

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

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoïdãna produzidas por *spray-drying* para administração pulmonar

Max Seidy Saito

Porto Alegre, 2019



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

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo ácido acetil salicílico associado à fucoïdãna produzidas por *spray-drying* para administração pulmonar

Tese apresentada por **Max Seidy Saito**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Sílvia Staniçuaski Guterres

Porto Alegre, 2019

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dr. Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### CIP - Catalogação na Publicação

Saito, Max

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoidana produzidas por spray-drying para administração pulmonar / Max Saito. -- 2019.

299 f.

Orientadora: Silvia Staniçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Nanotecnologia. 2. Microtecnologia. 3. Trombose. 4. Hemostasia. I. Guterres, Silvia Staniçuaski, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de nanotecnologia do Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento da CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



Aos meus pais que desistiram de  
muitas coisas e possibilitaram que eu  
conquistasse tudo que tenho hoje



## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Liliana Lurico Yanase Saito, pela dedicação na criação, pela possibilidade de crescimento com tudo que eu poderia pedir. Pelo amor, pelo afeto e pelo carinho dedicado, me tornando a pessoa que sou hoje.

Ao meu pai, Jorge Massami Saito, pela influência, pelo amor, pelo afeto, pelo carinho e pela dedicação de que eu pudesse ter tudo que preciso ter para ser uma pessoa com todas as possibilidades do mundo. Sem vocês, eu não seria nada do que sou hoje e nem teria orgulho de ter crescido com vocês.

A minha família, em especial ao meu irmão Alex Eije Saito, pelo companheirismo, pelo carinho e por me fazer entender a definição de irmão. A minha avó, Kazuko Yanase e tia, Helena Yanase, por todo o amor dedicado.

A minha namorada, Brenda Ai Refosco Takagi, por aguentar todas as crises, todos os momentos tristes. Por me fazer apreciar os momentos felizes e descobrir, então, como um amor verdadeiro precisa ser.

A professora doutora Silvia Staniçuaski Guterres, por acreditar em mim, mesmo sem conhecer. Acreditar na ideia desta tese desafiadora e sempre me auxiliar a crescer profissionalmente.

A professora doutora Adriana Raffin Pohlmann, por dedicar o tempo em me auxiliar nesse período, com dicas e apoios.

A professora doutora Karina Paese, por, muitas vezes, me auxiliar a ver saídas que eu ainda não havia encontrado.

A pós-doutoranda Kelly Cristine Zatta, pelo companheirismo, pela ajuda, pelas horas em experimentos, pela repetição desses experimentos, pelo crescimento e por tantas outras coisas mais que tornarão esse doutorado inesquecível.

Aos amigos de laboratório, Aline Alves, Ana Ortega, Andrey Morawski, Andréia Härter, João de Marchi, Flávia Peña, Franciele Bruismann, Gabryelle Almeida, Giovana Onzi, Juliana Santos, Lana Baron, Luiza Frank, Mariana Fin, Rafaela Gazzi, Rodrigo Cé, Talita Casarini, Thaniele, Thayse e todos os outros que passaram em minha vida. Um carinho especial para Taiane Ciochetta e Danielei Dallemole, por me auxiliar a crescer, pessoal e profissional, levando para a vida toda essa amizade.

As colaborações, com o professor doutor Plínio Cunha Sathler, da UFRJ, com a doutoranda Priscila da UFRJ, com a professora doutora Nadia Campos de Oliveira Miguel, da UFRJ, ao professor Markus Berger de Oliveira, do HCPA-UFRGS.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pela dedicação em avaliar a presente tese.

Aos amigos feitos no caminho e aos amigos antigos, todos com sua parcela em meu coração.

Para todos os pesquisadores, alunos e entusiastas da ciência, que acreditam em melhorias, que tem fé e confiam que a educação é a salvação para períodos mais obscuros.

Para todas as pessoas, que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho mesmo com todas as dificuldades existentes.

Agradeço também as agências de fomento, CAPES e CNPq e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS.



*Happiness is only real when shared"*

*Christopher MacCandless*



## RESUMO

A hemostasia é definida como um processo fisiológico que mantém o estado líquido e circulante do sangue com indução de um tampão hemostático em caso de lesão vascular. A perda da integridade deste sistema pode gerar diversos quadros patológicos, tais como os distúrbios trombóticos (ex: aterotrombose e tromboembolismo venoso), que representam as causas mais frequentes de morbidade e mortalidade mundial. A agregação plaquetária é um dos principais eventos envolvidos no processo de formação do trombo vascular. De modo preocupante, os agentes antiagregantes plaquetários disponíveis atualmente no mercado exibem diversos efeitos indesejáveis à saúde do paciente levando à desistência do tratamento, o que reforça a importância do desenvolvimento de novas formulações administradas por vias alternativas. No presente trabalho, visando a utilização de microtecnologia, propomos o desenvolvimento de pós respiráveis contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoídano produzidas *por spray-drying* para administração pulmonar e sua caracterização *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. Foram desenvolvidas três formulações pulverulentas com diferentes adjuvantes de secagem (hidroxipropilmetilcelulose, L-leucina e quitosana) utilizando o ácido acetilsalicílico como fármaco antiagregante plaquetário e a fucoídano, um polissacarídeo natural para direcionamento aos locais lesionados passíveis de desenvolverem distúrbios trombóticos. As formulações foram inicialmente avaliadas quanto a parâmetros físicos e químicos, com rendimentos do processo de secagem de cerca de 50% e tamanhos de 1,4 a 2,6 µm. A análise morfológica evidenciou que as partículas exibiram superfície levemente rugosa. Entretanto, os resultados de estabilidade não foram satisfatórios para as formulações utilizando quitosana ou L-leucina, sendo selecionada apenas a formulação com hidroxipropilmetilcelulose para os ensaios posteriores (MP/F4M). Com isso, foi possível quantificar a fucoídano presente na formulação MP/F4M comparável ao polissacarídeo livre e determinar o perfil de liberação *in vitro* do ácido acetilsalicílico utilizando pó coeso em diferentes meios, com o patenteamento do aparato desenvolvido, demonstrando uma liberação controlada quando comparada ao fármaco livre. Além disso, foi determinado transporte do tipo anômalo pela modelagem matemática deste perfil de liberação. Adicionalmente, foi caracterizado o perfil aerodinâmico *in vitro* da formulação MP/F4M, detectando propriedades aerodinâmicas adequadas para administração pulmonar visando deposição média a

profunda. Com relação ao perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína, a formulação proposta apresentou propriedades mucoadesivas. Para os ensaios antihemostáticos *in vitro*, foi evidenciada ação antiagregante plaquetária da formulação MP/F4M comparável ao fármaco livre e para os ensaios *in vivo*, foi observado que não houve formação de trombose arterial após indução, com reduzido tempo de sangramento, sem alterar a estrutura dos órgãos na análise histopatológica. Com isso, foi desenvolvida uma formulação para secagem por aspersão baseada em micropartículas contendo ácido acetilsalicílico, fucoidana, L-lisina e hidroxipropilmetilcelulose, denominada de MP/F4M e os resultados *in vitro* revelaram potencial capacidade de administração por via pulmonar, devido à seus parâmetros físicos e químicos, propriedades mucoadesivas e de liberação controlada, além dos ensaios antihemostáticos/ antitrombóticos *in vitro* e *in vivo* evidenciarem a possível utilização desta formulação para tratamento de quadros trombóticos.

**Palavras-chave:** antiagregantes plaquetários, trombose, micropartículas, ácido acetilsalicílico, fucoidana, hidroxipropilmetilcelulose, administração pulmonar

## ABSTRACT

### **Development and characterization of microparticles containing acetylsalicylic acid associated with fucoidan produced via spray-drying for pulmonary administration**

Hemostasis is defined as a physiological process that maintain the current liquid state of the blood and induce a hemostatic plug in case of vascular injury. Losing the integrity of that system can lead to pathological conditions, such as thrombotic disorders (e.g. atherothrombosis and venous thromboembolism), which represent the most frequent cause of morbidity and mortality worldwide. Platelet aggregation is one of the main events involved in the formation of a vascular thrombus. Unfortunately, the commercially available antiplatelet agents exhibit a number of undesirable effects on patient health resulting in treatment withdrawal, which reinforces the importance of developing new formulations and administration alternatives. In the present study, aiming to use microtechnology, we propose the development of inhalable powders containing acetylsalicylic acid (as antiplatelet drug) associated with fucoidan (a natural polysaccharide to target injured sites that may develop thrombotic disorders) produced by spray-drying for pulmonary administration and *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* characterization. Three powdery formulations with different adjuvants (hydroxypropylmethylcellulose, L-leucine and chitosan) were prepared and these formulations were initially evaluated for physicochemical parameters, with drying process yields of about 50%, microparticles sizes ranged from 1.4 to 2.6  $\mu\text{m}$  and morphological analysis showing that all formulations exhibited a slightly rough surface. However, stability of acetylsalicylic acid was not satisfactory for formulations using chitosan or L-leucine, only the hydroxypropylmethylcellulose (MP/F4M) formulation was selected for the subsequent assays. Thereby, it was possible to quantify the fucoidan present in the MP/F4M formulation, determine acetylsalicylic acid *in vitro* dissolution profile using cohesive powder in different media demonstrating a controlled release when compared to free drug, with patent deposit for the developed method and apparatus. In addition, a mathematical modeling determined anomalous transport for this dissolution profile. Additionally, *in vitro* aerodynamic profile of MP/F4M formulation was characterized, demonstrating suitable aerodynamics property for medium to deep deposition in the lungs after pulmonary administration. Regarding the

*in vitro* washability profile in porcine esophageal mucosa, the proposed formulation presented mucoadhesive properties. For *in vitro* antihemostatic assays, antiplatelet profile of MP/F4M was comparable to free drug and for *in vivo* assays it was not detected arterial thrombosis after induction, with reduced bleeding time and no changes in the organs structure of these animals was observed. Therefore, spray dried microparticles containing acetylsalicylic acid, fucoidan, L-lysine and hydroxypropyl methylcellulose (MP/F4M) was developed. The *in vitro* results revealed potential pulmonary administration due to its physicochemical parameters, mucoadhesive properties and controlled release, as well as *in vitro* and *in vivo* antihemostatic /antithrombotic assays showing possible use for this formulation to treat thrombotic conditions.

Keywords: platelet antiaggregants, thrombosis, microparticles, acetylsalicylic acid, fucoidan, hydroxypropyl methylcellulose, pulmonary administration

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Figura esquemática de microcápsulas e microesfera. As microcápsulas apresentam parede sólida, demonstrada pelos círculos pretos em torno de um ou mais núcleo(s) – na figura em branco. As microesferas não apresentam membrana ou parede exterior distinguível, demonstrado por círculos de diferentes cores, simbolizando diferentes constituintes. ....	43
<b>Figura 2</b> – Esquema da técnica de secagem por aspersão, demonstrando: 1. Atomização; 2. Contato líquido vapor aquecido e 3. Separação das partículas sólidas do vapor e posterior coleta do produto seco.....	46
<b>Figura 3</b> – Vias de administração e principais vantagens (verde) e desvantagens (vermelho).....	49
<b>Figura 4</b> – Tipos de inaladores, sugestões de uso e particularidades. ....	50
<b>Figura 5</b> – Mecanismos governantes atuando sobre o pó após utilização de um DPI para via pulmonar, desde a região orofaríngea até a região alveolar e capilares.....	53
<b>Figura 6</b> – Principais etapas da hemostasia. ....	54
<b>Figura 7</b> – A hemostasia e a participação das plaquetas na formação do plug hemostático, onde: 1. Vasoconstrição; 2. Adesão das plaquetas ao subendotélio, 3. Mudança de forma da plaqueta com secreção dos grânulos, 4. Interação plaqueta-plaqueta, 5. Depósito da fibrina sobre o tampão plaquetário.....	55
<b>Figura 8</b> – Esquema ilustrativo do modelo clássico da cascata de coagulação, caracterizando as principais etapas proteolíticas com formação de fibrina. ....	57
<b>Figura 9</b> – Via da iniciação, amplificação e propagação da coagulação proposta por ROBERTS <i>et al.</i> , 1998.....	58
<b>Figura 10</b> – Principais causas de mortalidade em todo o mundo.....	60
<b>Figura 11</b> – Formação do trombo venoso, proposto por MACKMAN, 2012.....	62
<b>Figura 12</b> – Trombose arterial e seus constituintes. ....	63
<b>Figura 13</b> – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da fucoidana. ....	68
<b>Figura 14</b> – Esqueleto estrutural de fucoidana extraídas de diversas espécies.....	69
<b>Figura 15</b> – Esquema ilustrativo das principais vias de ativação e agregação plaquetária.....	70
<b>Figura 16</b> – Estrutura química do ácido acetilsalicílico.....	71
<b>Figura 17</b> – Metodologia utilizada para obtenção das micropartículas (MP).....	82

<b>Figura 18</b> – Estabilidade do ácido acetilsalicílico (AAS) com ou sem agente anti-hidrolítico (propilenoglicol).....	103
<b>Figura 19</b> – Esquema ilustrativo do possível arranjo do sistema carreador baseado na formação do complexo por interação iônica (MP). .....	105
<b>Figura 20</b> – Esquema ilustrativo do possível arranjo do sistema carreador baseado na formação de micropartículas por interação iônica com adição do adjuvante de secagem. A linha pontilhada indica possíveis locais de interação iônica. ....	107
<b>Figura 21</b> – Tamanhos de partícula obtidos pela técnica de difração de laser através da análise por volume para as formulações de pós inaláveis com diferentes adjuvantes (n = 3).....	108
<b>Figura 22</b> – Microscopia eletrônica de varredura (MEV): imagens obtidas dos componentes utilizados para obtenção das formulações de micropartículas (MP) em diferentes aumentos. O aumento escolhido foi maior ou menor dependendo do caso para melhor visualização.....	109
<b>Figura 23</b> – Microscopia eletrônica de varredura (MEV): imagens obtidas das formulações após processo de secagem. Aumentos de 100x, 5000x e 10000x. ....	111
<b>Figura 24</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu utilizando diferente ordem e quantidade de solvente (n = 3). Proporção expressa em (v/ v).....	112
<b>Figura 25</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu utilizando diferentes tempos de ultrassom empregando ACN:H <sub>2</sub> O <sub>p</sub> - 50:50 (v/ v) (n = 3).....	113
<b>Figura 26</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu utilizando diferentes temperaturas empregando ACN:H <sub>2</sub> O <sub>p</sub> - 50:50 (v/ v) (n = 3).....	113
<b>Figura 27</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M utilizando diferente ordem e quantidade de solvente (n = 3). Proporção expressa em (v/ v). .	114
<b>Figura 28</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M utilizando diferentes tempos de ultrassom empregando ACN:H <sub>2</sub> O <sub>p</sub> - 50:50 (v/ v) (n = 3).....	114
<b>Figura 29</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M utilizando diferentes temperaturas empregando ACN:H <sub>2</sub> O <sub>p</sub> - 50:50 (v/v) (n = 3).....	115
<b>Figura 30</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Ch utilizando diferente ordem e quantidade de solvente (n = 3). Proporção expressa em (v/ v).....	115
<b>Figura 31</b> – Esquema ilustrativo da extração para determinação da concentração de fármaco nas micropartículas (MP).....	116

<b>Figura 32</b> – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu, MP/Ch e MP/F4M avaliado nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 (n = 3).	117
<b>Figura 33</b> – Esquema ilustrativo resumido do desenvolvimento da formulação MP/F4M. Alguns ensaios foram omitidos e toda metodologia dos ensaios citados aparece no texto.	118
<b>Figura 34</b> – Pureza de pico do ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS).	119
<b>Figura 35</b> – Pureza de pico do ácido acetilsalicílico (AAS) presente na formulação MP/F4M.	119
<b>Figura 36</b> – Recuperação da fucoidana avaliada em três lotes de três dias diferentes da formulação MP/F4M e da formulação sem fucoidana MP/F4Msf. Para efeitos de comparação, foi utilizado água como controle negativo e fucoidana livre como controle positivo.	120
<b>Figura 37</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e fármaco puro em Ringer. Na mesma figura, a linha cinza com quadrado expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco puro durante o tempo de ensaio e a linha preta com triângulo expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco presente na formulação MP/F4M durante o tempo de ensaio.	121
<b>Figura 38</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e fármaco puro em Fluido Pulmonar Simulado (FPS). Na mesma figura, a linha cinza com quadrado expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco puro durante o tempo de ensaio e a linha preta com triângulo expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco presente na formulação MP/F4M durante o tempo de ensaio.	121
<b>Figura 39</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e AAS puro (linha cinza clara pontilhada).	123
<b>Figura 40</b> – Desempenho de deposição do AAS (%) em cada estágio do Impactador em Cascata de Andersen para a formulação MP/F4M e AAS puro e * = p < 0,05.	125
<b>Figura 41</b> – Perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando Fluido Pulmonar Simulado (FPS) como meio receptor	126
<b>Figura 42</b> – Perfil de permeação em mucosa esofágica suína <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando Fluido Pulmonar Simulado (FPS) como meio receptor.	127

<b>Figura 43</b> – Porcentagem de fármaco retido da mucosa após de permeação <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando Fluido Pulmonar Simulado (FPS) como meio receptor. ....	127
<b>Figura 44</b> – Perfil de adsorção de mucina <i>in vitro</i> da formulação MP/F4M e MP/F4M B em concentrações conhecidas de mucina, onde * = $p < 0,05$ .....	128
<b>Figura 45</b> – Avaliação da atividade anticoagulante da fucoídana em diversas concentrações através dos ensaios de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), * = $p < 0,05$ . ....	129
<b>Figura 46</b> – Avaliação da atividade anticoagulante das formulações MP/F4M e MP/Leu através dos ensaios de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). ....	130
<b>Figura 47</b> – Avaliação da atividade pró-agregante plaquetária da fucoídana em diversas concentrações através do ensaio de agregação plaquetária e * = $p < 0,05$ . ....	131
<b>Figura 48</b> – Avaliação da atividade antiagregante plaquetária das formulações MP/F4M e MP/Leu através do ensaio de agregação plaquetária e * = $p < 0,05$ . ....	131
<b>Figura 49</b> - Avaliação da atividade hemolítica <i>in vitro</i> das formulações MP/F4M e MP/F4M B * = $p < 0,05$ .....	132
<b>Figura 50</b> - Avaliação da ligação das plaquetas com diferentes concentrações de fucoídana com proteína recombinante PSGL através do ensaio de adesão plaquetária <i>in vitro</i> . * = $p < 0,05$ . ....	133
<b>Figura 51</b> – Avaliação da ligação das plaquetas com diferentes concentrações da formulação MP/F4M com e sem proteína recombinante PSGL através do ensaio de adesão plaquetária <i>in vitro</i> . * = $p < 0,05$ .....	133
<b>Figura 52</b> – Avaliação da atividade antiagregante plaquetária <i>ex vivo</i> do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando como agonista plaquetária o ADP. * = $p < 0,05$ .....	135
<b>Figura 53</b> – Avaliação da atividade antiagregante plaquetária <i>ex vivo</i> do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando como agonista plaquetário o colágeno. * = $p < 0,05$ .....	135
<b>Figura 54</b> – Avaliação do perfil antitrombótico <i>in vivo</i> do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 6, 24 e 72 horas através da trombose arterial. * = $p < 0,05$ .....	136

<b>Figura 55</b> – Avaliação do perfil antitrombótico <i>in vivo</i> do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M através do tempo de sangramento no tempo de 6 horas ou 72 horas * = $p < 0,05$ .....	137
<b>Figura 56</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do coração dos animais provenientes do tempo de sangramento, evidenciando cardiomiócitos e fibras musculares com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. ....	139
<b>Figura 57</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do estômago dos animais provenientes do tempo de sangramento, evidenciando as vilosidades com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. ....	140
<b>Figura 58</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do intestino dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. ....	141
<b>Figura 59</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do fígado dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura, presença da tríade portal e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. ....	142
<b>Figura 60</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do rim dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos glomérulos renais e espaços glomerulares, com ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. ....	143
<b>Figura 61</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos alvéolos e espaços alveolares e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. ....	144
<b>Figura 62</b> – Fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos alvéolos e espaços alveolares e ausência de hiperemia e hemorragia. (*) = locais de espessamento do septo alveolar com presença de células inflamatórias (fibroblastos, macrófagos ou neutrófilos). ....	145
<b>Figura 63</b> – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação do fármaco AAS (ácido acetilsalicílico) nas micropartículas (MP) (n = 3). ....	173

<b>Figura 64</b> – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação do fármaco AS (ácido salicílico) nas micropartículas (MP) (n = 3). .....	173
<b>Figura 65</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Ringer. ....	174
<b>Figura 66</b> – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação da fucoidana para micropartículas (MP) (n = 3). ....	176
<b>Figura 67</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Ringer. ....	179
<b>Figura 68</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido pulmonar simulado (FPS).....	180
<b>Figura 69</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido lisossomal artificial (ALF). ....	181
<b>Figura 70</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto inicial (0,5 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido gástrico simulado (FGS).....	182
<b>Figura 71</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto inicial (0,5 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido intestinal simulado (FIS).....	183
<b>Figura 72</b> – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação do fármaco AAS (ácido acetilsalicílico) na mucosa esofágica de suíno (n = 3).....	186
<b>Figura 73</b> – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) em meio extrator FPS. ....	187
<b>Figura 74</b> – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantidade de plaquetas no poço versus absorvância a 405 nm (n = 3).....	189

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Condições do processo de secagem (Mini Spray-Dryer B-290®). .....	80
<b>Tabela 2</b> – Constituição das formulações utilizando a técnica de secagem por aspersão. ....	83
<b>Tabela 3</b> – Constituição do Fluido Pulmonar Simulado (FPS), Fluido Lisossomal Artificial (FLA), Ringer, Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Fluido Intestinal Simulado (FIS). ....	87
<b>Tabela 4</b> – Mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas carreadores baseados em hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) de acordo com o expoente de liberação $n$ relacionado à Lei das Potências (SIEPMANN & PEPPAS, 2012). ....	88
<b>Tabela 5</b> – Preparação dos tampões para o ensaio de agregação plaquetária induzida por trombina. ....	95
<b>Tabela 6</b> – Constituintes das formulações para secagem, assim como parâmetros utilizados para solubilização. ....	104
<b>Tabela 7</b> – Constituintes das formulações para secagem, assim como parâmetros utilizados para solubilização. ....	105
<b>Tabela 8</b> – Constituintes das formulações para secagem, assim como parâmetros utilizados para solubilização. ....	106
<b>Tabela 9</b> – Diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica .....	108
<b>Tabela 10</b> - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) com identificação de diferentes elementos presentes em cada componente. ....	109
<b>Tabela 11</b> – Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) com identificação de diferentes elementos presentes em cada formulação. ....	110
<b>Tabela 12</b> – Perfis de liberação de primeira ordem ou segunda ordem .....	123
<b>Tabela 13</b> – Resultados obtidos aplicando Lei das Potências. ....	124
<b>Tabela 14</b> – Propriedades aerodinâmicas determinadas pelo Impactador em Cascata de Andersen. ....	125
<b>Tabela 15</b> – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica. ....	175
<b>Tabela 16</b> – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica. ....	175
<b>Tabela 17</b> – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas. ....	175
<b>Tabela 18</b> – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas. ....	175

