrófagos aderentes. A confirmação desta diferenciação ocorre por visualização em microscópio, onde é possível verificar a diferença morfológica, (THP-1 – esférica e macrófagos – forma estrelada), também por expressão de proteínas específicas (82-84). Essa linhagem celular quando diferenciada em macrófagos é muito utilizada para experimentos de toxicidade e captação celular. Um dos ensaios realizados é a quantificação do fator de necrose tumoral alfa (TNF – α) após um processo inflamatório (83).

Diante do que foi exposto, é de extrema importância e relevância o uso da nanotecnologia associada à terapêutica da asma, usando a budesonida como fármaco de escolha, juntamente com a tecnologia do desenvolvimento de pós-secos para inalação (*Dry powders inhalers* - DPI) visando um melhoramento no tratamento da asma frente às terapias convencionais utilizadas hoje em dia.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Poli(ϵ -caprolactona) Mw: 85000 (Sigma);
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) (Sigma);
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80) (Oxiten);
- Triglicerídeos de cadeia média (TCM) – Brasquin;
- Budesonida (Pharmanostra);
- Leucina (DEG);
- Lactose (Delaware);
- Maltodextrina (Delaware);
- Busonid[®] (Biossintética/Ache).
- H441 (ATCC, EUA)
- THP-1 (ATCC, EUA)
- Alarmer Blue[®]
- ELISA kit – TNF – α (Millipore)
- RPMI 1640 – meio de cultura
- Soro fetal bovino (FBS) - Sigma
- L-glutamina (Sigma)
- Piruvato de sódio (Sigma)
- Penicilina e streptomina (Sigma)
- Lipopolissacarídeos (LPS) - Sigma

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica (Shimadzu);
- Centrífuga eppendorf (5417R);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE (Shimadzu);
- Evaporador rotatório (Büchi);
- Zetasizer – NanoZS ZEN3600 (Malvern);
- Mastersizer 2000 (Malvern);
- Microscópio eletrônico de varredura – MEV (Jeol);
- Mini Spray Dryer B-290 (Büchi);
- Ultrasson (Ultra Cleaner 1400A – Unique);

- Impactador em cascata de Andersen tipo multi estágio ACI-MDI 1000 (Erweka);

- Pletismógrafo de corpo inteiro invasivo (Sistema Buxco);
- Microscópio ótico BX50 (Olympus);
- Espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices);

4.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetonitrila grau HPLC (Tedia);
- Acetona (Nuclear);
- Água Milli-Q;
- Membrana filtrante 0,45 μm de poro (Millipore);
- Coluna cromatográfica Luna C18 (150 x 4,6 mm x 5 μm) (Phenomenex);
- *Stubs* de alumínio;
- Placa para cultivo celular de 96, 24, 6 poços;

A partir desta página (63) até a página 143, os dados foram suprimidos, pois ainda não foram publicados.

7. Referências Bibliográficas

1. Fishman AP. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. 8th Edition ed2008.
2. Frijlink HW, De Boer AH. Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004 Nov;1(1):67-86.
3. Hamishehkar H, Emami J, Najafabadi AR, Gilani K, Minaiyan M, Hassanzadeh K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of controlled release insulin loaded PLGA microcapsules using dry powder inhaler in diabetic rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition.* 2010;31(2-3):189-201.
4. Zhang X, Ma Y, Zhang L, Zhu J, Jin F. The development of a novel dry powder inhaler. *Int J Pharm.* 2012 Jul 15;431(1-2):45-52.
5. Islam N, Cleary MJ. Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery--a review for multidisciplinary researchers. *Med Eng Phys.* 2012 May;34(4):409-27.
6. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* 2010 Jun 15;392(1-2):1-19.
7. Fixman ED, Stewart A, Martin JG. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J.* 2007 Feb;29(2):379-89.
8. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):445-54.
9. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008 Jun;38(6):872-97.
10. El-Gendy N, Gorman EM, Munson EJ, Berkland C. Budesonide nanoparticle agglomerates as dry powder aerosols with rapid dissolution. *J Pharm Sci.* 2009 Aug;98(8):2731-46.
11. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2002;19(2):99-134.
12. Guterres SS, Beck RCR, Pohlmann AR. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. *Braz J Phys.* [Article; Proceedings Paper]. 2009 Apr;39(1A):205-9.
13. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res.* 2009 May;26(5):1025-58.