<b>Tabela 19</b> – Concentrações fucoidana obtida utilizando parâmetros iguais em um único ensaio. ....	176
<b>Tabela 20</b> – Concentrações fucoidana obtida utilizando parâmetros iguais com diferente analista e dias diferentes. ....	177
<b>Tabela 21</b> – Equação da reta e $r^2$ obtidas para quantificação do fármaco AAS (ácido acetilsalicílico) liberado em diferentes meios (n = 3). ....	177
<b>Tabela 22</b> – Equação da reta e $r^2$ obtidas para quantificação do AS (ácido salicílico) liberado em diferentes meios (n = 3). ....	178
<b>Tabela 23</b> – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica. ....	184
<b>Tabela 24</b> – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica. ....	184
<b>Tabela 25</b> – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas. ....	184
<b>Tabela 26</b> – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas. ....	185
<b>Tabela 27</b> – Limite de quantificação e detecção obtidos em diferentes meios. ....	185
<b>Tabela 28</b> – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica. ....	187
<b>Tabela 29</b> – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas. ....	188

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Celsius

A - Percentual liberado na etapa rápida

AA - Ácido araquidônico

ACN - Acetonitrila

AMPc - AMP cíclico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS - Ácido salicílico

ATIII - Antitrombina III

B - Percentual liberado na etapa lenta

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CLEC-2 - Receptores de lectina tipo C

COX-1 - Ciclooxygenase

DE -Dose emitida

DMMB - Azul de dimetildimetileno

DP - Desvio padrão

DPI - Inaladores de pó seco

EDS - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

EXO - exosítio

Fcb - Formulação contendo cloreto de benzalcônio

Fds - Formulação contendo deoxicolato de sódio

FGS - Fluido Gástrico Simulado

FIS - Fluido Intestinal Simulado

FLA - Fluido Lisossomal Artificial

FP - Formulações contendo Polaxamer 188

FPF - Fração de partículas finas

FPS - Fluido Pulmonar Simulado

FR - Fração respirável

FT - Fator tecidual

FXa - Fator X ativado

g – Gramas

GMPc - GMP cíclico

GP - Glicoproteína

GpIIb/IIIa - Glicoproteína IIb/IIIa  
H<sub>2</sub>O<sub>p</sub> - Água ultrapura com prolilenoglicol 2%  
HBPM - Heparinas de baixo peso molecular  
HNF - Heparinas não-fracionadas  
IR - Índice de refração  
k - constante de velocidade  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
MDI - Inaladores de dose-medida pressurizados  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
MP - Formulação de micropartículas contendo L-lisina  
MP/Ch - Formulação de micropartículas contendo quitosana como adjuvante de secagem  
MP/F4M - Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M como adjuvante de secagem  
MP/aF4M – Formulação de micropartículas sem HPMC F4M, com todos os outros constituintes  
MP/F4M B – Formulação de micropartículas sem fármaco, com todos os outros constituintes  
MP/Leu - Formulação de micropartículas contendo L-Leucina como adjuvante de secagem  
MSC - valores de coeficiente de correlação  
PAI-1 / PAI-2 - Inibidores do ativador do plasminogênio 1 ou 2  
PDE - Fosfodiesterase  
PDE - Fosfodiesterase  
PDI - Índice de polidispersão  
PGH<sub>2</sub> - Prostaglandina H<sub>2</sub>  
Pluronic® F-68 - Polaxamer 188  
PPP – Plasma Pobre em Plaquetas  
Prop - propilenoglicol  
PRP – Plasma Rico em Plaquetas  
PSGL-1 - Ligante da glicoproteína P-selectina  
r - coeficiente de correlação  
SLS - Lauril sulfato de sódio

TCM - Triglicerídeos de cadeia média

TEV - Tromboembolismo venoso

TF+ MV/PSGL-1 - Microvesículas expressando FT

TFPI - Inibidor da via do fator tecidual

t-PA - Ativador do plasminogênio do tipo tecidual

TXA<sub>2</sub> - Tromboxano A<sub>2</sub>

TXA<sub>2</sub>R - Receptor de tromboxano A<sub>2</sub>

TXS - Tromboxano sintase

UP - Água ultrapura

u-PA - Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase

$\alpha$  - velocidade de liberação na etapa rápida A

$\alpha_2$ -AP -  $\alpha_2$  antiplasmina

$\beta$  - velocidade de liberação na etapa lenta B



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	33
2 OBJETIVO GERAL.....	39
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	41
3.1 SISTEMAS MICROPARTICULADOS.....	43
3.1.1 Secagem por aspersão.....	45
3.1.2 Via pulmonar.....	47
3.2 HEMOSTASIA.....	53
3.2.1 Distúrbios tromboembólicos.....	59
3.2.2 Agentes antitrombóticos.....	64
3.2.3 Ácido acetilsalicílico, fucoidana e nano / microtecnologia.....	73
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	79
4.2 MATERIAIS.....	79
4.3 FORMULAÇÕES PULVERULENTAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR... 79	
4.3.1 Estabilidade do AAS em água.....	79
4.3.2 Delineamento da formulação de sistemas de liberação de pó inalável contendo AAS e fucoidana.....	80
4.3.3 Caracterização físico-química dos sistemas de liberação de pós inaláveis.....	83
4.3.4 Quantificação da fucoidana nas micropartículas.....	85
4.3.5 Perfis de liberação <i>in vitro</i> do AAS a partir das formulações desenvolvidas utilizando cápsulas de gelatina dura.....	86
4.3.6 Perfis de liberação <i>in vitro</i> do AAS a partir das formulações desenvolvidas utilizando pó coeso.....	86
4.3.7 Desempenho aerodinâmico <i>in vitro</i> .....	89
4.3.8 Caracterização das propriedades mucoadesivas <i>in vitro</i> .....	89
4.3.9 Ensaio anti-hemostáticos <i>in vitro</i> .....	91
4.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> E <i>EX VIVO</i> .....	95
4.4.1 Avaliação do potencial antiagregante plaquetário <i>ex vivo</i> .....	96
4.4.2 Avaliação do perfil antitrombótico <i>in vivo</i> através do ensaio de trombose arterial induzida por cloreto férrico.....	96

4.4.3 Avaliação do potencial hemorrágico <i>in vivo</i> através do tempo de sangramento .....	97
4.4.4 Histologia e análise histopatológica .....	98
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	99
5 RESULTADOS .....	103
5.1 ESTABILIDADE DO AAS EM ÁGUA.....	103
5.2 DELINEAMENTO DA FORMULAÇÃO DE PÓ INALÁVEL CONTENDO AAS E FUCOIDANA.....	103
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE PÓS INALÁVEIS .....	107
5.3.1 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica dos pós inaláveis.....	107
5.3.2 Análise morfológica .....	108
5.3.3 Determinação da concentração de AAS e padronização das extrações.....	112
5.3.4 Estabilidade do AAS nas micropartículas.....	116
5.3.5 Pureza de pico cromatográfico.....	118
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA FUCOIDANA NAS MICROPARTÍCULAS .....	119
5.5 PERFIS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO AAS A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS UTILIZANDO CÁPSULAS DE GELATINA DURA .....	120
5.6 PERFIS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO AAS A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS UTILIZANDO PÓ COESO .....	122
5.7 DESEMPENHO AERODINÂMICO <i>IN VITRO</i> .....	124
5.8 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS.....	125
5.8.1 Perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína <i>in vitro</i> .....	125
5.8.2 Perfil de permeação em mucosa esofágica suína <i>in vitro</i> .....	126
5.8.3 Perfil de adsorção de mucina .....	128
5.9 ENSAIOS ANTIHEMOSTÁTICOS <i>IN VITRO</i> .....	128
5.9.1 Ensaios de coagulação plasmática <i>in vitro</i> .....	129
5.9.2 Ensaios de agregação plaquetária <i>in vitro</i> .....	130
5.9.3 Avaliação da atividade hemolítica <i>in vitro</i> .....	132
5.9.4 Ensaio de adesão plaquetária <i>in vitro</i> .....	132
5.10 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> E <i>EX VIVO</i> .....	134

5.10.1 Avaliação do potencial antiagregante plaquetário <i>ex vivo</i> .....	134
5.10.2 Avaliação do perfil antitrombótico <i>in vivo</i> através do ensaio de trombose arterial induzida por cloreto férrico.....	135
5.10.3 Avaliação do potencial hemorrágico <i>in vivo</i> através do tempo de sangramento.....	136
5.10.4 Análise histopatológica .....	137
6 DISCUSSÃO.....	149
7 CONCLUSÃO .....	169
8 MATERIAL SUPLEMENTAR .....	173
8.1 FORMULAÇÕES PULVERULENTAS .....	173
8.1.1 Validação do método analítico para quantificação do ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS) nas micropartículas (MP) .....	173
8.1.2 Validação do método para quantificação da fucoidana nas micropartículas .....	176
8.2 PERFIS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	177
8.2.1 Validação do método analítico para quantificação do ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS) nas micropartículas (MP) submetidas ao ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	177
8.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS <i>IN VITRO</i> ...	186
8.3.1 Validação do método analítico para quantificação do ácido acetilsalicílico (AAS) nas micropartículas (MP) submetidas ao perfil de lavabilidade em mucosa esofágica de suíno e no ensaio de permeação .....	186
8.4 ENSAIOS ANTIHEMOSTÁTICOS <i>IN VITRO</i> .....	188
8.4.1 Curva de calibração de plaquetas para ensaio de adesão plaquetária <i>in vitro</i> .....	188
9 APÊNDICE .....	193
9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	193
10 ANEXOS.....	197
10.1 PARECER COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL APROVADO.....	197
10.2 MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE PÓS E APARATO DISSOLUTOR.....	198
10.3 MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULA E USO DA COMPOSIÇÃO .....	218

10.4 ARTIGO PRONTO PARA SUBMISSÃO .....	230
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	249

# 1. INTRODUÇÃO

---



## 1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é definida como um processo fisiológico de manutenção do estado líquido e circulante do sangue, com a indução de um tampão hemostático em caso de lesão vascular para prevenir a perda de sangue, mantendo a perfusão e estimulando os processos de reparo locais (OAKLEY & LARJAVA, 2012; PIERDONÁ *et al.*, 2014b; YANG, JIMENEZ & JABORI, 2014). Esse processo é dependente do endotélio vascular, da agregação plaquetária e dos fatores de coagulação, podendo, assim, ser dividido em quatro etapas: vasoconstrição reflexa, hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise (BONHOMME & FONTANA, 2015; VERSTEEG *et al.*, 2013).

O controle desses sistemas é desempenhado por processos hemostáticos que, em casos de desequilíbrio, podem desencadear, por exemplo, estados de hipo- ou hipercoagulabilidade. Esses estados podem gerar quadros fisiopatológicos severos, como os distúrbios tromboembólicos, entre esses, destacam-se a aterotrombose e o tromboembolismo venoso (GALANAUD, LAROCHE & RIGHINI, 2013; ROGERS *et al.*, 2014). Essas doenças são causadas respectivamente por quadros de trombose arterial, onde a agregação plaquetária desempenha um papel fundamental e de trombose venosa, caracterizada pela ativação da cascata de coagulação (MANNHALTER, 2014; TURPIE & ESMON, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esses quadros patológicos fazem parte do grupo das doenças cardiovasculares que são a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Em 2011, estimou-se que 17,3 milhões de pessoas tenham morrido por estas causas, representando cerca de 30% do total de mortes mundialmente, tendo como previsão para 2030, um total de 23,6 milhões de óbitos (MAVRAKANAS & BOUNAMEAUX, 2011; YUSUF & MCKEE, 2014). No Brasil, as dificuldades para a obtenção de um dado correto sobre os gastos e óbitos ocasionados por esses distúrbios, em especial para os quadros relacionados às trombooses arteriais, como o acidente vascular cerebral (AVC) demonstram a falta de regulamentação federal para a notificação de casos. Os gastos com tratamento ultrapassam os R\$270 milhões e mantém o país entre os dez primeiros com os maiores índices de mortalidade devido a complicações trombóticas (ABRAMCZUK & VILLELA, 2009). Nesse contexto, verifica-se uma crescente busca de novas terapias

de menor risco e maior eficiência (BARON, KAMATH, MCBANE, 2014; CHAPMAN & YUEN, 2014).

A utilização de novas tecnologias, em especial das técnicas de microencapsulação vem apresentando-se como estratégia alternativa eficaz para superar as limitações dos tratamentos convencionais, como a técnica de secagem por aspersão e formação de um pó para administração por via pulmonar, com alguns estudos relatando eficiente microencapsulação de fármacos antitrombóticos (ARANAZ *et al.*, 2017; JIAO *et al.*, 2002; JUNET *et al.*, 2018; KISHIMOTO *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2012).

Um exemplo clássico de fármaco antitrombótico é o ácido acetilsalicílico (AAS), ainda muito utilizado na clínica médica no tratamento e prevenção de eventos tromboticos primários ou secundários, visto sua comprovada eficácia e estudos a longo prazo sobre toxicidade e segurança (ALTMAN *et al.*, 2004; ALTMAN, RIVAS, GONZALEZ, 2012; ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014). Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição irreversível da ciclooxigenase-1 (COX-1), impedindo a formação de ácido araquidônico, que é um indutor plaquetário (LEI *et al.*, 2014). Contudo, os problemas inerentes ao uso crônico deste fármaco são bem descritos e estão associados ao risco aumentado de complicações gastrointestinais, como úlceras e sangramentos que levam a desistência do tratamento (ANGIOLILLO, 2013; CHOI & KIM, 2013; KUNADIAN, 2013 e EL-HAYEK, 2014).

Com isso, uma das alternativas para essa problemática pode ser a administração pulmonar, visto que, além da diminuição do efeito de primeira passagem, levando à uma maior biodisponibilidade do fármaco, há a inibição das plaquetas em seu local de biogênese (no pulmão, como exposto por LEFRANÇAIS *et al.* 2017).

Nesse contexto, a fucoidana, um polissacarídeo sulfatado com seletividade para P-selectina (expressa em locais altamente trombogênicos, como endotélio lesionado e/ou plaquetas ativadas) (BACHELET *et al.*, 2009; BARBAUX *et al.*, 2010; BORSIG *et al.*, 2011; CUMASHI *et al.*, 2007; ROUZET *et al.*, 2011) evidencia-se como um possível promotor de direcionamento específico para fármacos antitrombóticos como o AAS, tornando essa terapia conjunta bastante atraente.

## **JUSTIFICATIVA**

A administração pulmonar de pó inalável baseado em micropartículas contendo AAS associado à fucoidana tem como finalidade o seu direcionamento para locais com lesão endotelial favoráveis ao desenvolvimento de quadros trombóticos, e assim, reduzir a dose de fármaco administrado, além de evitar os efeitos adversos gastrointestinais decorrentes da sua administração oral.

## **HIPÓTESE**

A administração pulmonar de pó inalável baseado em micropartículas de AAS associado à fucoidana apresentará atividade antiagregante plaquetária sem interferência nos mecanismos de coagulação sanguínea, com diminuição de efeitos hemorrágicos e eficaz direcionamento para locais com alta expressão de p-selectina em uma dose menor do que descrita na literatura para a via oral.



## 2 OBJETIVOS

---



## 2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar, *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, um sistema carreador contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoidana para tratamento e/ ou prevenção de quadros trombóticos primários ou secundários.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e produzir uma formulação farmacêutica baseada em micropartículas contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoidana;

- Caracterizar as propriedades físico-químicas da formulação desenvolvida através da (o):

- Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica;
- Análise morfológica;
- Determinação do teor de fármaco e estabilidade;

- Quantificar a fucoidana presente na formulação;

- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do ácido acetilsalicílico a partir da formulação desenvolvida utilizando cápsulas de gelatina dura ou pó coeso;

- Avaliar o desempenho aerodinâmico *in vitro*;

- Determinar as propriedades mucoadesivas (lavabilidade; trabalho de mucoadesão e adsorção de mucina) e permeação/ penetração *in vitro*;

- Caracterizar o perfil antihemostático *in vitro* e *ex vivo*;

- Avaliar o perfil antitrombótico *in vivo*;

- Avaliar o potencial hemorrágico *in vivo*;

- Avaliar a integridade de diversos órgãos após os diferentes ensaios *in vivo*.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

---



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SISTEMAS MICROPARTICULADOS

As micropartículas são sistemas micrométricos (1 a 1000  $\mu\text{m}$ ) que apresentam uma barreira funcional, distinguível ou não, entre o núcleo e a matriz polimérica. Seus mecanismos de liberação de fármacos podem ser de dissolução, erosão ou difusão, levando em consideração propriedades como coeficiente de solubilidade e de difusão do fármaco, assim como características morfológicas das partículas (BAKRY, A. M. *et al.*, 2015; CALVO *et al.*, 2011; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; VEHRING, 2008).

Além disso, podem ser divididas em duas grandes classes: microcápsulas de núcleo único ou múltiplos núcleos e microesferas (onde a substância ativa está integrada à matriz do material estruturante) (DUBEY, 2009; MA, 2014).

Segundo Vert e colaboradores (2012) e de acordo com as regras IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), as microcápsulas são definidas por apresentarem uma parede sólida (membrana ou revestimento) em torno de um ou mais núcleo(s). Já as microesferas, não possuem membranas ou parede exterior distinguível (**Figura 1**) (VERT *et al.*, 2012).



**Figura 1** – Figura esquemática de microcápsulas e microesfera. As microcápsulas apresentam parede sólida, demonstrada pelos círculos pretos em torno de um ou mais núcleo(s) – na figura em branco. As microesferas não apresentam membrana ou parede exterior distinguível, demonstrado por círculos de diferentes cores, simbolizando diferentes constituintes.

Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

A microencapsulação tem atraído inúmeras pesquisas na área farmacêutica, como por exemplo, obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos, encapsulação de fármacos hidrofóbicos, diminuição de efeitos adversos, melhoria de estabilidade, diminuição da dose administrada e período entre administrações, além de formulações modificadas com a finalidade de interagir com o sítio alvo (ALVAREZ DORTA DIMITRI *et al.*, 2017; BAKRY, A. M. *et al.*, 2015; BEN AMARA *et al.*, 2017;

FANGMANN *et al.*, 2018; JIMÉNEZ-MARTÍN *et al.*, 2015; KAJIMOTO KAZUAKI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2015; MOORANIAN *et al.*, 2015; TIANI *et al.*, 2018; TRINH *et al.*, 2015).

Diversos métodos são descritos na literatura para o desenvolvimento de micropartículas, os quais são divididos em duas classes: métodos físicos e métodos químicos (DUBEY, 2009; MA, 2014), os quais compreendem polimerização por emulsão (GRIGORAS, 2017); polimerização por suspensão (WANG *et al.*, 2017; YATAGANBABA, OZKAHRAMAN, KURTBAS, 2017); dispersão (DE MATOS-JR *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2017); coacervação (DAS, BANERJEE, BELLARE, 2005; GJOSEVA *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2017; RUTZ *et al.*, 2017); deposição camada por camada (CHAI *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2017; FRINDY *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2017); fluido supercrítico (ADAMI *et al.*, 2017; ADAMI, SCOGNAMIGLIO, REVERCHON, 2018; BADENS *et al.*, 2017; CAMPARDELLI & REVERCHON, 2017; CRICCHIO *et al.*, 2017) e secagem por aspersão (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2017; COLLADO *et al.*, 2017; DAVIS, 2017; GARCIA-CONTRERAS *et al.*, 2017; HARSHA *et al.*, 2017; NI *et al.*, 2017). É importante ressaltar que a escolha do método precisa levar em conta o polímero de escolha, a via de administração, os efeitos desejados e a duração do tratamento (BAKRY, A. M. *et al.*, 2015; DUBEY, 2009).

Em relação aos polímeros, destacam-se os polímeros sintéticos biodegradáveis, como poli(ácido lático); poli(ácido lático-co-ácido glicólico); poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-b-poli(etilenoglicol) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (HUSSAIN *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; RHODES *et al.*, 2017; TANETSUGU *et al.*, 2017; VAN BEERS *et al.*, 2017); os polímeros derivados de metacrilato de metila e ácido acrílico, como EUDRAGIT® FS 30D; RS100; RL100; L100 e E100 (CARTAGENA *et al.*, 2017; FAROOQ *et al.*, 2017; HALES *et al.*, 2017; MOMOH *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2017; THAKRAL *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2018); os polímeros naturais, como a quitosana, fucoidana e dextrana (CHAOUAT *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017, 2018; LI *et al.*, 2017; NI *et al.*, 2017; ROY & NAYAK, 2017; YANG *et al.*, 2017; GJOSEVA *et al.*, 2018; JUENET *et al.*, 2018; JUNKINS *et al.*, 2018) e os derivados de celulose como tributirato de celulose; acetobutirato de celulose, etilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose (BHUIYAN *et al.*, 2017; DUFRESNE, 2017; NATTERODT *et al.*, 2017; TAO *et al.*, 2017; ZATTA *et al.*, 2018).

### 3.1.1 Secagem por aspersão

Dentre os métodos citados, a secagem por aspersão é muito utilizada devido sua relativa rapidez, visto que geralmente é realizada em uma etapa, seu baixo custo e capacidade de ser transponível para escala industrial, sendo uma das técnicas mais utilizadas para obtenção de micropartículas (CAL & SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB & CAL, 2010).

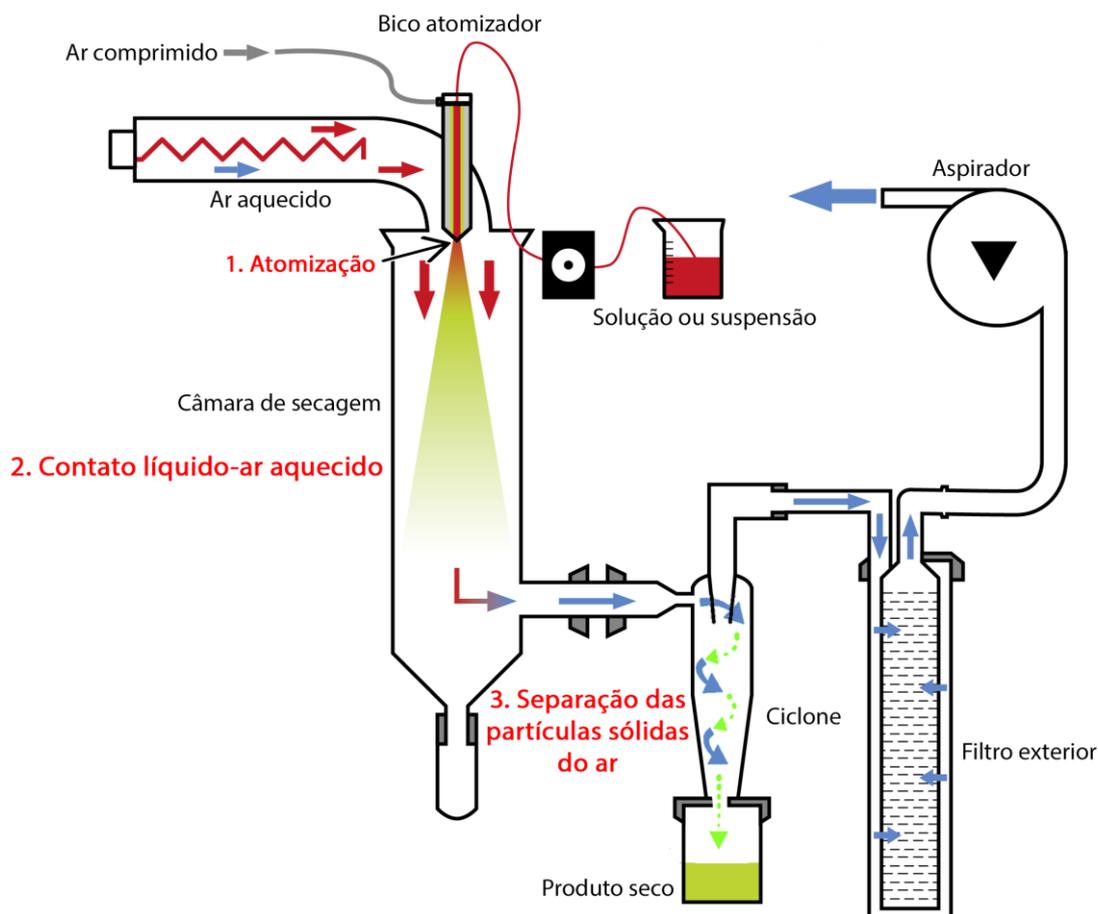
A secagem por aspersão pode ser dividida em três etapas: (1) divisão do líquido de alimentação em gotículas; (2) contato líquido-ar aquecido e consequente evaporação do solvente e (3) separação sólido-ar. As etapas e condições em que são preparadas, assim como os constituintes da formulação precisam ser levados em consideração para obtenção eficaz de um produto final com alto rendimento e propriedades físico-químicas e morfológicas desejadas (CAL & SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB & CAL, 2010).

A atomização consiste na divisão do líquido em gotículas do fluido de alimentação por meio de um fluxo de ar aquecido. Então, há uma troca de calor entre as gotículas atomizadas e o ar, evaporando o solvente em segundos. Logo após, ocorre a separação das partículas sólidas do ar, possibilitando a coleta do pó formado (CAL & SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB & CAL, 2010; VEHRING, 2008) (**Figura 2**).

Nos estudos utilizando polímeros sintéticos biodegradáveis e secagem por aspersão, Karaszewska e colaboradores (2017) empregaram esta técnica para encapsular o triclosan em micropartículas, as quais apresentaram eficiente atividade antibacteriana (KARASZEWSKA AGNIESZKA *et al.*, 2017). Por sua vez, Zernov e colaboradores (2017) desenvolveram uma partícula onde foi possível obter uma liberação controlada do paclitaxel (ZERNOV *et al.*, 2017). Finalmente, Nieto-Orellana e colaboradores (2018) desenvolveram complexos com proteínas não-covalentes para liberação pulmonar utilizando a lisozima como fármaco modelo (NIETO-ORELLANA *et al.*, 2018).

Considerando os polímeros derivados de metacrilato de metila e ácido acrílico, Shah e colaboradores (2017) utilizaram micropartículas de glutationa e nitrosoglutationa com Eudragit® FS 30D para tratamento da doença de Crohn (SHAH *et al.*, 2017); Varshozas (2016) utilizou repaglinida e Eudragit® E100 com o intuito de aumentar a estabilidade e solubilidade deste fármaco (VARSHOSAZ *et al.*, 2017) e Amelian e colaboradores (2017) utilizaram cetirizina e Eudragit® E 100 para mascarar

o gosto deste fármaco anti-histamínico (AMELIAN *et al.*, 2017). Finalmente, Deshmukh, Mujumdar e Naik determinaram as propriedades de uma formulação contendo aceclofenaco e Eudragit® RS-100, caracterizando-a quanto ao tamanho de partícula, morfologia, eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*, com resultados promissores para liberação prolongada e tratamento crônico de desordens musculares (DESHMUKH, MUJUMDAR, NAIK, 2018).



**Figura 2** – Esquema da técnica de secagem por aspersão, demonstrando: 1. Atomização; 2. Contato líquido vapor aquecido e 3. Separação das partículas sólidas do vapor e posterior coleta do produto seco. **Fonte:** Modificada de Burki, Arpagaus e Betz, 2011.

Para polímeros naturais, diversos estudos envolvendo a secagem por aspersão e quitosana são relatados. Collado e colaboradores (2017) encapsularam esteroides em uma matriz polimérica de quitosana (COLLADO *et al.*, 2017); Aranaz e colaboradores (2017) desenvolveram micropartículas de quitosana contendo um antidepressivo (venlafaxina), obtendo um perfil de liberação do tipo anômalo com liberação sustentada (ARANAZ *et al.*, 2017) e Silva e colaboradores (2018) utilizaram-se da técnica para encapsular ibuprofeno e nanocompósitos de magnetita revestidos

com ouro em pós de quitosana para tratamento de câncer de pulmão, resultando em uma rápida liberação em pH 6,8 (pH tumoral), evidenciando internalização desta formulação nas células tumorais através de suas características fluorescentes (SILVA *et al.*, 2017). De forma interessante, Singh e colaboradores (2017) encapsularam bactérias probióticas com auxílio de micropartículas de quitosana e carboximetilcelulose (SINGH *et al.*, 2017). Por sua vez, Ni e colaboradores (2017) desenvolveram um modelo de micropartículas de quitosana para a via pulmonar capaz de encapsular fármacos hidrofóbicos (NI *et al.*, 2017).

Em estudo recente, Zatta e colaboradores (2018) obtiveram micropartículas de 5-fluorouracil, sulfato de condroitina e hidroxipropilmetilcelulose (Methocel™ F4M), levando em conta parâmetros aerodinâmicos teóricos, porcentagem de partículas respiráveis, propriedades mucoadesivas e efeito citotóxico em cultura de células de melanoma com resultados promissores para a administração pulmonar dessa formulação (ZATTA *et al.*, 2018).

Por fim, alguns trabalhos relatam a utilização de fucoidana, como Khalufu e colaboradores (2017), que demonstraram atividade antioxidante *in vitro* de formulações contendo esse polissacarídeo (KHALAFU *et al.*, 2017) e Lee e colaboradores (2015) que concluíram que a fucoidana por via oral preveniu a progressão de osteoartrite *in vivo* utilizando ratos (LEE *et al.*, 2015). De forma resumida, diversos trabalhos utilizaram formulações contendo fucoidana extraída de diferentes espécies de algas marrons, as quais apresentaram atividade anticoagulante, antiagregante plaquetária, antitumoral e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, por via oral (CHURCH *et al.*, 1989; BILAN *et al.*, 2006; CUMASHI *et al.*, 2007; BACHELET *et al.*, 2009; MURAKAMI *et al.*, 2010; ALE, MIKKELSEN & MEYER, 2011a; FITTON, 2011; HUANG & LAM, 2011; MANNE *et al.*, 2013a; HUANG *et al.*, 2014).

### **3.1.2 Via pulmonar**

A via pulmonar vem sendo explorada recentemente devido suas características únicas, principalmente para tratamento de doenças das vias aéreas e infecções locais e mais recentemente para doenças sistêmicas (KAUR *et al.*, 2016; LIANG *et al.*, 2015; MORALES *et al.*, 2015; MURUGAPPAN *et al.*, 2015; PARIKH, PATEL, DALWADI,

2014; ROBBE *et al.*, 2015; RUIGROK, FRIJLINK, HINRICHS, 2016; THWALA, PRÉAT, CSABA, 2017; YAPA *et al.*, 2014).

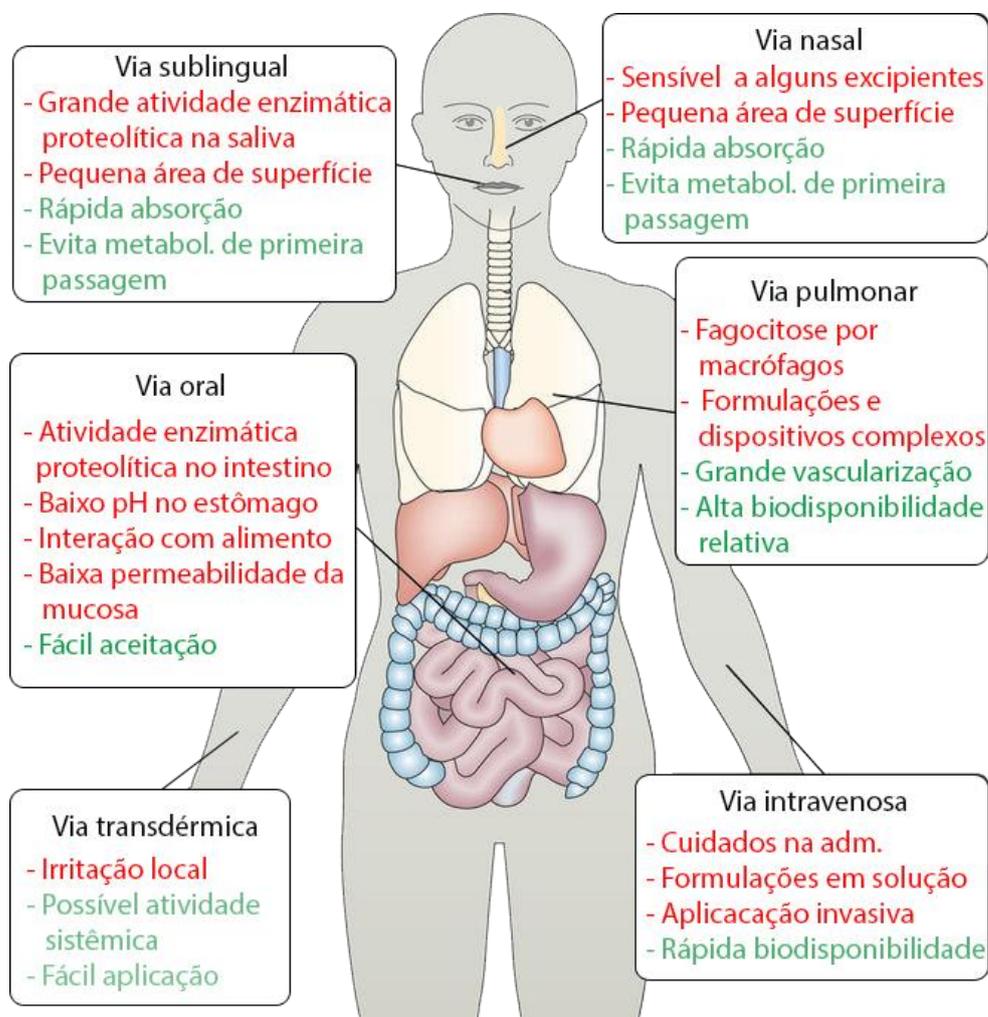
Quando comparada às vias mais convencionais, como a via oral e intravenosa, algumas vantagens desta via podem ser citadas: grande vascularização tecidual (5 L/min), grande área superficial alveolar (aproximadamente 100 m<sup>2</sup>), ausência do efeito de primeira passagem, fina barreira epitelial (50 - 60 µm na traqueia e diminui até aproximadamente 0,2 µm no alvéolo), maior permeabilidade para macromoléculas, maior biodisponibilidade dos fármacos, facilidade de aceitação do paciente ao tratamento devido à diminuição de efeitos colaterais, possibilidade de diminuição das doses em tratamentos prolongados e possibilidade de atividade local ou sistêmica (DAEAR, LAI, PRENNER, 2018; GILL *et al.*, 2007; MINZ & PANDEY, 2018; MORALES-BURGOS *et al.*, 2018; MORÇÖL *et al.*, 2018; NAZAR, 2018; PARANJPE & MÜLLER-GOYMANN, 2014; PFÜTZNER, MANN, STEINER, 2002; SMOLA & VANDAMME; SOKOLOWSKI, 2008; TRAPANI *et al.*, 2013; YILDIZ-PEKOZ & OZSOY, 2017; ZATTA *et al.*, 2018).

Embora promissora, a via pulmonar apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de desenvolver formulações mais complexas, utilização de dispositivos (inaladores), *clearance* mucociliar por macrófagos e dependência de fatores intrínsecos individuais (respiração, estado de saúde e bifurcações pulmonares) (DAEAR, LAI, PRENNER, 2018; MINZ & PANDEY, 2018; PARANJPE & MÜLLER-GOYMANN, 2014; SMOLA, VANDAMME, SOKOLOWSKI, 2008; YILDIZ-PEKOZ & OZSOY, 2017; ZATTA *et al.*, 2018) (**Figura 3**).

Para tratamento local, diversas doenças são alvos da administração de fármacos pela via pulmonar, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística, câncer de pulmão, pneumonia e hipertensão pulmonar (AW-YONG *et al.*, 2018; BODAS *et al.*, 2018; DILNAWAZ & SAHOO, 2018; FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; GIVENS, GEARY, SALEM, 2018; LE HIRESS *et al.*, 2018; SMOLA, VANDAMME, SOKOLOWSKI, 2008; VIJ, 2017; VIJ *et al.*, 2016).

Por sua vez, em relação à utilização da via pulmonar para atuação em quadros patológicos sistêmicos, observa-se como grande exemplo o tratamento de diabetes com a administração de insulina utilizando a tecnosfera de insulina (Afrezza®). Além da insulina, outros estudos com vacinas, proteínas e peptídeos revelam-se promissores (PFÜTZNER *et al.*, 2002; BALDUCCI *et al.*, 2014; PARANJPE &

MÜLLER-GOYMANN, 2014; FROMEN *et al.*, 2015; RUSO *et al.*, 2015; RUIGROK *et al.*, 2016; GRIGORAS, 2017; MOMOH *et al.*, 2017; WALTERS *et al.*, 2017; MORÇÖL *et al.*, 2018; NAZAR, 2018).



**Figura 3** – Vias de administração e principais vantagens (verde) e desvantagens (vermelho).

Fonte: Modificada de ZELIKIN *et al.*, 2016.

Os dispositivos para administração de fármacos pela via pulmonar podem ser divididos em três categorias: nebulizadores, inaladores de dose-medida pressurizados (MDI) e inaladores de pó seco (DPI), cada um com suas particularidades, conforme demonstrado na **Figura 4**.

Os nebulizadores são os dispositivos mais antigos disponíveis no mercado, embora com diversas desvantagens, como: eficiência reduzida, variação na dose, repetibilidade e reprodutibilidade comprometida e demora para início de efeito. Além disso, precisam de limpeza constante e não são portáteis (BREUER *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2017; PRESS *et al.*, 2017; PRIETO, RUCKER, PAYNE, 2018).

Inalador de pó seco <i>Dry powder inhaler (DPI)</i>	Inalador pressurizado de dose calibrada <i>Pressurized Metered-Dose Inhaler (pMDI)</i>	Inalador de névoa suave <i>Soft mist inhaler (SMI)</i>	pMDI + Câmara expansora  Inalação <u>única</u>	pMDI + Câmara expansora  Inalação <u>múltipla</u>	Nebulizador
					
Não necessita agitar	Agitar inalador	Não necessita agitar	Agitar inalador	Agitar inalador	Verificar limpeza do material
Acionar mecanismo de libertação do pó: Aeroliser   Handihaler - Colocar cápsula e perfurar Diskus - Deslizar a alavanca até ouvir um estalido Turbohaler - rodar base nos 2 sentidos Novolizer - premir botão e soltar	Inalador na vertical em forma de L (Dedo polegar no ramo horizontal e indicador na parte superior)	Rodar a base na direção da seta que se encontra na etiqueta até ouvir um clique (meia volta)	Acoplar pMDI à câmara expansora	Acoplar pMDI à câmara expansora	Preparar a solução do medicamento se necessário com o soro fisiológico não excedendo os 5mL
<b>Expiração forçada</b> prévia à inalação (Atenção: nos DPI não expirar para o interior do inalador)				Não necessita de expiração prévia	
Colocar bucal entre os dentes com a língua por baixo				Usar máscara ou bucal bem adaptado	
Inspiração pela boca <b>rápida</b> e <b>vigorosa</b>	Iniciar inspiração e comprimir o inalador (coordenação mão - pulmão) fazendo inspiração <b>lenta</b> (adultos: 4-5s   crianças: 2-3s) e <b>profunda</b>		Ativar pMDI e fazer inalação <b>lenta</b> e <b>profunda</b>	Ativar pMDI e fazer 10 inalações em volume corrente	Inalar no máximo durante 10 min em volume corrente
No final da inspiração: <b>APNEIA</b> : adultos: 10s   crianças: 5s				Não necessita de apneia	
Se necessária outra dose - esperar 30-60s – repetir procedimento					

**Figura 4** – Tipos de inaladores, sugestões de uso e particularidades.  
Fonte: SILVA *et al.*, 2018 ([www.gresp.pt](http://www.gresp.pt)).

Já os inaladores MDI foram desenvolvidos para tratamentos mais agudos, principalmente em crises asmáticas, tornando o tratamento portátil. No entanto, a maioria destes dispositivos era produzida com gases do tipo cloro flúor carbono (CFC), reconhecidos agressores do meio ambiente, sendo lentamente substituídos por hidrofluoralcenos. Ainda, necessitam de uma coordenação do paciente em iniciar a inspiração e acionar o inalador, tornando-se difícil para utilização em crianças ou pacientes com dificuldades motoras. Com isso, muitas vezes são necessárias repetidas doses para atingir a dose terapêutica e então, doses variáveis de fármaco podem permanecer na boca e na região orofaríngea, levando a perdas consideráveis do fármaco (ACEVEDO *et al.*, 2016; AGGARWAL, KUMARI, GROVER, 2016; DEROM *et al.*, 2015; JONES *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2016; PUNEKAR *et al.*, 2015; VANDERWAGEN & SMITH, 2017).

Devido às problemáticas acima citadas, os DPI foram desenvolvidos como um sistema inalatório mais simples, portátil, sem uso de propelentes e utilizando pós secos para inalação. Como utilizam os pós secos dispersos em um aerossol no fluxo de ar, necessitam de menor coordenação do paciente com o dispositivo e inalação quando comparados aos MDIs. Consequentemente, há uma maior aceitação dos pacientes, maior versatilidade no uso, melhor distribuição pulmonar e menor perda de fármaco quando comparado aos MDI (ALSOMALI *et al.*, 2017; CONOLE & KEATING,

2014; DAL NEGRO, 2015; GRANT *et al.*, 2015; HOPPENTOCHT *et al.*, 2014; MEHTA, 2016; SINGH *et al.*, 2015; SULAIMAN *et al.*, 2017; TONG *et al.*, 2015).

A produção e a utilização de DPIs dependem de três fatores interligados: (1) propriedades físico-químicas do fármaco e dos constituintes da formulação, como tamanho e distribuição das partículas, forma e características da superfície, fluxo do pó e viscosidade; (2) desempenho aerodinâmico, quantidade de partículas finas presentes e propriedades do aerossol formado após liberação do atuador e (3) correta utilização do dispositivo, posicionamento das cápsulas e fluxo respiratório do paciente (inspiração e expiração corretas na utilização, assim como a apneia para deposição do pó em camadas mais profundas do pulmão) (DAL NEGRO, 2015; HOPPENTOCHT *et al.*, 2014; SULAIMAN *et al.*, 2017).

Além da distribuição de tamanho, forma, carga, densidade, higroscopicidade e diâmetro de partícula, o tamanho de partícula tem um papel fundamental no desenvolvimento de um pó para administração pulmonar, devido à peculiaridades da via respiratória, *clearance* pulmonar e finalidade (ação local ou sistêmica) (DAVIS, 2017; DHAND *et al.*, 2014; GILL *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2015; MORALES *et al.*, 2017; PARANJPE & MÜLLER-GOYMANN, 2014; PITTAS, WESTCOTT, BALK, 2015; SMOLA, VANDAMME, SOKOLOWSKI, 2008; THWALA, PRÉAT, CSABA, 2017; YAPA *et al.*, 2014; ZELIKIN, EHRHARDT, HEALY, 2016).

Existem três mecanismos que governam o comportamento destes pós após inalação: (1) impactação inercial, atuando sobre partículas de 3 a 9  $\mu\text{m}$ , majoritariamente na via orofaríngea (esôfago, traqueia e brônquios); (2) sedimentação gravitacional, onde partículas de 1 a 5  $\mu\text{m}$  sofrem ação da gravidade e podem atingir camadas mais profundas do pulmão, como bronquíolos e alvéolos e (3) difusão browniana, governada pelo movimento aleatório das partículas como consequência dos choques entre as moléculas ou átomos presentes no fluido, geralmente associada aos alvéolos (SMOLA, VANDAMME, SOKOLOWSKI, 2008; RUGE, KIRCH, LEHR, 2013; DHAND *et al.*, 2014; ZELIKIN, EHRHARDT, HEALY, 2016; MORALES *et al.*, 2017; SULAIMAN *et al.*, 2017).