14. Forbes B, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Jul;60(2):193-205.
15. Forbes B. Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Science & Technology Today.* 2000;3(1):18-27.
16. Salomon JJ, Muchitsch VE, Gausterer JC, Schwagerus E, Huwer H, Daum N, et al. The Cell Line NCI-H441 Is a Useful in Vitro Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier. *Mol Pharm.* [Article]. 2014 Mar;11(3):995-1006.
17. Salomon JJ, Galeron P, Schulte N, Morow PR, Severynse-Stevens D, Huwer H, et al. Biopharmaceutical in vitro characterization of CPZEN-45, a drug candidate for inhalation therapy of tuberculosis. *Ther Deliv.* 2013 Aug;4(8):915-23.
18. Kandjov IM. Heat and Water Rate Transfer Processes in the Human Respiratory Tract at Various Altitudes. *Journal of Theoretical Biology.* 2001;208(3):287-93.
19. Jardins TD. *Cardiopulmonary Anatomy & Physiology - Essentials for Respiratory Care.* Fifth Edition ed. Illinois 2008.
20. Blomberg LA, Chan WY, Clerch LB, Massaro D. Molecular cloning and characterization of a novel gene upregulated early during postnatal rat lung development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 2002;1574(3):391-8.
21. Naini AS, Patel RV, Samani A. Measurement of Lung Hyperelastic Properties Using Inverse Finite Element Approach. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on.* 2011;58(10):2852-9.
22. Grenha A, Seijo B, Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Jul-Aug;25(4-5):427-37.
23. El-Sherbiny IM, McGill S, Smyth HD. Swellable microparticles as carriers for sustained pulmonary drug delivery. *J Pharm Sci.* 2010 May;99(5):2343-56.

24. Aoki Y, Kojo Y, Yamada S, Onoue S. Respirable dry powder formulation of bleomycin for developing a pulmonary fibrosis animal model. *J Pharm Sci.* 2012 Jun;101(6):2074-81.
25. Mueannoom W, Srisongphan A, Taylor KMG, Hauschild S, Gaisford S. Thermal ink-jet spray freeze-drying for preparation of excipient-free salbutamol sulphate for inhalation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2012 Jan;80(1):149-55.
26. Pilcer G, Wauthoz N, Amighi K. Lactose characteristics and the generation of the aerosol. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Mar 15;64(3):233-56.
27. D'Addio SM, Chan JGY, Kwok PCL, Prud'homme RK, Chan HK. Constant size, variable density aerosol particles by ultrasonic spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics.* 2012 May;427(2):185-91.
28. Hira D, Okuda T, Ichihashi M, Kojima H, Okamoto H. Development of Dry Salbutamol Sulfate Powder with High Inhalation Performance Independent of Inhalation Patterns. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 2012 Mar;60(3):334-40.
29. Amaro MI, Tajber L, Corrigan OI, Healy AM. Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporous microparticles (NPMPs) intended for inhalation. *Int J Pharm.* 2011 Dec 12;421(1):99-109.
30. Sansone F, Aquino RP, Gaudio PD, Colombo P, Russo P. Physical characteristics and aerosol performance of naringin dry powders for pulmonary delivery prepared by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2009;72(1):206-13.
31. Willis L, Hayes D, Jr., Mansour HM. Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. *Lung.* 2012 Jun;190(3):251-62.
32. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO, 3rd. Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? *Int J Pharm.* 2011 Mar 15;406(1-2):1-10.
33. Dandekar P, Venkataraman C, Mehra A. Pulmonary targeting of nanoparticle drug matrices. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010 Dec;23(6):343-53.

34. Sou T, Orlando L, McIntosh MP, Kaminskas LM, Morton DA. Investigating the interactions of amino acid components on a mannitol-based spray-dried powder formulation for pulmonary delivery: A design of experiment approach. *Int J Pharm.* 2011 Dec 15;421(2):220-9.
35. Vehring R, Foss WR, Lechuga-Ballesteros D. Particle formation in spray drying. *J Aerosol Sci.* [Article]. 2007 Jul;38(7):728-46.
36. de Boer AH, Wissink J, Hagedoorn P, Heskamp I, de Kruijf W, Bunder R, et al. In vitro performance testing of the novel Medspray wet aerosol inhaler based on the principle of Rayleigh break-up. *Pharm Res.* 2008 May;25(5):1186-92.
37. Park C-W, Li X, Vogt FG, Hayes Jr D, Zwischenberger JB, Park E-S, et al. Advanced spray-dried design, physicochemical characterization, and aerosol dispersion performance of vancomycin and clarithromycin multifunctional controlled release particles for targeted respiratory delivery as dry powder inhalation aerosols. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013;455(1–2):374-92.
38. Chow AH, Tong HH, Chattopadhyay P, Shekunov BY. Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharm Res.* 2007 Mar;24(3):411-37.
39. Moore WC. Update in Asthma 2007. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2008 2008/05/15;177(10):1068-73.
40. Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest.* 2010 Aug;138(2 Suppl):4S-10S.
41. Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S95-102.
42. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature.* 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B12-7.
43. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol.* 2011 Sep;32(9):402-11.
44. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007 Jul;37(7):973-88.