A literatura descreve os tamanhos de partículas adequados para a via pulmonar como de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , sendo que abaixo de 1  $\mu\text{m}$ , a difusão browniana pode atuar e as partículas serem exaladas na expiração, assim como partículas maiores de 5  $\mu\text{m}$  podem sofrer deposição na região orofaríngea e/ou serem engolidas/expelidas. Além

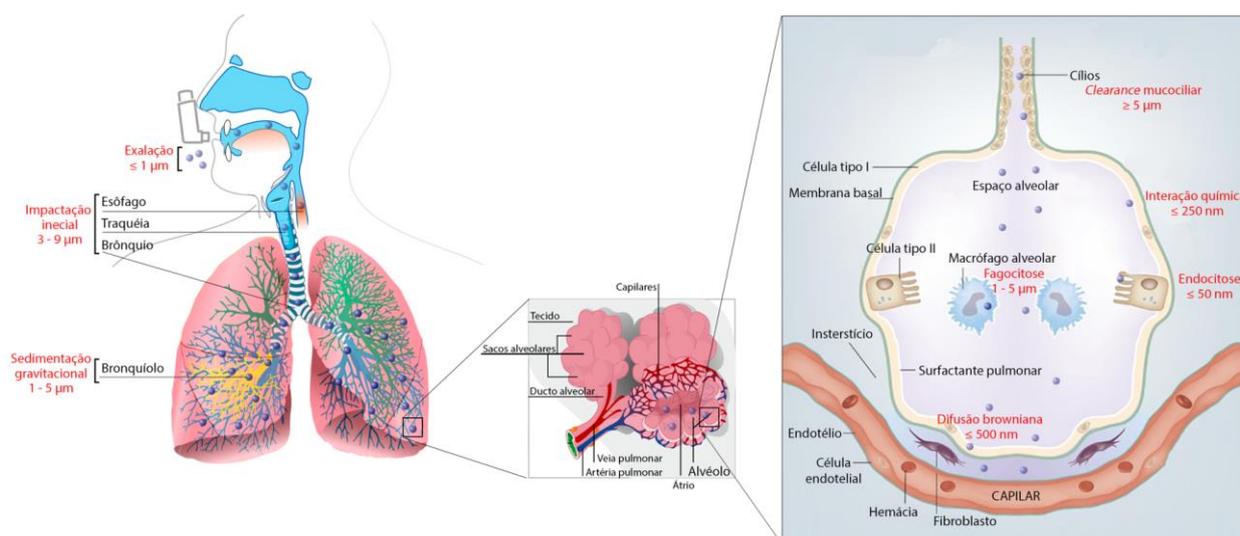
disso, pode ocorrer o *clearance* mucociliar ou macrofágico nos alvéolos, interações químicas com os pneumócitos, endocitose ou inativação do fármaco pelas proteínas presentes no surfactante e/ou muco pulmonar (SMOLA, VANDAMME, SOKOLOWSKI, 2008; RUGE, KIRCH, LEHR, 2013; DHAND *et al.*, 2014; ZELIKIN, EHRHARDT, HEALY, 2016; MORALES *et al.*, 2017; SULAIMAN *et al.*, 2017) (**Figura 5**).

Considerando a utilização de adjuvantes na formação de micropartículas seja para melhorar solubilidade, fluxo dos pós ou como promotores de liberação controlada, as propriedades destes tornam-se extremamente importantes, visto que, diferentes fármacos podem interagir de forma díspar com esses elementos e, conseqüentemente, ocasionar o desenvolvimento de pós com características distintas (AMELIAN *et al.*, 2017; CAL & SOLLOHUB, 2010; HARSHA *et al.*, 2017; KAUR *et al.*, 2016; RUGE, KIRCH, LEHR, 2013; SOLLOHUB & CAL, 2010; VARSHOSAZ *et al.*, 2017). Diversos adjuvantes são descritos na literatura, tendo como grandes exemplos a leucina, o hidroxipropilmetilcelulose e a quitosana.

Lucas e colaboradores (1999) e Najafabadi e colaboradores (2004) descreveram a capacidade da leucina pura seca por aspensão em formar partículas ocas de baixa densidade capaz de encapsular fármacos como estradiol, proteínas e imunoglobulinas (LI *et al.*, 2003; NAGARAJAN *et al.*, 2006; NAJAFABADI *et al.*, 2004; VEHRING, 2008; WONG *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos utilizaram hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e também o acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS) como adjuvantes devido as suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar uma matriz polimérica de liberação controlada do fármaco (AL-TABAKHA, 2010; CONTI *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2000; SIEPMANN *et al.*, 1999; ZATTA *et al.*, 2018). Ainda, Davis e Walker (2017) descreveram melhora da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis utilizando esse adjuvante (DAVIS, 2017).

Finalmente, a quitosana é um polímero natural, catiônico e promotor de liberação prolongada e bioadesão muito utilizado para encapsular proteínas, vitaminas, anti-inflamatórios e produtos naturais (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; DAVIS e ILLUM, 1999; DESAI e PARK, 2005a, 2005b, 2005c; GIUNCHEDI *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2003a, 2003b; MASOTTI and ORTAGGI, 2009; RÉ, 2006; VARGAS *et al.*, 2009).



**Figura 5** – Mecanismos governantes atuando sobre o pó após utilização de um DPI para via pulmonar, desde a região orofaríngea até a região alveolar e capilares.

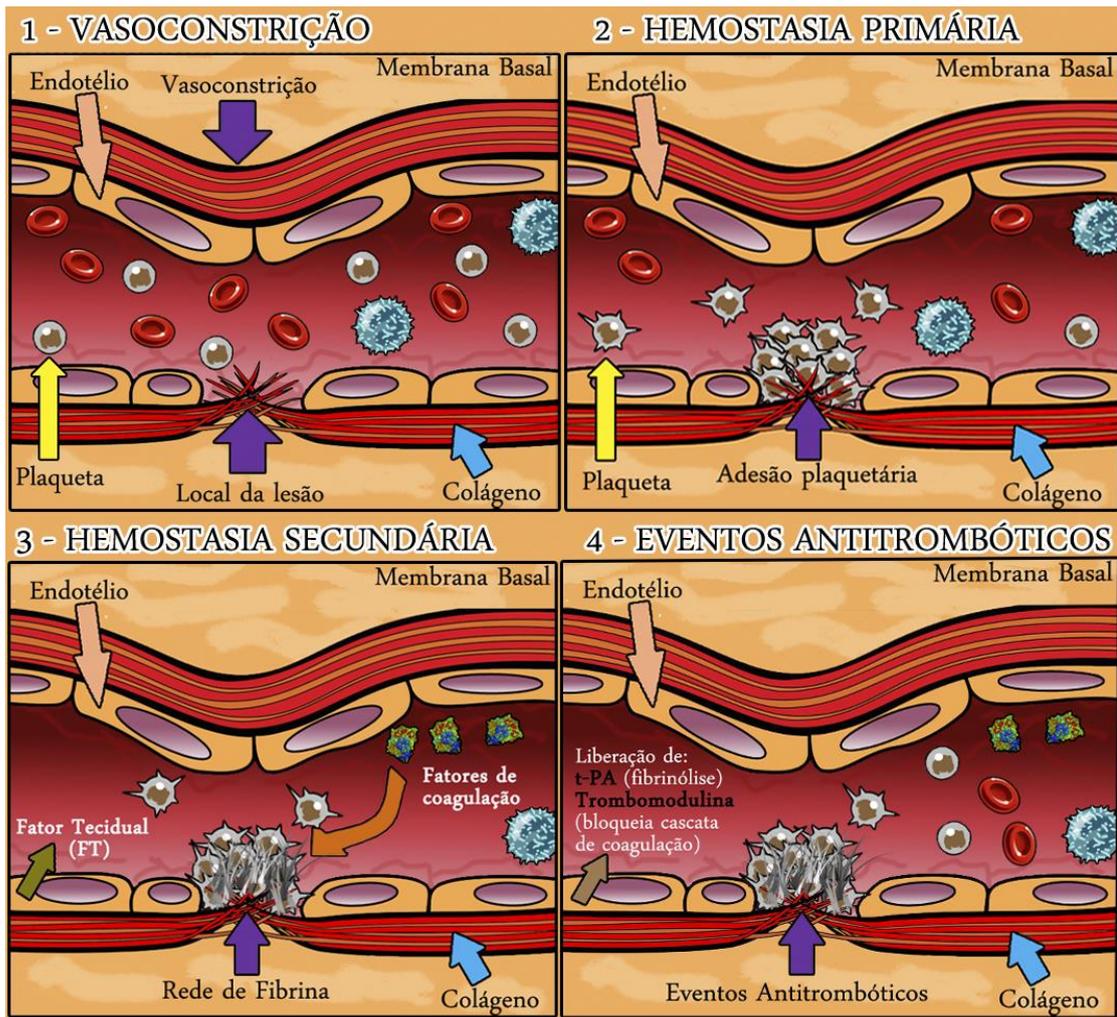
Fonte: Modificado de RUGE *et al.*, 2013; DHAND *et al.*, 2014 e ZELIKIN *et al.*, 2016.

### 3.2 HEMOSTASIA

A hemostasia é definida como um processo fisiológico de manutenção do estado líquido e circulante do sangue, com a indução de um tampão hemostático em caso de lesão vascular para prevenir a perda de sangue, mantendo a perfusão local e estimulando os processos de reparo locais (BAKER & BRASSARD, 2011; OAKLEY & LARJAVA, 2012; PIERDONÁ *et al.*, 2014).

Esse processo pode ser dividido em vasoconstrição, hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise (**Figura 6**) (BAKER; BRASSARD, 2011; OAKLEY & LARJAVA, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013).

Na ocorrência de uma lesão, inicia-se o processo de vasoconstrição local que diminui o fluxo sanguíneo, permitindo o maior contato das plaquetas ao colágeno e a P-selectina expostas pela matriz extracelular, proporcionando assim, a sua adesão a esta superfície e em seguida o processo de ativação (AUSTIN, 2013; BUGA-CORBU & ARION, 2014).



**Figura 6** – Principais etapas da hemostasia.  
 Fonte: SAITO *et al.*, 2018

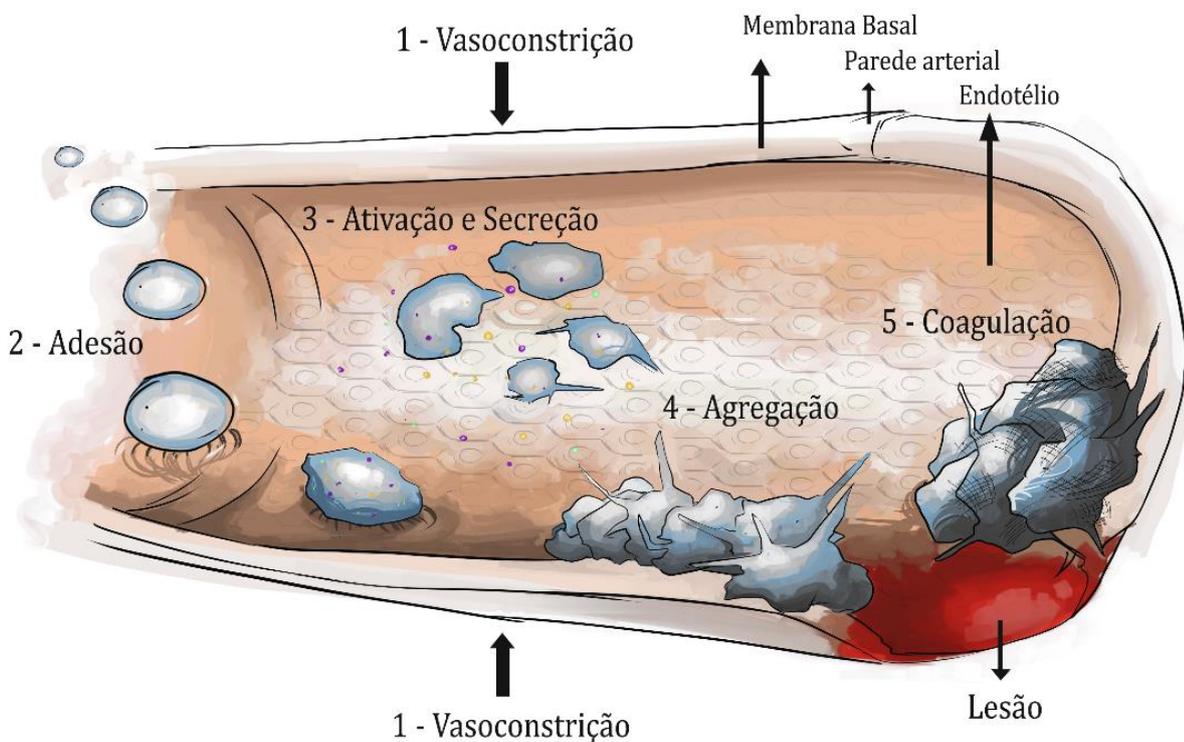
A hemostasia primária é caracterizada pela resposta inicial das plaquetas à lesão vascular, que resulta na adesão e ativação plaquetária. Estas, por sua vez, apresentam diversos receptores de adesão, como o complexo glicoproteico GPIb-V-IX e GPVI, que se ligam respectivamente ao fator de von Willebrand (vWF) e ao colágeno, além de integrinas, como a  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ , e PAR1, PAR4, que se ligam principalmente ao fibrinogênio, vitronectina e fibrina e também grânulos contendo P-selectina (BACCHUS & CROWTHER, 2013; BERNARD & LIONEL, 2013; CIMMINO & GOLINO, 2013).

Essa adesão plaquetária ocorre na matriz extracelular presente no subendotélio, que contém fibronectina, vWF, laminina e vitronectina, induzindo uma rápida transdução de sinal que desencadeia uma série de eventos que sustentarão essa adesão. O vWF é o componente chave para iniciar essa adesão e sustentá-la, atuando como uma ponte entre um receptor na superfície das plaquetas (Complexo

glicoproteico GPIb-GPIX-GPV) e as fibras de colágeno (AUSTIN, 2013; BACCHUS & CROWTHER, 2013; BERNARD & LIONEL, 2013).

Além do vWF, a exposição do colágeno subendotelial também sustenta esta adesão inicial das plaquetas e, além disso, atua como agonista para a ativação plaquetária. Essa ativação pode ser induzida também por trombina, ADP, epinefrina, prostaglandina  $H_2$ ,  $TXA_2$ , serotonina (receptor 5-HT) e PAF (fator de ativação plaquetária) (OAKLEY & LARJAVA, 2012). Isso desencadeia vários eventos, incluindo a ativação da fosfolipase C (PLC), responsável por hidrolisar o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  então induz a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e o DAG a entrada de cálcio do meio extracelular (VARGA-SZABO, PLEINES, NIESWANDT, 2008).

O cálcio atua como um segundo mensageiro acarretando na secreção de moléculas pró-agregantes, como ADP, geração de  $TXA_2$  e mudança de forma da plaqueta (discoide para esférica) com consequente exposição da glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa), que liga-se ao fibrinogênio, ocasionando a agregação plaquetária, amplificando a resposta hemostática e formação do trombo branco (por ser constituído principalmente de plaquetas) (**Figura 7**) (CIMMINO & GOLINO, 2013; EYRE & GAMLIN, 2010; WANG & KING, 2012).



**Figura 7** – A hemostasia e a participação das plaquetas na formação do plug hemostático, onde: 1. Vasoconstrição; 2. Adesão das plaquetas ao subendotélio, 3.

Mudança de forma da plaqueta com secreção dos grânulos, 4. Interação plaqueta-plaqueta, 5. Depósito da fibrina sobre o tampão plaquetário.  
Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

A hemostasia secundária consiste no processo de coagulação, em que se observa a ativação sequencial de proteínas plasmáticas inativas, os zimogênios, também chamados de fatores de coagulação, em enzimas capazes de originar, como produto final, a rede de fibrina a partir do fibrinogênio. Neste processo uma das enzimas produzidas, a trombina, é também um agonista plaquetário que amplificará o processo de agregação das plaquetas (GALANAUD, LAROCHE, RIGHINI, 2013; PRADELLA, TOMASELLA, MASCARETTI, 2012; SUCKER & ZOTZ, 2015).

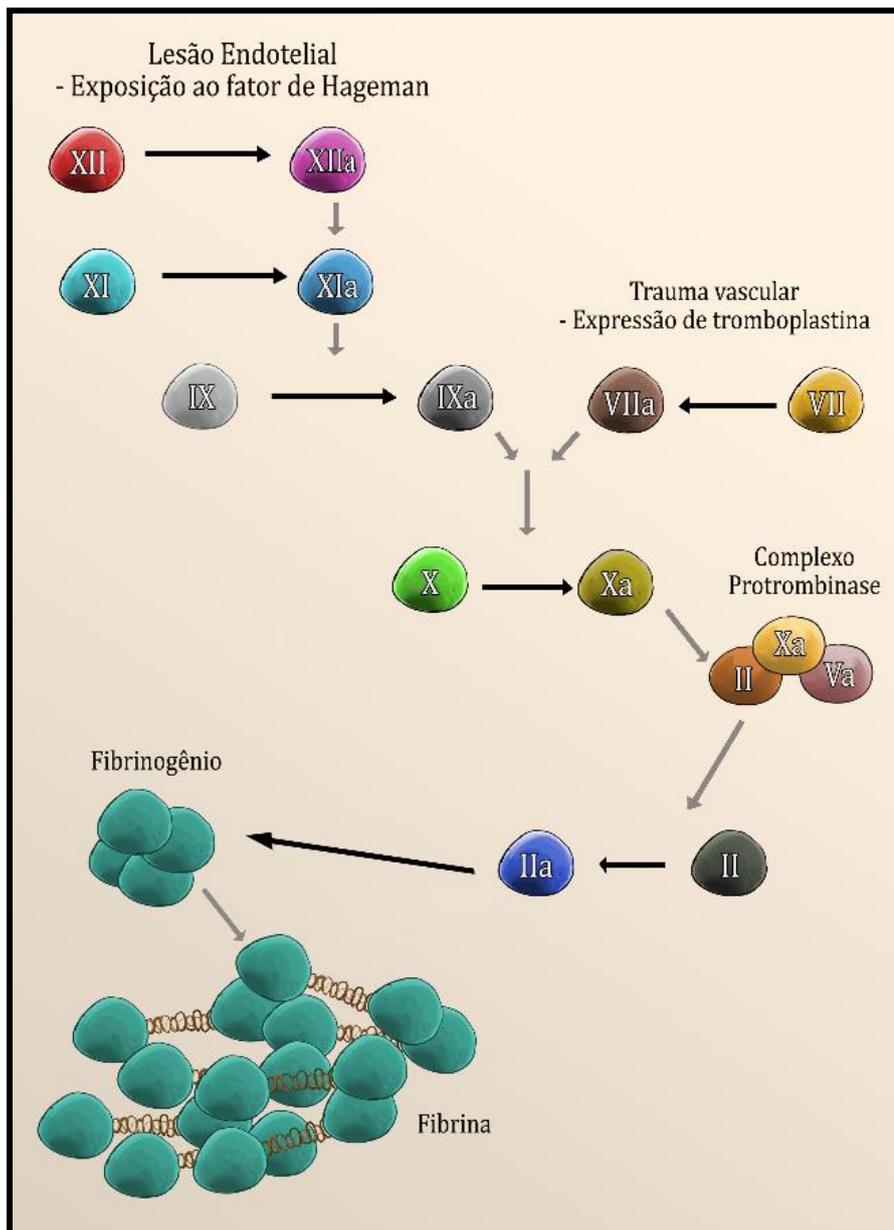
Segundo a literatura clássica, existem duas vias de coagulação: a via extrínseca e a via intrínseca (HOFFMAN, 2003). A via extrínseca é ativada após a lesão vascular, promovendo a exposição do fator III (conhecido também como fator tecidual) que em contato com o fator VII, na presença de íons  $Ca^{2+}$ , proporciona a ativação deste em fator VIIa e formação de um complexo (Complexo FT-FVIIa). Este complexo irá ativar os fatores IX e X, em IXa e Xa, respectivamente (DALE & RANG, 2007; GALANAUD, LAROCHE, RIGHINI, 2013; GOODMAN, 2006; SUCKER & ZOTZ, 2015).

Na ativação da via intrínseca, chamada via de contato da parede do vaso, verifica-se a participação dos fatores VIII, IX, X, XI e XII da coagulação, além das proteínas pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular e íons  $Ca^{2+}$ . Quando a pré-caliceína, o cininogênio, o fator XI e XII são expostos à cargas negativas do vaso lesado, a pré-caliceína é convertida em caliceína, sendo esta capaz de ativar o fator XII. O fator XIIa acaba convertendo mais pré-caliceína em caliceína e ativando o fator XI. E na presença de íons  $Ca^{2+}$ , o fator XIa proporciona a ativação do fator IX (JOBBLING & EYRE, 2013; PRADELLA, TOMASELLA, MASCARETTI, 2012).

Finalmente, essas duas vias convergem em uma única via onde o fator IXa e VIIIa formam o complexo tenase, responsável por ativar o fator X. O Fator Xa em conjunto com o fator Va e íons  $Ca^{2+}$  formam o complexo protrombinase que atua sobre a protrombina (fator II) convertendo-a em trombina (fator IIa) (KING, 2012; SUCKER & ZOTZ, 2015).

A trombina então atua sobre o fibrinogênio, clivando-o, produzindo fragmentos que se polimerizam para formar fibrina, o chamado coágulo “solúvel”. Sob ação da fibronectina, esse coágulo pode ser estabilizado, embora não seja essencial

(MAURER *et al.*, 2012), pois a fibrina pode ativar uma fibrinoligase (fator XIII) que fortalece as ligações fibrina-fibrina, estabilizando assim o coágulo recém-formado (**Figura 8**) (CIPRANDI, HORN, TERMIGNONI, 2003; DALE & RANG, 2007; GOODMAN, 2006).



**Figura 8** – Esquema ilustrativo do modelo clássico da cascata de coagulação, caracterizando as principais etapas proteolíticas com formação de fibrina. Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

Uma diferente divisão da coagulação foi proposta por Roberts e colaboradores (1998) que consiste em três fases dependentes de superfícies celulares: iniciação, amplificação e propagação, como relatado na **Figura 9**.



A plasmina é uma serino-protease ativada após a clivagem do plasminogênio pelo ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com o plasminogênio e promovem a hidrólise de uma única ligação peptídica que resulta na formação da plasmina (PRADELLA, TOMASELLA, MASCARETTI, 2012; THELWELL, 2010).

Embora a plasmina degrade não somente a fibrina, mas também o fibrinogênio, fator V e fator VIII, em condições fisiológicas o processo de fibrinólise acontece de maneira específica sobre a fibrina, gerando uma ativação localizada e restrita, não sistêmica, cumprindo desta forma, sua função de remover o excesso de fibrina intravascular. Esta especificidade é resultado de interações moleculares específicas entre o plasminogênio e seus ativadores e a fibrina e os inibidores da fibrinólise. Essas enzimas também são reguladas por inibidores que incluem os inibidores do ativador do plasminogênio 1 e 2 (PAI-1 e PAI-2) que inativam o t-PA; enquanto a  $\alpha_2$  antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP) inativa a plasmina (GOODMAN, 2006; PRADELLA, TOMASELLA, MASCARETTI, 2012; THELWELL, 2010).

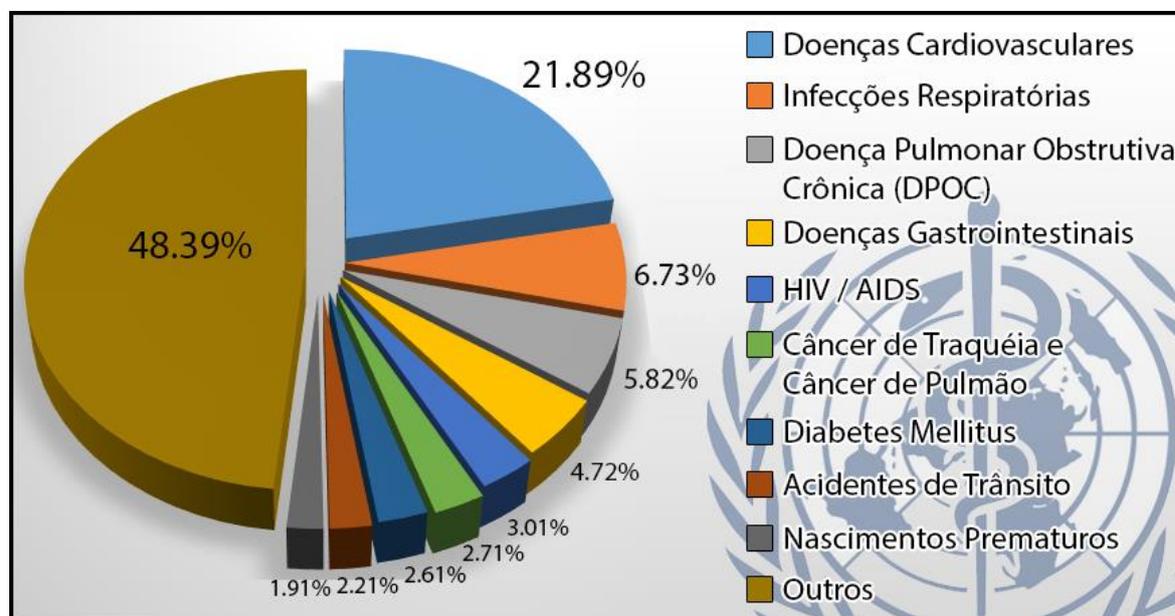
Apesar da existência desses eventos envolvidos no controle da hemostasia normal, oclusões ou mesmo embolias podem ser ocasionadas caso haja uma resposta exacerbada do processo hemostático induzidas por distúrbios fisiológicos. O produto desta indução, com frequência resulta no estabelecimento do quadro clínico denominado de trombose (KUMAR *et al.*, 2010).

### **3.2.1 Distúrbios tromboembólicos**

A circulação venosa e a arterial possuem diferenças fisiológicas consideráveis. A circulação venosa exibe fluxo sanguíneo mais lento com conseqüente menor hemorragia. Além disso, a trombina desempenha um papel fundamental em caso de lesão. De outra forma, na circulação arterial, uma pequena injúria pode ocasionar uma rápida e massiva hemorragia devido ao elevado fluxo sanguíneo. Neste caso, as plaquetas apresentam-se essenciais (OAKLEY & LARJAVA, 2012). O agregado plaquetário formado nas artérias é comumente chamado de trombo “branco”, por serem constituídos principalmente de plaquetas. O trombo “vermelho”, formado no sistema venoso, são ricos em fibrina e eritrócitos presos nessa rede (KING, 2012).

Diversos fatores, adquiridos ou genéticos, exercem influência contrária ao equilíbrio da hemostasia o que resulta em estados de hipo ou hipercoagulabilidade. O quadro patológico oposto à hemostasia é a trombose, como define Kummar colaboradores (2010), que pode ser oriunda de uma ativação inapropriada dos processos hemostáticos normais, tal como a formação de um coágulo sanguíneo (trombo) na vasculatura não lesionada ou oclusão trombótica de um vaso após uma lesão relativamente pequena (GALANAUD, LAROCHE & RIGHINI, 2013; AZMA *et al.* 2014).

Entre as doenças trombóticas mais recorrentes destacam-se a aterotrombose e o tromboembolismo venoso (TEV) que são doenças causadas por quadros de trombose arterial e trombose venosa, respectivamente (TURPIE & ESMON, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esses quadros patológicos fazem parte do grupo das doenças cardiovasculares e são a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, onde, em 2011, estima-se que 17,3 milhões de pessoas tenham morrido por estas causas, representando cerca de 30% do total de mortes mundialmente e estima-se que em 2030, esse valor suba para 23,6 milhões (**Figura 10**) (MAVRAKANAS & BOUNAMEAUX, 2011; WHO, 2013).



**Figura 10** – Principais causas de mortalidade em todo o mundo.  
Fonte: OMS, 2018.

### 3.2.1.1 Trombose venosa

O tromboembolismo venoso compreende a trombose venosa profunda e o embolismo pulmonar. Quando parte do trombo rompe-se, ele pode se deslocar até os

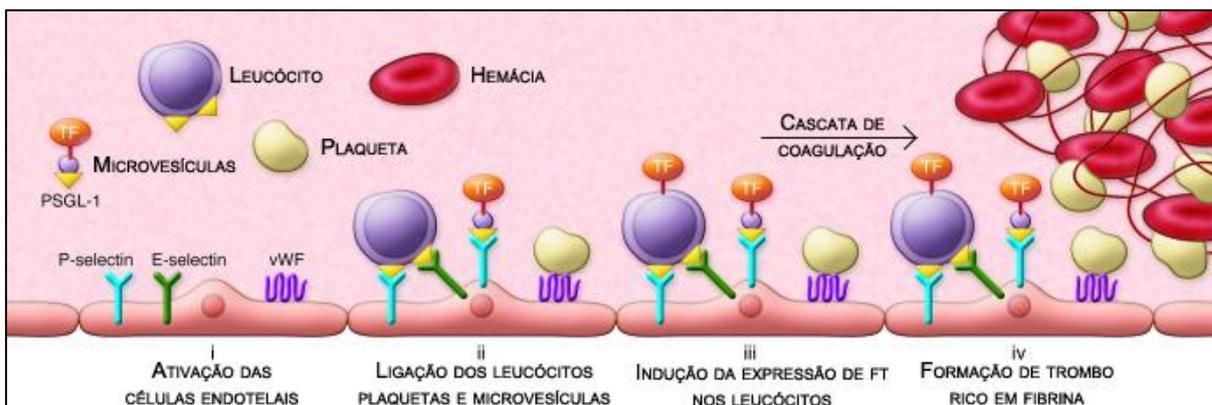
pulmões e interromper ou dificultar a passagem de sangue em uma artéria pulmonar ou um de seus ramos (ERIKSSON *et al.*, 2014; MACKMAN, 2012).

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

A estase venosa, que pode ser causada por inúmeros fatores, como imobilidade local, cirurgias ortopédicas e aumento da pressão venosa, promove a formação do trombo por não conseguir remover os fatores de coagulação ativados do local de injúria vascular (KUDERER, 2015; REYES *et al.*, 2013). Evidências ainda sugerem que o fator tecidual (TF, do inglês *tissue factor*) circulante ligado a microvesículas apresenta um papel fundamental na formação do trombo venoso, assim como as plaquetas na formação do trombo arterial (KUDERER, 2015; TURPIE & ESMON, 2011). Essas microvesículas ligam-se às células endoteliais ativadas e transferem o FT para elas, iniciando a cascata de coagulação e a formação do coágulo. Isso justifica o fato da maior parte dos trombos venosos serem formados em regiões com circulação sanguínea lenta ou deficiente (KROEGEL & REISSIG, 2003; KUDERER, 2015).

Mackman (2012) recentemente descreveu um mecanismo para a formação do trombo venoso, dividido em diferentes etapas. Na primeira, o endotélio é ativado por hipóxia e/ou mediadores inflamatórios e expressa as proteínas de adesão E-selectina, P-selectina e vWF. Na segunda, TF<sup>+</sup> MV/PSGL-1 (microvesículas expressando TF), leucócitos circulantes expressando PSGL-1 e plaquetas, ligam-se ao endotélio ativado. Em seguida, leucócitos ligados se ativam e expressam TF levando a ativação local da cascata de coagulação que ultrapassa o limiar protetor das vias anticoagulantes endógenas ocasionando o início da trombose (**Figura 11**) (MACKMAN, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013).

A principal causa da formação do trombo venoso é a ativação da cascata de coagulação, que precede a ativação plaquetária e sua agregação, consistindo principalmente de um agregado de eritrócitos e grande quantidade de fibrina. Isso explica porque terapias anticoagulantes são os principais alvos quando se trata de trombose venosa (KUDERER, 2015; TURPIE & ESMON, 2011).



**Figura 11** – Formação do trombo venoso, proposto por MACKMAN, 2012.

**Abreviaturas:** PSGL-1 = ligante glicoproteico da P-selectina e TF = fator tecidual

Embora o trombo venoso possa causar congestão e edema nos leitos vasculares distais, seu desprendimento e migração podem ser fatais. Inversamente, os trombos arteriais possuem importância direta no local de ocorrência propriamente dito, podendo causar infarto miocárdico ou cerebral (KUDERER, 2015; KUMAR *et al.*, 2010).

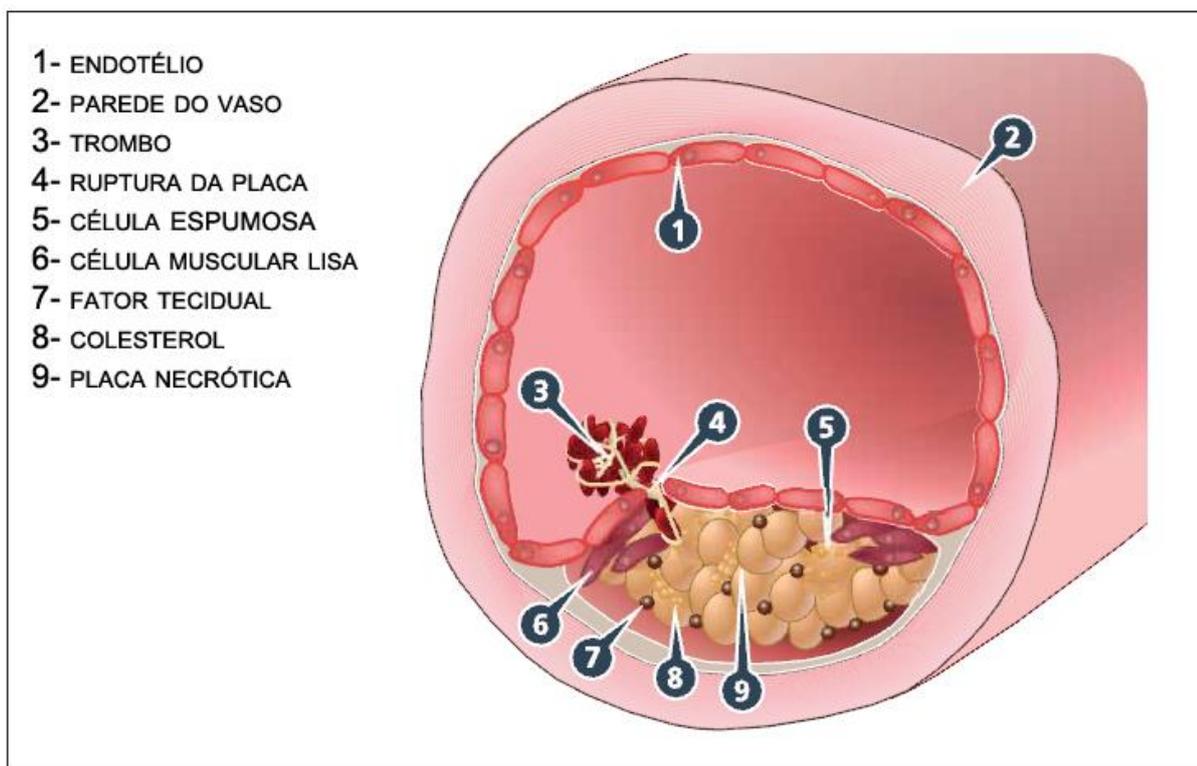
### 3.2.2.2 Trombose arterial

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

A aterosclerose é uma doença inflamatória multifatorial que acomete principalmente a camada íntima das artérias de médio e grande calibre. Inicia-se com uma lesão no endotélio relacionado principalmente com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e hipertensão. Com isso, a permeabilidade da camada íntima para lipoproteínas plasmáticas carregadas com colesterol é aumentada. A retenção destas lipoproteínas no local ocasiona a oxidação e recrutamento de monócitos e linfócitos. Os monócitos, ao migrar para o espaço subendotelial diferenciam-se em macrófagos e capturam as LDL oxidadas (sendo denominadas então de células espumosas) (JACKSON, 2011). Além disso, macrófagos entram em apoptose, promovendo o desenvolvimento das placas necróticas (também chamadas de placas lipídicas) ocasionando a liberação de lipídeos (em sua maioria colesterol) e incorporação dos mesmos à placa aterosclerótica (SEIMON & TABAS, 2009).

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

No estágio inicial da ruptura da placa, as plaquetas são rapidamente recrutadas ao local, seguidas por sua agregação, ocasionando um rápido crescimento do trombo. Adicionalmente, a cascata de coagulação é ativada, formando trombina, que ativa as plaquetas. Essas plaquetas ativadas promovem maior recrutamento, ativação, adesão e agregação plaquetária (SILVESTRI *et al.*, 2014; TURPIE & ESMON, 2011). Isso demonstra o papel fundamental que as plaquetas desenvolvem na formação do trombo arterial (**Figura 12**).



**Figura 12** – Trombose arterial e seus constituintes.  
Fonte: TURPIE & ESMON, 2011.

### 3.2.2 Agentes antitrombóticos

O tratamento dos quadros tromboembólicos baseia-se no uso de fármacos antitrombóticos, como anticoagulantes e antiagregantes plaquetários. O avanço destas terapias tem proporcionado uma nítida melhora na evolução do quadro de pacientes com síndromes miocárdicas, eventos isquêmicos e no controle do risco de complicações hemorrágicas (AKWAA & SPYROPOULOS, 2013). Mesmo assim, muito dos fármacos atuais apresentam limitações em seu uso sendo necessários avanços para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (GALANAUD, LAROCHE, RIGHINI, 2013; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012).

#### 3.2.2.1 Anticoagulantes

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

Os fármacos mais utilizados como anticoagulantes são as heparinas e os antagonistas de Vitamina K (Ex: warfarina) (TESTA *et al.*, 2007). A warfarina, utilizada oralmente, bloqueia a gama carboxilação de diversos resíduos de glutamato dos fatores de coagulação, mais especificamente os fatores: II, VII, IX e X. Além disso, atua como um cofator para as proteínas anticoagulantes endógenas C, S e Z (FAREED, THETHI, HOPPENSTEADT, 2012; SCAGLIONE, 2013). Isso resulta na inativação destes fatores e proteínas, alterando a regulação do sistema de coagulação. Uma das grandes problemáticas dos antagonistas da vitamina K estão relacionados com o mecanismo de ação de lento início (efeito inicial de dois a três dias após tratamento), que, em casos mais graves, não é recomendado (ALTMAN, 2014; ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; SCAGLIONE, 2013). Outras problemáticas destes medicamentos são as diversas interações com outros fármacos, como antibióticos (metronidazol, cefalosporinas e fluconazol) e diversos alimentos, induzindo o paciente a uma restrita alimentação (FAREED, THETHI, HOPPENSTEADT, 2012; KENNEDY *et al.*, 2012), além de uma estreita janela terapêutica (ALTMAN, 2014; ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; SCAGLIONE, 2013).

Dentro da classe da heparina, existem as heparinas não-fracionadas (HNF) que atuam como anticoagulantes via antitrombina III (ATIII). Após formação do complexo

HNF-AT, ocorre uma mudança conformacional na AT que permite a inibição dos fatores XIIa, XIa, IXa, Xa e trombina. Seu extenso uso para tratamentos de quadros trombóticos baseava-se na rápida reversibilidade de seus efeitos e a existência de um antídoto: sulfato de protamina (BACCHUS & CROWTHER, 2013; KENNEDY *et al.*, 2012; MCGRATH *et al.*, 2014).

Embora muito utilizada, foram demonstradas algumas dificuldades nessa terapêutica, incluindo sua curta meia-vida (trinta minutos), baixa quantidade de obtenção (proveniente do fígado de mamíferos) com facilidade de contaminação, incapacidade de inativar a trombina ligada a fibrina ou ao FXa no complexo protrombinase, interações com diversas proteínas plasmáticas e o efeito coagulante variável de paciente para paciente, sendo necessário um monitoramento contínuo (FAREED, THETHI, HOPPENSTEADT, 2012; KENNEDY *et al.*, 2012). Ainda, efeitos adversos mais severos incluem hemorragias, osteoporose ou trombocitopenia induzida por heparina (KENNEDY *et al.*, 2012; BACCHUS & CROWTHER, 2013).

Devido as complicações do uso da HNF, heparinas de baixo peso molecular (HBPM) foram desenvolvidas para ultrapassar essas limitações (enoxaparina, dalteparina, tinzaparina). Essas foram produzidas por despolimerização das HNF, fragmentando-a em aproximadamente um terço. Com isso, o efeito sobre a trombina foi diminuído, visto que, as HBPMs não conseguem se ligar simultaneamente com a trombina e a ATIII, mas permaneceram como potentes anticoagulantes ao inibir o FXa (FAREED, THETHI, HOPPENSTEADT, 2012; KENNEDY *et al.*, 2012; MCGRATH *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a interação com proteínas plasmáticas diminuiu, levando a efeitos anticoagulantes mais controláveis. Mesmo assim, algumas desvantagens continuaram: incapacidade de inativar trombina ligada a fibrina ou ao FXa no complexo protrombinase; administração parenteral e um clearance renal diminuído (BACCHUS & CROWTHER, 2013; MCGRATH *et al.*, 2014).

Tendo em vista as inúmeras complicações associadas as terapias convencionais, como a administração parenteral, a grande capacidade de interação com alimentos (GEBUIS *et al.*, 2011) e a curta janela terapêutica, além dos efeitos adversos, tais como as hemorragias, neutropenia induzida, anemia aplásica e trombocitopenia, devido ao longo período de uso, (AKWAA & SPYROPOULOS, 2013; ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; KUNADIAN *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2014) existe

uma grande busca por novas terapias anticoagulantes (LIP *et al.*, 2011; MCGRATH *et al.*, 2014).

Os anticoagulantes mais novos lançados no mercado compreendem pequenas moléculas sintéticas que agem sobre um fator de coagulação prioritariamente, como os inibidores diretos e indiretos do fator Xa e os inibidores diretos da trombina (ALTMAN, 2014; HARDER & GRAFF, 2013; O'DELL, IGAWA, HSIN, 2012; ZHANG, 2014).

Os inibidores diretos reversíveis ou irreversíveis do FXa incluem o apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban e edoxaban. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição direta do FXa, mesmo que ligado ao complexo protrombinase, sem necessidade da ATIII como mediador. São considerados de rápido início de efeito, descartando necessidade de injeção intravenosa de anticoagulantes em quadros críticos e não interagem com enzimas do citocromo P450 ou com os alimentos, diferentemente dos anticoagulantes tradicionais. Sua eliminação ocorre por diversas vias, facilitando a utilização por pacientes que apresentam problemas renais e são administrados por via oral, sem necessidade de monitoramento frequente (KENNEDY *et al.*, 2012; BACCHUS & CROWTHER, 2013; SCAGLIONE, 2013; MCGRATH *et al.*, 2014).

Mesmo com essas vantagens, alguns problemas como a dificuldade de reverter o efeito anticoagulante, levando a quadros hemorrágicos severos foram relatados (BACCHUS & CROWTHER, 2013; GARCIA, LIBBY, CROWTHER, 2010; MCGRATH *et al.*, 2014; SCAGLIONE, 2013).

Os inibidores indiretos do FXa, como o fondaparinux, idraparinux e idrabiotaparinux não interagem diretamente com fatores da cascata de coagulação. Seu mecanismo de ação baseia-se na interação com a ATIII, ativando-a e inibindo assim o FXa. Estudos farmacocinéticos demonstraram que esses fármacos exibem um rápido mecanismo de ação e cerca de 100% de biodisponibilidade. Geralmente eles são utilizados em doses diárias, sem necessidade de monitoramento contínuo, apresentando assim um perfil melhor que os anticoagulantes tradicionais (KENNEDY *et al.*, 2012; BACCHUS & CROWTHER, 2013; SCAGLIONE, 2013; MCGRATH *et al.*, 2014).

Outra classe de inibidores são os inibidores diretos da trombina, como a hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban e dabigatran que inibem a

coagulação por ação direta sobre a trombina. Esses inibidores podem se ligar na trombina em duas regiões: no sítio ativo ou exosítio I ou II. O exosítio I atua como um local de ancoragem para diversos peptídeos, incluindo a fibrina (BACCHUS & CROWTHER, 2013; FAREED, THETHI, HOPPENSTEADT, 2012; MCGRATH *et al.*, 2014).

Alguns desses inibidores são capazes de se ligar a trombina no sítio ativo e no exosítio I, como hirudina, lepirudina e bivalirudina (BACCHUS & CROWTHER, 2013; SCAGLIONE, 2013; MCGRATH *et al.*, 2014). Esses inibidores possuem capacidade de inibir a trombina solúvel e trombina ligada a fibrina onde, em contrapartida, a heparina é limitada a trombina solúvel. Assim como os inibidores diretos do FXa, apresentam um rápido início de efeito, não se ligam a proteínas plasmáticas e não há um antídoto para reverter o quadro (GARCIA, LIBBY, CROWTHER, 2010; KENNEDY *et al.*, 2012; BACCHUS & CROWTHER, 2013; SCAGLIONE, 2013; ALTMAN, 2014).