45. Hirano Y, Shichijo M, Ikeda M, Kitaura M, Tsuchida J, Asanuma F, et al. Prostanoid DP receptor antagonists suppress symptomatic asthma-like manifestation by distinct actions from a glucocorticoid in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep;666(1-3):233-41.
46. Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir Med.* 2006 Aug;100(8):1307-17.
47. Samaras K, Pett S, Gowers A, McMurchie M, Cooper DA. Iatrogenic Cushing's syndrome with osteoporosis and secondary adrenal failure in human immunodeficiency virus-infected patients receiving inhaled corticosteroids and ritonavir-boosted protease inhibitors: six cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jul;90(7):4394-8.
48. Andrade F, Rafael D, Videira M, Ferreira D, Sosnik A, Sarmiento B. Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2013;65(13–14):1816-27.
49. Horn D, Rieger J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase-Theory, Experiment, and Use. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2001 Dec 3;40(23):4330-61.
50. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 2010;385(1–2):113-42.
51. Jager E, Venturini CG, Poletto FS, Colome LM, Pohlmann JP, Bernardi A, et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol.* 2009 Feb;5(1):130-40.
52. Venturini CG, Jager E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, et al. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp.* [Article]. 2011 Feb;375(1-3):200-8.
53. Tewa-Tagne P, Briancon S, Fessi H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. *Int J Pharm.* 2006 Nov 15;325(1-2):63-74.
54. Tewa-Tagne P, Briancon S, Fessi H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterisation. *Eur J Pharm Sci.* 2007 Feb;30(2):124-35.

55. Nandiyanto ABD, Okuyama K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*. 2011;22(1):1-19.
56. Muller CR, Bassani VL, Pohlmann AR, Michalowski CB, Petrovick PR, Guterres SS. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug Dev Ind Pharm*. 2000 Mar;26(3):343-7.
57. Beck RC, Ourique AF, Guterres SS, Pohlmann AR. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2012 Dec;6(3):195-208.
58. Muller B, Rasenack N. Method for the production and the use of microparticles and nanoparticles by constructive micronisation. *Google Patents*; 2005.
59. Magdassi S, Netivi H, Goshen K. Organic nanoparticles obtained from microemulsions by solvent evaporation. *Google Patents*; 2008.
60. Guterres SS, Pohlmann, A. R., Dalla Costa, T., Bassani, V., Müller, C.R. , inventor Processo de secagem de suspensões coloidais de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas por aspersão 1999.
61. Muller CR, Bassani VL, Pohlmann AR, Michalowski CB, Petrovick PR, Guterres SS. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug Dev Ind Pharm*. [Article]. 2000;26(3):343-7.
62. Guterres SS, Weiss V, Freitas LD, Pohlmann AR. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Deliv*. [Article]. 2000 Oct-Dec;7(4):195-9.
63. Guterres SS, Muller CR, Michalowski CB, Pohlmann AR, Dalla Costa T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *STP Pharma Sci*. [Article]. 2001 May-Jun;11(3):229-33.
64. Pohlmann AR, Weiss V, Mertins O, da Silveira NP, Guterres SS. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres:

development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur J Pharm Sci.* [Article]. 2002 Sep;16(4-5):305-12.

65. Beck RCR, Pohlmann AR, Benvenuti EV, Costa TD, Guterres SS. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: Preparation, morphological characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance. *J Braz Chem Soc.* [Article]. 2005 Nov-Dec;16(6A):1233-40.

66. Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. *J Microencapsul.* [Article]. 2004 Aug;21(5):499-512.

67. Schaffazick SR, Adriana RPA, Graziela MA, Guterres SS. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *J Braz Chem Soc.* [Article]. 2006 May-Jun;17(3):562-9.

68. Tewa-Tagne P, Degobert G, Briancon S, Bordes C, Gauvrit JY, Lanteri P, et al. Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: Formulation and process variables optimization using experimental designs. *Pharm Res.* [Article]. 2007 Apr;24(4):650-61.

69. Tewa-Tayne P, Briancon S, Fessi H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. *Eur J Pharm Sci.* [Article]. 2007 Feb;30(2):124-35.

70. Domingues GS, Guterres SS, Beck RCR, Pohlmann AR. NANOCAPSULE-COATED MICROPARTICLES PREPARED IN ONE STEP: CHARACTERIZATION AND IN VITRO DRUG RELEASE PROFILES EVALUATION. *Quim Nova.* [Article]. 2008;31(8):1966-72.