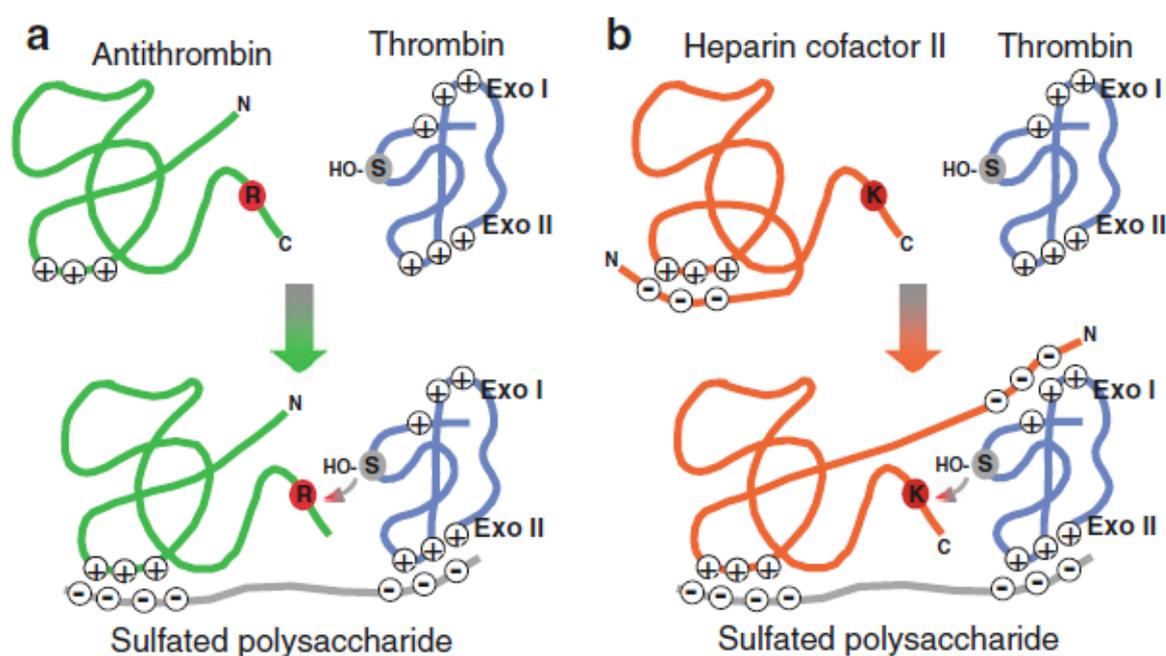
Finalmente, anticoagulantes de origem natural, como polissacarídeos sulfatados, tem atraído grande interesse nas pesquisas pela vasta utilização destes em cosméticos, suplementos alimentares e como alimentos funcionais. Um grande exemplo é a fucana sulfatada, também chamada de fucoidana (MOURÃO, 2004; FITTON, 2011; JIAO *et al.*, 2011; POMIN, 2012; POMIN & MOURÃO, 2012; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012; LI, B. *et al.*, 2017), devido sua baixa toxicidade, sendo biodegradável e biocompatível (DEUX *et al.*, 2002; ALE, MIKKELSEN, MEYER, 2011a; FITTON, 2011; ABU *et al.*, 2013; POMIN, 2014; ZAPOROZHETS & BESEDNOVA, 2016; ZHAO *et al.*, 2016; MARINVAL *et al.*, 2018).

As fucoidanas são isoladas de algas marrons marinhas pertencentes a família de polissacarídeos sulfatados. Várias espécies deste polissacarídeo apresentam esqueleto similar com diferentes quantidades dos constituintes (fucose, xilose, galactose e sulfato) (FITTON, 2011; JIAO *et al.*, 2011; POMIN & MOURÃO, 2012; LI *et al.*, 2017) devido, principalmente, ao método de extração da fucoidana, local e período da coleta (MOURÃO, 2004; POMIN & MOURÃO, 2012).

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição direta e indireta da trombina (fator II) através de seus inibidores endógenos (antitrombina III e cofator II da heparina). A antitrombina é uma serpino-protease que interage com diversos fatores da cascata de coagulação, como o fator Xa, IXa, XIa, XIIa e calicreína plasmática. Já

o cofator II da heparina está diretamente relacionado com a inibição da trombina (RUTHERFORD, 1996; JIAO *et al.*, 2011; POMIN, 2014; LI *et al.*, 2017) (**Figura 13**).

A literatura apresenta diversas espécies com diferentes perfis coagulantes, dependentes da estrutura, posição e quantidade dos grupamentos sulfato, composição dos monossacarídeos e peso molecular (UDANI & HESSLINK, 2012; WIJESINGHE & JEON, 2012; LI *et al.*, 2017). Das diversas espécies estudadas relatadas na literatura, apenas a espécie *Fucus vesiculosus* está disponível de forma comercial, a qual, apresenta grande atividade anticoagulante quando comparada à outras espécies (BOISSON-VIDAL *et al.*, 2000; CHEVOLOT *et al.*, 1999; CHURCH *et al.*, 1989; FITTON, 2011).



**Figura 13** – Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da fucoidana.

A figura (A) e (B) demonstram a inibição da trombina pela antitrombina e cofator II da heparina, com a fucoidana formando uma ponte eletrostática entre eles, respectivamente.

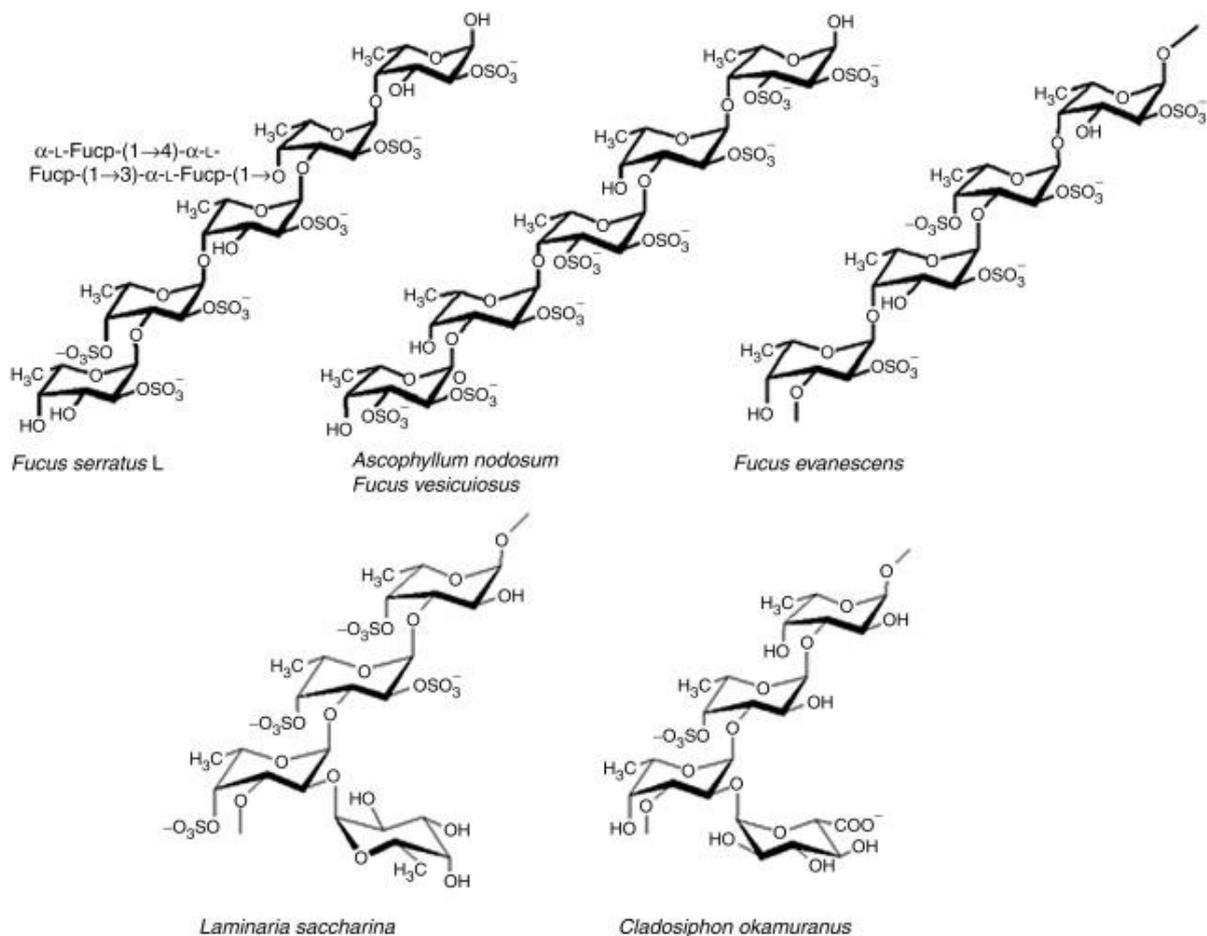
**Abreviaturas:** EXO = exossítio.

Fonte: POMIN, 2014.

Cumashi e colaboradores descreveram a atividade de nove diferentes fucoidanas extraídas de *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Fucus evanescens*, *F. serratus*, *F. distichus*, *F. spiralis*, *Ascophyllum nodosum* e *Cladosiphon okamuranus*., onde foi possível perceber que apenas a espécie *A. nodosum* apresentou discreta atividade anticoagulante com grande afinidade para P-selectina (expressa em grande quantidade em locais lesionados e plaquetas ativadas), sendo a mais propícia para o presente trabalho, visto que as outras espécies apresentavam expressiva atividade

anticoagulante (BACHELET *et al.*, 2009; BARBAUX *et al.*, 2010; BORSIG *et al.*, 2011; CUMASHI *et al.*, 2007; ROUZET *et al.*, 2011).

O esqueleto estrutural das fucoidanas pode variar segundo a espécie e forma de extração. Por exemplo, a fucoidana extraída da espécie *A. nodosum* é majoritariamente composta de 8 a 14 unidades de monossacarídeos formando polissacarídeos através de ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). A fucoidana disponível comercialmente (extraída da *F. vesiculosus*) exibe um esqueleto similar, mas com presença de 2,4-di-O-metilfucose e 2,3-di-O-metilfucose, que está relacionada com sua grande atividade anticoagulante (ALE, MIKKELSEN, MEYER, 2011a; WIJESINGHE & JEON, 2012; LIM & WAN AIDA, 2017) (Figura 14).

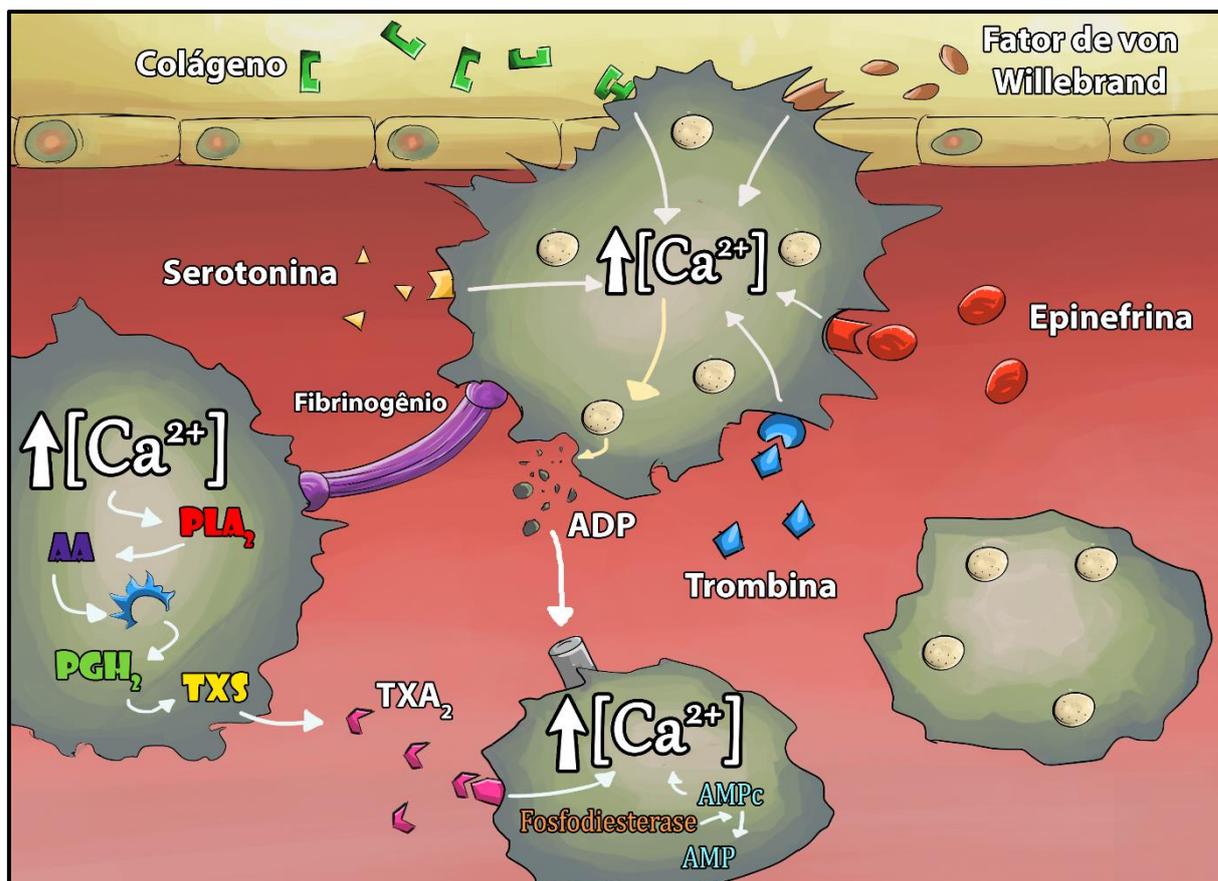


**Figura 14** – Esqueleto estrutural de fucoidana extraídas de diversas espécies. Fonte: Adaptado de LIM & AIDA, 2017.

### 3.2.2.2 Inibidores plaquetários

A inibição plaquetária baseia-se principalmente em dois conceitos: a inibição dos agentes protrombóticos (agonistas, receptores e enzimas) e a modulação dos fatores antiagregantes endógenos. Essas inibições atuam via mecanismos diferentes

(sobre os fatores e/ou vias de síntese plaquetária em que essas moléculas estão envolvidas). Dentre os inibidores plaquetários mais utilizados estão o ácido acetilsalicílico, o clopidogrel e os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa (**Figura 15**) (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; BERNARD & LIONEL, 2013; WATT, DAWSON, BRADY, 2013).

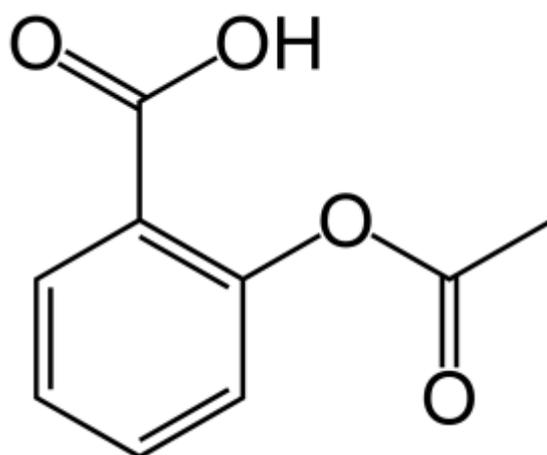


**Figura 15** – Esquema ilustrativo das principais vias de ativação e agregação plaquetária.

**Abreviaturas:** PLA<sub>2</sub> = Fosfolipase A<sub>2</sub>; AA = Ácido Araquidônico; PGH<sub>2</sub> = Prostaglandina H<sub>2</sub>; TXS = Tromboxano Sintase; TXA<sub>2</sub> = Tromboxano A<sub>2</sub>.

Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

O ácido acetilsalicílico (AAS), conhecido comercialmente pelo nome de aspirina<sup>®</sup>, é utilizado na prevenção primária e secundária de eventos trombóticos como derrame e infarto do miocárdio (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; WEBER, WEIMAR, DIENER, 2009) (**Figura 16**). Seu mecanismo de ação antiagregante plaquetário é a acetilação irreversível da hidroxila da porção da SER530, no sítio ativo da Ciclooxygenase 1 (COX-1). Essa modificação química inibe a ligação do ácido araquidônico (AA) no interior do sítio ativo inviabilizando a síntese de Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (LEI *et al.*, 2014).



**Figura 16** – Estrutura do ácido acetilsalicílico

Fonte: Estrutura obtida com auxílio do software Marvin Sketch® ChemAxon®

O clopidogrel é um antiagregante plaquetário pertencente ao grupo das tienopiridinas. Ele é um pró-fármaco absorvido pelo intestino e metabolizado no fígado por isoformas da enzima P-450. Seu mecanismo de ação é a inibição irreversível dos receptores P2Y<sub>12</sub> de adenosina difosfato (ADP), presentes nas plaquetas, exercendo sua ação através da formação de ligações disulfícas com dois resíduos de serina (SER-17, SER-270) da molécula receptora (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; BERNARD & LIONEL, 2013; DELOUGHERY, 2015; QURESHI & HOBSON, 2013).

Outros antagonistas do receptor P2Y<sub>12</sub> como cangrelor, ticagrelor e elinogrel, não requerem ativação metabólica e ligam-se diretamente e reversivelmente ao P2Y<sub>12</sub>, em contraste com o clopidogrel. Além disso, por serem antagonistas reversíveis, seus efeitos inibitórios decaem à medida que a concentração do fármaco diminui (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; HEPTINSTALL, 2013; KOHLI, 2012).

Os três principais fármacos que representam a classe de inibidores GP IIb/IIIa são o abciximab, a eptifibatida e o tirofibano. Suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas fornecem em pouco tempo uma alta inibição dos receptores GPIIb/IIIa das plaquetas para combater a trombose que pode ocorrer em resposta ao rompimento mecânico de placas de ateroma durante e imediatamente após angioplastia coronária (WALLEN, JOHNSON, BELLANDER, 2013; AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; DELOUGHERY, 2015).

Agentes inibidores mais novos podem ser separados em quatro grupos: 1) Inibidores da TXS; 2) Antagonistas TXA<sub>2</sub>R; 3) Antagonistas PAR-1; e 4) Inibidores

fosfodiesterase (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; SIKKA & BINDRA, 2010; TELLO-MONTOLIU *et al.*, 2012).

O ácido araquidônico (AA) está presente na forma esterificada nas membranas das células e é degradado por dois sistemas enzimáticos: a) a via da ciclooxigenase (COX), que produz a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), precursora de outras prostaglandinas, prostaciclina e dos tromboxanos e b) via da lipoxigenase, relacionada com a produção dos leucotrienos (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; BAYNES & MAREK, 2005; HEPTINSTALL, 2013).

A tromboxano sintase (TXS) a partir da prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), sintetiza o Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que é um mediador inflamatório e potente ativador plaquetário. Este, por sua vez, atua no receptor de Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>R), permitindo o acúmulo intracelular de cálcio e a consequente agregação plaquetária (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; HEPTINSTALL, 2013; XIANG *et al.*, 2008).

Embora a inibição da TXS não esteja diretamente relacionada com a agregação plaquetária induzida por outros agonistas, como por exemplo colágeno ou ADP, a acentuada produção de PGI<sub>2</sub> aumenta a concentração de AMP cíclico (AMPc) e previne a agregação plaquetária induzida por diversos agonistas como a trombina (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; FITZGERALD, FRAGETTA, FITZGERALD, 1988).

Os antagonistas TXA<sub>2</sub>R incluem o terutroban e a picotamida. O terutroban é um antagonista específico do receptor TXA<sub>2</sub>. Essa inibição impede que o TXA<sub>2</sub> ligue-se ao seu receptor (TXA<sub>2</sub>R), impedindo o acúmulo intracelular de cálcio e a consequente agregação plaquetária (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; PAMUKCU, HUBER, LIP, 2012; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012). Já a picotamida, além de bloquear o receptor TXA<sub>2</sub>, inibe também a tromboxano sintase (TXS), responsável pela síntese do TXA<sub>2</sub> (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012).

O PAR-1 pertence a família dos receptores ativados por proteases acoplados à proteína G. Esse receptor é expresso pelas plaquetas humanas que pode ser ativado por trombina, induzindo assim, a agregação plaquetária e também é encontrado em células endoteliais, células musculares lisas e cardiomiócitos. Um importante antagonista de PAR-1 está em fase de estudos clínicos: vorapaxar e atopaxar (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; TOMASELLO, ANGIOLILLO, GOTO, 2010; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012).

O vorapaxar é um antagonista competitivo, que não afeta a agregação plaquetária mediada por outros agonistas e nem a conversão de fibrinogênio em fibrina (que é mediada pela trombina). Embora seja um antagonista reversível, dissocia-se lentamente de seu receptor, possuindo assim uma longa meia-vida (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014; SMYTH *et al.*, 2009; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012). Já o atopaxar é um potente antagonista PAR-1 que inibe a agregação plaquetária mediada por trombina (AHLUWALIA & BHANWRA, 2014).

Finalmente, sobre os inibidores fosfodiesterase, é importante ressaltar que o AMPc tem um importante papel na inibição endógena das plaquetas, onde seus níveis intracelulares são balanceados pela atividade da adenilato ciclase e fosfodiesterases (PDE). O aumento da concentração do AMPc resulta na inibição de transdução de sinal na plaqueta (PAMUKCU, HUBER, LIP, 2012; TELLO-MONTOLIU *et al.*, 2012). As fosfodiesterases (PDEs) compreendem um amplo número de enzimas que hidrolizam nucleotídeos cíclicos, como o AMCc e o GMPc em nucleotídeos inativos por clivar a ligação fosfodiéster. Três tipos de PDEs são encontradas nas plaquetas humanas, como PDE<sub>2</sub>, PDE<sub>3</sub> e PDE<sub>5</sub>, sendo a PDE<sub>3</sub> a isoforma mais ativa para hidrolizar o AMPc (BRITO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; AHLUWALIA & BHANWRA, 2014).

O dipiridamol é um derivado pirimido-pirimidina que possui atividade antiagregante plaquetária e propriedades vasodilatadoras, sendo seu mecanismo de ação resultante do bloqueio da PDE<sub>2</sub>. No entanto, estudos clínicos demonstraram resultados insatisfatórios, levando então a sua utilização em combinação com o AAS (DELOUGHERY, 2015). Além do dipiridamol, outro fármaco inibidor da fosfodiesterase é o cilostazol, sendo este, um inibidor reversível do PDE<sub>3</sub>. A literatura releita efeitos antiagregantes plaquetários, vasodilatadores e antimitogênicos (DELOUGHERY, 2015; PAMUKCU, HUBER, LIP, 2012).

### **3.2.3 Ácido acetilsalicílico, fucoidana e nano / microtecnologia**

Diversos estudos estão utilizando a nano- e microtecnologia para superar os efeitos adversos causados pelos tratamentos convencionais, principalmente relacionados com os anticoagulantes (JIAO *et al.*, 2002; DAS, BANERJEE, BELLARE, 2005; BARUA & DAS, 2013; AGRAWAL *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2014; ARANAZ *et al.*, 2017; LI, B. *et al.*, 2017). Entretanto, há poucos relatos sobre a nano- e

microtecnologia associada a antiagregantes plaquetários (GUI *et al.*, 2012; JUNET *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2015; SHRIVASTAVA *et al.*, 2009; SUBRAMANIAN *et al.*, 2008; TANG *et al.*, 2012).

Considerando um antiagregante plaquetário clássico como o AAS, observa-se grande utilização no tratamento e prevenção de eventos trombóticos, geralmente associados com clopidogrel ou outro agente antiagregante plaquetário (ALTMAN *et al.*, 2004; ALTMAN, RIVAS, GONZALEZ, 2012; ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014). Uma das grandes problemáticas do uso crônico do AAS é o risco aumentado de complicações gastrointestinais, como úlceras e sangramentos (ANGIOLILLO *et al.*, 2013; CHOI & KIM, 2013; EL-HAYEK *et al.*, 2014, p.; KUNADIAN *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2014), sendo necessários avanços para superar essas limitações (EL-HAYEK *et al.*, 2014; GALANAUD, LAROCHE, RIGHINI, 2013; WEITZ, EIKELBOOM, SAMAMA, 2012).

Diversas formas farmacêuticas do AAS estão disponíveis no mercado, tais como formulações revestidas ou de liberação controlada para ultrapassar esses efeitos adversos, que, muitas vezes, ocasionam uma alta taxa de desistência do tratamento principalmente em pacientes que precisam de terapia contínua (AL-GOUSOUS & LANGGUTH, 2018; BLIDEN *et al.*, 2016; GOLDSTEIN *et al.*, 2016; HAASTRUP, GRØNLYKKE, JARBØL, 2015; PATRONO & ROCCA, 2010; SALLUM *et al.*, 2014).

Além disso, essas problemáticas versam sobre o tratamento recomendado seguindo guias disponíveis em diversos países. Por exemplo, para eventos trombóticos primários, a *American Heart/Stroke Association* e *American College of Chest Physicians* recomendam doses de AAS apenas se o benefício superar os riscos dos efeitos adversos. A *European Society of Cardiology* recomenda apenas para pacientes com alto risco de apresentarem quadros trombóticos. Já a *Canadian Cardiovascular Society* não recomenda sua utilização (CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014).

Em relação à eventos trombóticos secundários (ou recorrência), todos entram no consenso de que é necessário utilização de pequenas doses de AAS de forma regular (crônica) (CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014). Diversos estudos clínicos, de 1988 a 2010

tentaram determinar a dose ótima para efeito antitrombótico do AAS sem danos no trato gastrointestinal, com variações de 75 a 500 mg/dia. Os resultados para doses menores que 100 mg/dia foram os mais satisfatórios, embora ainda tenha sido relatada desistência do tratamento devido principalmente à quadros hemorrágicos (AWTRY & LOSCALZO, 2000; CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; CRYER & FELDMAN, 1999; HEDBERG *et al.*, 2013; KOLBER & KOROWNYK, 2014; MARTÍN-MERINO *et al.*, 2014).

Há poucos estudos que utilizam o AAS associado a nano- e micropartículas. Um exemplo, é o estudo de Das, Banerjee e Bellare (2005) que desenvolveram nanopartículas de albumina e AAS através da técnica de coacervação para observar seus efeitos anti-inflamatórios (DAS, BANERJEE, BELLARE, 2005). Mais recentemente, Liu e colaboradores (2014) desenvolveram micropartículas de copolímeros biodegradáveis e AAS e Gugu, Chime e Attama (2015) desenvolveram micropartículas lipídicas sólidas e AAS para melhorar a solubilidade deste fármaco (GUGU, CHIME, ATTAMA, 2015). Mesmo assim, não foi possível encontrar nenhum trabalho que associasse microtecnologia com AAS para tratamentos de quadros trombóticos.

As fucoidanas são promissoras neste campo por apresentarem atividade anticoagulante, antiagregante plaquetária e, mais recentemente, como agonistas plaquetários (MANE *et al.* 2013). O seu mecanismo de ação como agonista baseia-se na interação destes polissacarídeos com receptores de lecitina tipo C (CLEC-2) presente nas plaquetas (MANNE *et al.*, 2013a) e como inibidores da coagulação relaciona-se com a inibição direta e indireta da trombina (fator II) através de seus inibidores endógenos (antitrombina III e cofator II da heparina) (RUTHERFORD, 1996; JIAO *et al.*, 2011; POMIN, 2014; LI *et al.*, 2017).

Em relação ao campo da nanotecnologia, a maioria dos trabalhos utilizam quitosana (polissacarídeo catiônico) em conjunto com a fucoidana (polissacarídeo aniônico) devido a facilidade de desenvolvimento (método de coacervação ou *cross-linking*). Huang e colaboradores (2014) utilizaram diversas técnicas combinando quitosana e fucoidana para distribuição de fármacos pela via oral (HUANG *et al.*, 2014) e Kim, Lee e Lee (2016) desenvolveram nanocápsulas de ginseng e fucoidana, onde foi caracterizada atividade antitrombótica *in vivo* no modelo de trombose induzida pela veia caudal de camundongos (KIM, LEE, LEE, 2016).

Da Silva e colaboradores (2012), demonstraram atividade anticoagulante de nanopartículas baseadas em polissacarídeos (SILVA, LETOURNEUR, CHAUVIERRE, 2014; SILVA *et al.*, 2018) e recentemente, esse mesmo grupo (2018) desenvolveu nanopartículas de fucoidana e quitosana com perfil antitrombótico promissor nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, assim como no tempo de sangramento *in vivo* (SILVA *et al.*, 2018) de forma diferente aos outros estudos, onde a fucoidana não representava a substância farmacologicamente ativa, mas apenas um dos constituintes da formulação.

Levando em consideração a seletividade da fucoidana para P-selectina, Juenet e colaboradores (2018) desenvolveram nanopartículas poliméricas funcionalizadas com este polissacarídeo com o intuito de direcionar a ação de fármacos trombolíticos, relatando um eficiente direcionamento (JUENET *et al.*, 2018).

No campo da microtecnologia, Park, Hwang e Lee (2011) desenvolveram hidrogéis dependentes do pH a partir de micropartículas compostas de fucoidana e quitosana através de uma nova técnica, denominada *eletro-spray-drying* (PARK, HWANG, LEE, 2011); Ko, Oh e Park (2012) prepararam micropartículas de gelatina e fucoidana, percebendo que a fucoidana melhorava o perfil de mucoadesão (KO, OH, PARK, 2012) e Sezer e Akbuğa (2006 e 2009) desenvolveram micropartículas baseadas em fucoesferas<sup>®</sup> (uma mistura de quitosana e fucoidana) para carrear proteínas, peptídeos e plasmídeos (SEZER & AKBUĞA, 2006, 2009).

Com base nestes estudos, evidencia-se a originalidade e necessidade deste estudo visando o desenvolvimento de micropartículas de AAS associadas à fucoidana para liberação pulmonar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP-UFRJ) em parceria com o Professor Doutor Plínio Cunha Sathler, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo aprovado sob número **621.196**. Ainda, foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo aprovado sob número 002/19 (**Anexo 10.1**)

### 4.2 MATERIAIS

Ácido acetilsalicílico (AAS); Ácido salicílico (AS); L-Lisina e L-Leucina (Dose Certa<sup>®</sup>, Porto Alegre/Brasil), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC / Methocel<sup>™</sup> F4M – ColorCon<sup>®</sup> - VBN 2F27012N13), quitosana de baixo peso molecular (Peso molecular: 50 - 190 kDa, grau de desacetilação  $\geq 75\%$ ; Sigma Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo/Brasil), mucina Tipo II e pepsina (Sigma Aldrich, São Paulo/Brasil), fucoidana (Ascophyllum nodosum, WuXi AccoBio Biotech Inc. Wuxi/China), ácido acético (Neoquímica<sup>®</sup>), ácido fosfórico (Neoquímica<sup>®</sup>), propilenoglicol (Neoquímica<sup>®</sup>), deoxicolato de sódio, cloreto de benzalcônio (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo/Brasil), acetonitrila (Merck<sup>®</sup>, Alemanha), ácido araquidônico, adenosina difosfato (ADP) e colágeno (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo/Brasil). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau farmacêutico.

### 4.3 FORMULAÇÕES PULVERULENTAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR

#### 4.3.1 Estabilidade do AAS em água

Os ensaios foram realizados utilizando 50 mL de água ultrapura com (0,5, 1 e 2% de propilenoglicol) ou sem agente anti-hidrolítico adicionando 150 mg de AAS e vortex por 2 minutos. Em seguida, em tempos pré-determinados de coleta (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas), 20  $\mu$ L desta solução foi adicionada a um eppendorf contendo 1980  $\mu$ L de água ultrapura e filtrada (0.45  $\mu$ m, Millipore, USA), procedendo com a quantificação por HPLC-UV com auxílio de um cromatógrafo Perkin Elmer<sup>®</sup>, coluna Waters Nova-Pak<sup>®</sup> (C18, 4  $\mu$ m, 3,9 x 150 mm) e pré-coluna do mesmo fabricante. A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura de água ultrapura, acetonitrila e ácido fosfórico na proporção 40: 60: 0,2 (v:v). As condições cromatográficas foram: volume

de injeção 10 µL, vazão de 0,8 mL/min, detecção em UV 237 nm e tempo de análise de 3 minutos.

#### 4.3.2 Delineamento da formulação de sistemas de liberação de pó inalável contendo AAS e fucoidana

Esta etapa visou o desenvolvimento de uma formulação de pó inalável para liberação pulmonar de AAS associada à fucoidana, através da técnica de secagem por aspersão (Mini Spray Dryer B-290®, BÜCHI Labortechnik AG®). As condições do processo de secagem consideraram metodologia previamente descrita por Zatta e colaboradores (2018) com algumas modificações (temperatura de entrada e fluxo da bomba). O rendimento do processo de secagem foi calculado para cada formulação considerando a massa total de partículas coletadas ao final da produção em função da massa total de sólidos inicial de cada formulação (n = 3).

A **Tabela 1** demonstra as condições do processo de secagem. Após esse processo, o pó foi coletado em frascos de vidro âmbar e armazenado em condições ambiente em um desumidificador.

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

Parâmetros	Condição
<i>Spray Mesh</i> (diâmetro do bico - µm)	7
<i>Inlet</i> (temperatura de entrada °C)	120
<i>Outlet</i> (temperatura de saída °C)	68
<i>Aspirator</i> (Aspiração do líquido %)	100
Fluxo da bomba (%)	15
<i>Nozzle Cleaner</i> (frequência de limpeza do bico)	1
Modo	Aberto

Todos os estudos dos pós inaláveis utilizaram 10 mg de fucoidana solubilizados em 100 mL de água ultrapura sob agitação mínima de 12 horas (Concentração = 100 µg/mL).

Os adjuvantes inicialmente testados em conjunto com o AAS e fucoidana foram: Poloxamer 188 (Pluronic® F-68); deoxicolato de sódio; cloreto de benzalcônio e L-lisina.

Para a formulação contendo Polaxamer 188 (Pluronic® F-68): foram preparadas soluções de Poloxamer 188 (0,1; 0,25 e 0,50 g) + 0,15 g de AAS + 25 mL de H<sub>2</sub>O + propilenoglicol 2% mantidas sob agitação magnética moderada a 37 °C em diferentes tempos de agitação (30, 40, 50 e 60 minutos) e sonicação (**Solução A** - 30, 40 e 50

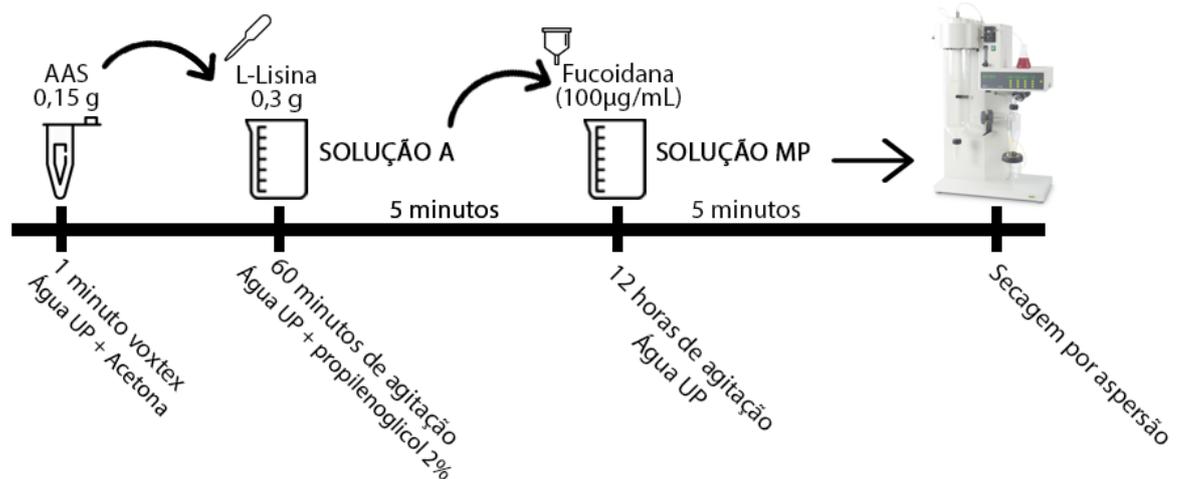
minutos) e então, com auxílio de um funil, 25 mL da solução de fucoídana previamente preparada foi adicionada à 25 mL da **solução A** continuando sob agitação por mais 5 minutos antes do processo de secagem.

Para a formulação contendo L-Lisina objetivando determinar a influência dos parâmetros de solubilização, foram preparadas soluções de 0,25 g de L-Lisina + 0,15 g de AAS + 25 mL de H<sub>2</sub>O + propilenoglicol 2% mantida sob agitação magnética moderada a 37 °C em diferentes tempos de agitação (30, 40, 50 e 60 minutos) e sonicação (**Solução A** - 0, 30 e 40 minutos) e então, com auxílio de um funil, 25 mL da solução aquosa de fucoídana previamente preparada foi adicionada à 25 mL da **solução A** permanecendo sob agitação por mais cinco minutos antes do processo de secagem. O mesmo processo foi utilizado para as formulações contendo deoxicolato de sódio (Fds) ou cloreto de benzalcônio (Fcb).

De acordo com as metodologias empregadas a partir de extensa análise dos dados, a **Figura 17** demonstra a metodologia desenvolvida para a obtenção de um sistema carreador baseado na formação de micropartículas por interação iônica (denominado MP), onde:

- Preparação de uma solução de L-Lisina (0,3 g) + 10 mL de H<sub>2</sub>O + 2 mL de propilenoglicol mantida sob agitação magnética moderada a 37 °C por 60 minutos (**Solução A**). Após, em um eppendorf, foi solubilizado o AAS (0,15 g) em 1 mL de água e 1 mL de acetona com auxílio de vortex por um minuto (**Solução B**). A **solução B** foi lentamente adicionada à **solução A** utilizando uma pipeta pasteur permanecendo sob agitação magnética por mais cinco minutos e então, com auxílio de um funil, uma solução de fucoídana (100 µg/mL – **solução C**) previamente preparada foi adicionada continuando sob agitação por mais cinco minutos (**solução MP**) e seguindo para secagem por aspensão (**MP**).

Devido ao baixo rendimento, foram testados diferentes adjuvantes de secagem com diferentes propriedades, a fim de melhorar parâmetros como rendimento, estabilidade do fármaco, características adequadas para inalação, bem como capacidade de retenção ao longo do trato respiratório.



**Figura 17** – Metodologia utilizada para obtenção das micropartículas (MP).

Abreviaturas: AAS = ácido acetilsalicílico, g = gramas; UP = ultrapura e MP = micropartículas.

Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

Foram analisados o Methocel® F4M (hidroxipropilmetilcelulose – HPMC) e a L-Leucina, preparados conforme abaixo:

1) Methocel™ F4M (HPMC): foi preparada uma dispersão de HPMC (0,3 g em 36 mL de água ultrapura) sob agitação magnética moderada a 37 °C por 60 minutos, posteriormente mantida sob refrigeração *overnight* (4 °C ± 1), na qual foi vertida na solução MP com auxílio de um funil, sendo denominada de MP/F4M.

2) L-Leucina: foi preparada uma solução de L-Leucina (0,3 g em 36 mL de água ultrapura) sob agitação magnética moderada a 37 °C por 60 minutos, até obter completa solubilização. Em seguida, essa solução foi vertida na solução MP com auxílio de um funil, sendo denominada de MP/Leu.

Adicionalmente, foi testado um terceiro adjuvante de secagem, a quitosana:

3) Quitosana: a carga positiva da quitosana permitiu a retirada da L-Lisina e, com isso, foi preparada uma solução de quitosana (0,3 g em 99 mL de água UP + 1 mL ácido acético) sob agitação magnética moderada a 37 °C por 10 minutos. A solução acidificada de quitosana (pH 4,5) foi vertida em solução de AAS e Fucoidana com auxílio de um funil, sendo denominada de MP/Ch.

A **tabela 2** mostra os componentes utilizados para cada formulação.

**Tabela 2** – Constituição das formulações utilizando a técnica de secagem por aspersão.

Componente	MP/F4M	%	MP/Leu	%	MP/Ch	%
AAS	0,15	19,87	0,15	19,87	0,15	32,97
Fucoidana	0,005	0,66	0,005	0,66	0,005	1,10
L-Lisina	0,3	39,74	0,3	39,74	-----	-----
Methocel™ F4M	0,3	39,74	-----	-----	-----	-----
L-Leucina	-----	-----	0,3	39,74	-----	-----
Quitosana	-----	-----	-----	-----	0,3	65,93
Propilenoglicol	2	-----	2	-----	-----	-----
Acetona	1	-----	1	-----	1	-----
Ácido acético %	-----	-----	-----	-----	0,4	-----
H <sub>2</sub> O	97	-----	97	-----	98,6	-----
Sólidos totais	0,755	100	0,755	100	0,455	100

Os valores apresentados representam as concentrações em gramas (g) de soluto e mililitros (mL) de solvente.

**Abreviaturas:** % = Porcentagem do constituinte levando em conta os sólidos totais de formulação; AAS = Ácido acetilsalicílico. MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana.

#### 4.3.3 Caracterização físico-química dos sistemas de liberação de pós inaláveis

As formulações de pós inaláveis obtidos (MP/F4M; MP/Leu e MP/Ch) foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho de partícula, distribuição granulométrica, rendimento, morfologia, teor, estabilidade e pureza de pico. Todas as análises foram realizadas em triplicata, utilizando 3 lotes distintos para cada formulação (n = 3).

##### 4.4.3.1 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica dos pós inaláveis

Foi utilizada a técnica de difração de laser através da via seca com auxílio do equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments®, Reino Unido), em associação à unidade Scirocco® 2000 *dry powder feeder* (Malvern Instruments®, Reino Unido), na qual o meio dispersante é constituído por uma corrente de ar comprimido. O índice de refração (IR) utilizado considerou o material em maior quantidade na partícula: HPMC, L-Leucina ou quitosana (1,336; 1,460 e 1,345, respectivamente). As análises foram realizadas com obscuração mínima do laser a 2% e os resultados apresentados como a média ± DP de três lotes diferentes, permitindo avaliar parâmetros de homogeneidade e reprodutibilidade. A partir da análise por volume, foram obtidos os valores de d<sub>10</sub>, d<sub>50</sub> e d<sub>90</sub>, que correspondem a 10, 50 e 90% da população total de

partículas, respectivamente,  $D_{[4,3]}$  (média ponderada do tamanho das partículas) e SPAN. O rendimento foi calculado conforme citado anteriormente.

#### 4.4.3.2 *Análise morfológica*

A morfologia de superfície das partículas foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (EVO MA10), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. As formulações pulverulentas ou constituintes da formulação foram fixadas em *stubs*, com auxílio de fita adesiva, e metalizadas com carbono. A metalização com carbono visou a realização da espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS). As análises foram realizadas em diferentes magnificações a 7 kV. Para uma mistura de três lotes diferentes de cada formulação.

Na análise morfológica, os componentes em comum para as MP foram analisados separadamente de forma a observar possíveis modificações estruturais após processo de secagem (AAS; AS; L-lisina e fucoidana). Além disso, MP/Leu; MP/F4M; MP/Ch também foram analisadas (para fins de comparação, a formulação sem adjuvantes de secagem – MP foi considerada)

#### 4.3.3.3 *Determinação da concentração de AAS e padronização das extrações*

O método foi validado para a quantificação de AAS e/ou AS presente nas micropartículas por HPLC-UV com auxílio de um cromatógrafo Perkin Elmer®, coluna Waters Nova-Pak® (C18, 4  $\mu$ m, 3,9 x 150 mm) e pré-coluna do mesmo fabricante. A fase móvel utilizada consistiu em mistura de água ultrapura, acetonitrila e ácido fosfórico na proporção 40: 60: 0,2 (v/ v/ v). As condições cromatográficas foram: volume de injeção 10  $\mu$ L, vazão de 0,8 mL/min, detecção em UV 237 nm e tempo de análise de 3 minutos (**Material Suplementar 8.1.1**).

Considerando a porcentagem de AAS no pó em cada micropartícula, foi realizado um *screening* com objetivo de padronizar o melhor método de extração, transferindo 2 mg de pó para um balão volumétrico de 10 mL, com análises de:

- a) Diferentes solventes e concentrações, assim como ordem de adição dos solventes:
  - a. ácido acético 0,4 %;
  - b. acetonitrila: água na proporção 50:50;
  - c. água + 2 % de propilenoglicol: acetonitrila na proporção 50:50;
  - d. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol na proporção 60:40;
  - e. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol na proporção 40:60;

- f. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol na proporção 70:30;
  - g. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol na proporção 30:70;
  - h. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol na proporção 80:20;
  - i. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol: ácido fosfórico na proporção 60:40:0,02;
  - j. acetonitrila: água + 2 % de propilenoglicol na proporção 60:40.
- 
- b) tempo de sonicação em ultrassom e
    - a. 30, 60, 90 e 120 minutos.
  
  - c) temperatura variável;
    - a. 37, 40 e 45 °C.