71. Beck-Broichsitter M, Schweiger C, Schmehl T, Gessler T, Seeger W, Kissel T. Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. *J Control Release.* 2012 Mar 10;158(2):329-35.

72. Cheow WS, Ng ML, Kho K, Hadinoto K. Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: effect of freeze-drying adjuvants. *Int J Pharm.* 2011 Feb 14;404(1-2):289-300.

73. E-Sherbiny IM, Smyth HDC. Controlled Release Pulmonary Administration of Curcumin Using Swellable Biocompatible Microparticles. *Mol Pharm.* [Article]. 2012 Feb;9(2):269-80.
74. Lehardt T, Roesler S, Uusitalo HP, Kissel T. Surfactant-free redispersible nanoparticles in fast-dissolving composite microcarriers for dry-powder inhalation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 May;78(1):90-6.
75. Tewes F, Tajber L, Corrigan OI, Ehrhardt C, Healy AM. Development and characterisation of soluble polymeric particles for pulmonary peptide delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Oct 9;41(2):337-52.
76. Schoubben A, Blasi P, Giovagnoli S, Ricci M, Rossi C. Simple and scalable method for peptide inhalable powder production. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Jan 31;39(1-3):53-8.
77. Wang Y, Kho K, Cheow WS, Hadinoto K. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2012 Mar 15;424(1-2):98-106.
78. Carr AG, Mammucari R, Foster NR. Particle formation of budesonide from alcohol-modified subcritical water solutions. *International Journal of Pharmaceutics.* 2011;405(1-2):169-80.
79. Oh YJ, Lee J, Seo JY, Rhim T, Kim SH, Yoon HJ, et al. Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model. *J Control Release.* 2011 Feb 28;150(1):56-62.
80. Florea BI, Cassara ML, Junginger HE, Borchard G. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *J Control Release.* 2003 Feb 21;87(1-3):131-8.
81. Foster KA, Avery ML, Yazdanian M, Audus KL. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* 2000 Nov 4;208(1-2):1-11.
82. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis.* 2012 Mar;221(1):2-11.

83. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1):e8668.
84. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*. [journal article].56(1):45-50.
85. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. NANOCAPSULE FORMATION BY INTERFACIAL POLYMER DEPOSITION FOLLOWING SOLVENT DISPLACEMENT. *International Journal of Pharmaceutics*. [Note]. 1989 Oct;55(1):R1-R4.
86. Poletto FS, Fiel LA, Lopes MV, Schaab G, Gomes AMO, Guterres SS, et al. Fluorescent-Labeled Poly(ϵ -caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012;1(1):89-98.
87. Gervelas C, Serandour AL, Geiger S, Grillon G, Fritsch P, Taulelle C, et al. Direct lung delivery of a dry powder formulation of DTPA with improved aerosolization properties: Effect on lung and systemic decorporation of plutonium. *Journal of Controlled Release*. [Article]. 2007 Mar;118(1):78-86.
88. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):766-75.
89. Li FQ, Yan C, Bi J, Lv WL, Ji RR, Chen X, et al. A novel spray-dried nanoparticles-in-microparticles system for formulating scopolamine hydrobromide into orally disintegrating tablets. *Int J Nanomed*. [Article]. 2011;6:897-904.
90. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO. Influence of particle size on regional lung deposition - What evidence is there? *International Journal of Pharmaceutics*. [Review]. 2011 Mar;406(1-2):1-10.
91. Adi S, Adi H, Chan HK, Tong ZB, Yang RY, Yu AB. Effects of mechanical impaction on aerosol performance of particles with different surface roughness. *Powder Technol*. [Article]. 2013 Feb;236:164-70.

92. Chan HK. Dry powder aerosol drug delivery - Opportunities for colloid and surface scientists. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp.* [Article; Proceedings Paper]. 2006 Aug;284:50-5.
93. Fontana MC, Durli TL, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: One-step preparation and in vitro lung deposition. *Powder Technol.* 2014;258:49-59.
94. Ortiz M, Jornada DS, Pohlmann AR, Guterres SS. Development of Novel Chitosan Microcapsules for Pulmonary Delivery of Dapsone: Characterization, Aerosol Performance, and In Vivo Toxicity Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2015 Oct;16(5):1033-40.
95. Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonide in asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):32-6.
96. Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Inhaled budesonide decreases airway inflammatory response to allergen. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Sep;162(3 Pt 1):883-90.
97. Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, Otis J, Gwozd C, Gauvreau GM, et al. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2):349-56 e13.

A partir desta página (159) até a página 188, o conteúdo foi suprimido, pois se trata de conteúdo sigiloso.