Por fim, as amostras foram filtradas (0.45 µm, Millipore, USA) e analisadas por HPLC-UV em método previamente descrito. A validação do método está presente no **Material Suplementar 8.1.1**.

#### *4.3.3.4 Estabilidade do AAS nas micropartículas*

Para determinar a estabilidade do sistema, as mesmas formulações foram analisadas quanto ao teor durante 28 dias, com intervalos de 7 dias, onde o AAS foi extraído na forma padronizada no tópico anterior (*4.3.3.3 Determinação da concentração de AAS e padronização das extrações*). Excepcionalmente, a formulação MP/F4M foi reavaliada após 90 dias de produção.

#### *4.3.3.5 Pureza de pico*

Devido à necessidade de observar possíveis interferências de produtos de degradação, foi realizada a pureza de pico. O método para pureza de pico seguiu as mesmas condições cromatográficas previamente demonstradas, com auxílio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-PDA) e *software* Agilent Chemstation®.

### **4.3.4 Quantificação da fucoidana nas micropartículas**

A quantificação da fucoidana foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro SpectraMax 190® utilizando o *software* SoftMax Pro 6® (Molecular Devices®, USA) em placa 96 poços e solução de azul de dimetildimetileno (DMMB). O método consistiu

em pipetar 40 µL da formulação dissolvida em água, durante ultrassom por 2 horas, seguida da adição de 160 µL de solução de azul de dimetilmetileno (DMMB), ocasionando rápida mudança de cor (azul para violeta). Além disso, o método não considerou os mesmos parâmetros da extração definidos anteriormente devido à incompatibilidade da acetonitrila com o corante. Por fim, foi realizada leitura da placa em 525 nm (BARBOSA *et al.*, 2003; HALLÉ *et al.*, 1993). A validação do método está descrita no **Material Suplementar 8.1.2**.

#### **4.3.5 Perfis de liberação *in vitro* do AAS a partir das formulações desenvolvidas utilizando cápsulas de gelatina dura**

O método utilizado para ensaios de liberação *in vitro* para pequenas amostras de pó do presente estudo foram desenvolvidos e padronizados por Zatta e colaboradores (2018) seguindo normas estabelecidas pela ANVISA (RDC 166/17), USP <1092> e USP <711>.

As amostras foram pesadas (MP/F4M – 20 mg e AAS puro – 5 mg, sendo a mesma concentração de fármaco presente na formulação) e transferidas para cápsulas de gelatina dura (Nº 3). Com isso, foram envoltas em cinta de aço capaz de manter a mesma no fundo do recipiente de dissolução utilizando como meios o Fluido Pulmonar Simulado (FPS; pH 7,4) e o Ringer (pH 7,4) (COLOMBO, MONHEMIUS, PLANT, 2008; MARQUES, LOEBENBERG, ALMUKAINZI, 2011; PAI *et al.*, 2016). O recipiente de dissolução foi mantido em banho a  $37 \pm 1$  °C, sob agitação constante a 100 RPM. Alíquotas de 2 mL foram retiradas, filtradas (0.45 µm, Millipore, USA) e analisadas por HPLC-UV em método previamente descrito, com validação descrita no **Material Suplementar 8.1.1**. As coletas foram realizadas nos intervalos de tempos de 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos (ou até atingir 100% de liberação), sendo o meio de dissolução repostado após cada coleta (2 mL).

#### **4.3.6 Perfis de liberação *in vitro* do AAS a partir das formulações desenvolvidas utilizando pó coeso**

Considerando as normas da ANVISA (RDC 166/17), USP <1092> e USP <711>, foram desenvolvidos um novo método e um pequeno aparato de dissolução para caracterizar o perfil de liberação *in vitro* de formulações ou fármacos que:

- flutuavam em contato com os meios de dissolução ou

- apresentam interação cruzada com as cápsulas de gelatina dura.

O novo método e aparato desenvolvidos foram objeto de patenteamento junto ao INPI e já estão depositadas (**ANEXO 10.2 - MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE PÓS E APARATO DISSOLUTOR**).

Para tal, foi utilizado um compressor automático de pós (força de 6400 N; altura inicial da prensa em 100 mm; quatro compressões subsequentes a 90 mm) (TA.XT *plus Texture Analyzer* - Stable Micro Systems®). O método de liberação *in vitro* utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, diferindo-se apenas por utilizar pó coeso ao invés de pó confinado em cápsula de gelatina dura, sendo validado para três diferentes lotes, utilizando o AAS puro como controle (**Material Suplementar 8.2.1**).

Com isso, foi possível realizar os ensaios de liberação em Fluido Pulmonar Simulado (FPS, pH 7,4); Fluido Lisossomal Artificial (FLA, pH 4,5); Ringer (pH 7,4); Fluido Gástrico Simulado (FGS, pH 1,2) e Fluido Intestinal Simulado (FIS, pH 6,8) (COLOMBO *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2011; PAI *et al.*, 2016). A **Tabela 3** descreve constituição dos meios simulados.

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

**Tabela 3** – Constituição do Fluido Pulmonar Simulado (FPS), Fluido Lisossomal Artificial (FLA), Ringer, Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Fluido Intestinal Simulado (FIS).

FPS		FLA		Ringer	
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,102	MgCl <sub>2</sub>	0,05	NaCl	8,59
NaCl	5,727	NaCl	3,21	CaCl	0,19
KCl	0,298	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,071	KCl	0,30
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro	0,142	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,039		
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anidro	0,142	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,128		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,368	Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) . 2H <sub>2</sub> O	0,077		
CH <sub>3</sub> COONa . 3 H <sub>2</sub> O	0,826	NaOH	6,00		
NaHCO <sub>3</sub>	2,604	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	20,8		
Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) . 2H <sub>2</sub> O	0,098	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,059		
		Na <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0,09		
		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub>	0,085		
		C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	0,086		

pH 7,4		pH 4,5		pH 7,4	
FGS			FIS		
HCl	7,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8		
NaCl	2,0	NaOH	77		
Pepsina	0,8	Pancreatina	10		
pH 1,2			pH 6,8		

Os valores apresentados representam as concentrações em gramas (g) de soluto em 1000 mL de água.

**Abreviaturas:** FPS = Fluido Pulmonar Simulado; FLA = Fluido Lisossomal Artificial; FGS = Fluido Gástrico Simulado e FIS = Fluido Intestinal Simulado.

Equação 1

$$Conc = 100e^{(-kt)}$$

Equação 2

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

Onde,  $k$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  são constantes de velocidade e  $A$  é o percentual liberado na etapa rápida e  $B$  o percentual liberado na etapa lenta, para o modelo biexponencial.

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

Equação 3

$$ft = at^n$$

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

Utilizando valor de  $n$  associado ao estudo desenvolvido por Siepmann e Peppas (2012) foi possível determinar o mecanismo de liberação do fármaco da formulação de acordo com a **Tabela 4** (SIEPMANN & PEPPAS, 2012).

**Tabela 4** – Mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas carreadores baseados em hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) de acordo com o expoente de liberação  $n$  relacionado à Lei das Potências (SIEPMANN & PEPPAS, 2012).

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

#### 4.3.7 Desempenho aerodinâmico *in vitro*

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

Este equipamento é composto por oito estágios (zero a sete) mais o filtro, com placas de impactação circulares conectadas a um controlador de fluxo de ar e bomba de vácuo, que simulam uma respiração normal e o possível comportamento da formulação após administração (boca) até os ramos mais profundos do pulmão (alvéolos). Amostras da formulação MP/F4M (20 mg, correspondendo a 5 mg de AAS) e do fármaco AAS puro (5 mg) foram pesadas e transferidas para cápsulas de gelatina dura (Nº 3) antes de iniciar o experimento. Em seguida, foram inseridas em inalador (Aerolizer®, Novartis), perfuradas duas vezes, e iniciado o ensaio (fluxo de ar = 28,3 L/min, por 4 segundos, simulando a respiração de uma pessoa sadia) (ZATTA *et al.*, 2018). A concentração de fármaco em cada estágio foi determinada aplicando o método de extração previamente padronizado e quantificado em HPLC-UV.

A partir desta análise foi possível avaliar parâmetros de uniformidade e fluxo dos pós, bem como performance aerodinâmica de acordo com as propriedades de Fração de Partículas Finas (FPF – soma do fármaco recuperado nos estágios 2 ao 7 + filtro dividido pela recuperação do fármaco total), Fração Respirável (FR – soma do fármaco recuperado nos estágios 2 ao 7 + filtro dividido pela soma do fármaco recuperado nos dos estágios 0 ao 7 + filtro) e Dose Emitida (DE – concentração do fármaco retido na cápsula menos a soma do fármaco recuperado nos estágios 0 ao 7). Os valores expressos foram calculados de acordo com equações já descritas na literatura (MEENACH *et al.*, 2013), com algumas modificações (ZATTA *et al.*, 2018).

#### 4.3.8 Caracterização das propriedades mucoadesivas *in vitro*

A mucosa utilizada nos ensaios foi proveniente de esôfago suíno, doados pelo matadouro Ouro do Sul®. O esôfago suíno foi aberto e a parte interna limpa suavemente com água ultrapura para retirar resíduos de alimentos e cortado em pedaços de 16 cm<sup>2</sup> aproximadamente, embalando-os em papel alumínio e armazenados sob refrigeração a -4 °C por no máximo um mês.

Os ensaios posteriores foram realizados para observar possível adesão/ interação da formulação com a mucosa.

#### 4.4.8.1 Perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína

O experimento foi realizado em célula de Franz modificada, com canal de entrada e saída de solução de lavagem, acoplada a uma bomba de fluxo (FRANK *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 1999; ZATTA *et al.*, 2018). Neste estudo foi utilizado como meio receptor o FPS e mucosa esofágica de suíno como membrana. Sobre a mucosa, foi adicionada 20 mg da formulação MP/F4M (que corresponde a 5 mg de AAS) ou AAS puro, na mesma quantidade e então iniciado o fluxo de lavagem (0,2 mL/min) simulando a ação do fluxo de *clearance* pulmonar. A célula foi mantida em banho termostaticado a  $37 \pm 1$  °C sob agitação moderada durante o período de experimento. Amostras foram coletadas a partir do canal de saída nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 270 e 300 minutos e analisadas em HPLC-UV para determinação da concentração de fármaco lavado em função do tempo (Validação do método no **Material Suplementar 8.3.1**). Ao final do experimento, a mucosa esofágica foi tratada para determinar a concentração de fármaco retido e o meio receptor foi filtrado e analisado a fim de verificar a capacidade de permeação das amostras testadas para fins de comparação com o ensaio de permeação *in vitro*.

#### 4.4.8.2 Avaliação da permeação *in vitro*

A avaliação da capacidade de permeação e penetração da formulação foi realizada em Célula Automática de Franz (FRANK *et al.*, 2014; ZATTA *et al.*, 2018), utilizando como membrana a mucosa esofágica de suíno. A célula utilizada possui área de 3,1 cm<sup>2</sup> e comporta cerca de 7 mL de meio no compartimento receptor. Os cortes da mucosa foram interfaces dos meios doador e acceptor da célula de Franz. A capacidade de permeação foi avaliada em FPS (pH 7,4). A quantidade de amostra utilizada foi de 20 mg de formulação (cerca de 5 mg de AAS), afim de cobrir toda área de mucosa em contato com o meio receptor.

A formulação foi pesada e disposta na face superior da mucosa e o sistema foi fechado e mantido sob agitação a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O fluxo do fármaco a partir da formulação através da mucosa foi calculada pela determinação da concentração do fármaco no líquido acceptor, em tempos previamente determinados (30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos), utilizando-se HPLC-UV (Validação do método no **Material**

**Suplementar 8.3.1).** Após o término do experimento, as mucosas foram tratadas a fim de determinar a concentração de fármaco retido.

#### 4.4.8.3 Adsorção de mucina

O potencial da formulação MP/F4M de se adsorver à mucina e a eficiência desta ligação foram avaliadas pelo ensaio de adsorção de mucina, utilizando mucina de estômago suíno (Sigma-Aldrich®). O pó obtido na ausência de HPMC foi utilizado como controle (MP/aF4M). Para este experimento foram preparadas dispersões aquosas de mucina em diferentes concentrações (200, 250, 300 e 350 µg/ mL) com uma concentração conhecida da formulação (20 mg). As soluções foram agitadas em vortex e deixadas em banho termostático a 37 °C durante uma hora. Em seguida, as dispersões foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos e recolhido 1 mL do sobrenadante para determinação da concentração de mucina livre. A concentração proteica livre nos sobrenadantes das soluções foi mensurada através do método de Lowry, com auxílio de um espectrofotômetro SpectraMax 190® utilizando o software SoftMax Pro 6® (Molecular Devices®, USA) com absorvância de 749 nm conforme reportado por Zatta e colaboradores (2018).

#### 4.3.9 Ensaios antihemostáticos *in vitro*

Os ensaios antihemostáticos *in vitro* e *ex vivo*, assim como os ensaios antitrombóticos *in vivo* foram desenvolvidos em período sanduíche no laboratório de Hemostasia Experimental (LabHex), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob supervisão do Professor Doutor Plínio Cunha Sathler. Adicionalmente, alguns ensaios antihemostáticos *in vitro* foram realizados no laboratório de Bioquímica Farmacológica, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob supervisão do Professor Doutor Markus Berger de Oliveira.

Amostras de sangue humano foram obtidas de doadores adultos, saudáveis, de ambos os sexos, que não fizeram uso de medicamentos ou outras substâncias que pudessem interferir no experimento (ex. álcool e entorpecentes) pelo período mínimo de 15 dias após anamnese e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**APÊNDICE 9.1 – TCLE**). O sangue foi coletado por punção venosa da veia braquial média, com auxílio de *scalp* 21 e seringa de 20 mL, em citrato 3,8%, na proporção de 9 volumes de sangue para 1 volume de citrato, obedecendo os seguintes critérios e inclusão e exclusão de doadores:

#### Critérios de inclusão dos doadores

- Serem maiores de 18 anos;
- Apresentarem coagulograma dentro dos valores de referência com INR  $\leq$  1,3.

#### Critérios de exclusão dos doadores

- Fazerem uso de qualquer fármaco que influenciasse no sistema hemostático (ex. anticoagulantes e antiagregantes plaquetários);
- Apresentarem qualquer distúrbio do sistema hemostático;
- Apresentarem coagulograma com INR  $>$  1,3.

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total em 1000 RPM por 10 minutos enquanto o plasma pobre em plaquetas (PPP), por centrifugação do PRP a 3500 RPM por 15 minutos (LOURENÇO *et al.*, 2017; SAITO *et al.*, 2016).

#### 4.4.9.1 Ensaios de coagulação plasmática *in vitro*

Os ensaios tiveram como objetivo analisar a atividade anticoagulante da fucoidana pura ou presente na formulação MP/F4M, assim como a capacidade de algum componente da formulação em interferir no tempo de coagulação.

Para os ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e de tempo de protrombina (PT), foram formados pools com amostras de plasma citratado de seis doadores que não apresentavam distúrbios no sistema hemostático expresso pelo INR (razão normalizada internacional) igual ou inferior a 1,3. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando um analisador de coagulação CoagLab<sup>®</sup> IV (Beijing Shining SunTechnology Co. <sup>®</sup>, China), de acordo com as instruções do fabricante (WAMA Diagnostics<sup>®</sup>) e segundo protocolo proposto por Saito e colaboradores (LOURENÇO *et al.*, 2017; SAITO *et al.*, 2016).

No ensaio de aPTT, 97  $\mu$ L de PPP juntamente com 3  $\mu$ L da formulação MP/F4M, fucoidana pura ou controles (água ou rivaroxabana – 40  $\mu$ g/mL), foram previamente incubados por 15 minutos em condições ambiente e, posteriormente, por 2 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de cefalina (1,2 mg/mL), sendo incubados por dois minutos e a reação foi disparada com 100  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0,025 M, em um volume final de 300  $\mu$ L, sendo determinado e monitorado o tempo de coagulação do plasma em segundos a 37 °C (LOURENÇO *et al.*, 2017; SAITO *et al.*,

2016). Para o ensaio de PT foi mantido o protocolo, sendo que ao final, a reação foi disparada com 100 µL de tromboplastina cálcica (2,5 mg/mL).

#### 4.4.9.2 Ensaios de agregação plaquetária *in vitro*

Os ensaios objetivaram analisar a atividade antiagregante plaquetária do AAS e a atividade pró-agregante plaquetária da fucoidana, pura ou presente na formulação MP/F4M, assim como a capacidade de algum componente da formulação em interferir na agregação plaquetária.

A agregação plaquetária foi monitorada utilizando-se um agregômetro Pack-4® (Helena Laboratories®, USA) seguindo o método turbidimétrico de Born e Cross (BORN & CROSS, 1963; SAITO *et al.*, 2016; LOURENÇO *et al.*, 2017).

A agregação plaquetária foi iniciada adicionando-se 10 µL de ácido araquidônico (ARA - 500 µM) à cubetas contendo 287 µL de PRP e 3 µL da formulação MP/F4M, AAS ou fucoidana puras, previamente incubados por 2 minutos a 37°C. Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em triplicata em um total de seis experimentos independentes e os dados obtidos foram descritos em porcentagem de agregação ± desvio padrão.

Além disso, como a fucoidana foi descrita como um novo agonista para agregação plaquetária por Manne e colaboradores (2013), diferentes concentrações da fucoidana foram utilizadas como agonista afim de analisar este perfil (MANNE *et al.*, 2013a).

#### 4.4.9.3 Avaliação da atividade hemolítica *in vitro*

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

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

Os eritrócitos foram lavados com 1,5 mL de PBS e centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. Então, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido duas vezes. Após a lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em 5 mL de PBS. Em

seguida, 540  $\mu$ L da solução concentrada de eritrócitos foram adicionados a um microtubo contendo 60  $\mu$ L da formulação (MP/F4M) e também da formulação branca (MP/F4M B) sob diferentes concentrações e incubadas a 37°C por um período de três horas. Após este período as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm e o sobrenadante foi avaliado, em triplicata, por espectrofotometria a 540nm em placa 96 poços.

#### 4.4.9.4 Ensaio de adesão plaquetária *in vitro*

O ensaio de adesão plaquetária foi realizado conforme descrito por Bellavite e colaboradores (1994) com algumas modificações. A proteína recombinante humana PSGL-1/CD162 Fc (R&D Systems®, USA), que apresenta ligação específica para P-selectina foi utilizada em conjunto com a fucoidana livre, formulação branca (MP/F4M B) e formulação (MP/F4M), incubando o respectivo poço com plaqueta lavada ativada para a análise da adesão competitiva.

A técnica da plaqueta lavada foi realizada com o intuito de retirar elementos do sangue que poderiam interferir na agregação plaquetária induzida por trombina e consequentemente especificidade do método de adesão competitiva (GIBBINS & MAHAUT-SMITH, 2004). Para tal, foi utilizado: (B) tampão Tyrode de lavagem e (C) tampão Tyrode de ressuspensão, preparados a partir de uma solução geral (A), como indicado na **Tabela 5**.

O PRP foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado e as plaquetas foram ressuspensas em 8 mL do tampão B. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes e, ao final, as plaquetas foram ressuspensas no tampão C (GIBBINS & MAHAUT-SMITH, 2004).

Para o presente ensaio, uma placa de 96 poços com alta afinidade a proteínas foi utilizada (Flacon®, USA), empregando albumina (2 mg/mL) e PSGL-1 como controles, com incubação overnight a 4 °C e 1 hora a 37 °C, com duas lavagens com NaCl 0,9 %. Então, 100  $\mu$ L de plaqueta lavada ativada (concentração de plaquetas igual a  $2,5 \times 10^6$ , ativadas com 10  $\mu$ L de trombina a 1NIH e incubadas com diferentes concentrações de fucoidana pura ou formulação MP/F4M, na proporção 1:1) foi adicionada aos poços e a placa incubada a 37 °C por 30 minutos. Ao final da incubação, os poços foram lavados duas vezes com NaCl 0,9 % e cada um recebeu 100  $\mu$ L de tampão citratado 0,1 M, pH 5.4, contendo 5 mM de p-nitrofenil fosfato e 0,1 % de Triton X-100 para analisar a atividade da fosfatase ácida plaquetária. A placa foi

incubada por mais uma hora em condições ambiente e a reação foi parada com 50 µL de NaOH 2 M. A concentração de p-nitrofenol produzido pela reação foi mensurado a 405 nm utilizando um leitor de microplacas SpectraMax 190® e o software SoftMax Pro 6® (Molecular Devices®, USA) e o número de plaquetas aderentes foi calculado através de uma curva de calibração obtida com número conhecido de plaquetas lisadas, contado em câmara de Neubauer (**Material suplementar 8.4.1**)

**Tabela 5** – Preparação dos tampões para o ensaio de agregação plaquetária induzida por trombina.

(A) Tampão Tyrode geral		(B) Tampão Tyrode de Lavagem		(C) Tampão Tyrode de Ressuspensão	
NaCl	4,0 g	Solução A	250 mL	Solução A	250 mL
NaHCO <sub>3</sub>	462 g	Citrato de sódio	0,147 g	CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	36,76 mg
KCl	74,5 mg	PH	6,5	PH	7,4
Na <sub>2</sub> POH <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O	46,8 mg				
H <sub>2</sub> O					
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	101,5 mg				
HEPES	1,19 g				
Glicose	495 mg				
BSA	1,75 mg				
Água destilada	500 mL				

Fonte: GIBBINS & MAHAUT-SMITH, 2004

#### 4.4 ENSAIOS *IN VIVO* E *EX VIVO*

Os experimentos envolvendo animais foram realizados utilizando ratos Wistar machos e fêmeas (250 - 300 g). Todos os ensaios envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) (COBEA, 1991), Vogel e Vogel (VOGEL & VOGEL, 1997) e Committee on Animal Research and Ethics (CARE, 2012). Ainda, foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo aprovado sob número 002/19 (**Anexo 10.1**). Os animais foram mantidos em condições de higiene adequada, com ração e água *ad libitum* em sala projetada para o mesmo.

Nos ensaios *in vivo*, os ratos foram mantidos em jejum por um período de 1 hora e então anestesiados com uma solução de quetamina / xilazina (1,25 g/kg) por injeção intraperitoneal para início do ensaio. A formulação ou controles foram administrados por via intratraqueal com auxílio de um cateter, sem traqueostomia, conforme exposto por LIZIO e colaboradores (2001) com algumas modificações no aparato utilizado.

Os grupos de tratamento foram, contendo seis animais por grupo:

- (I) controle negativo (insuflação de 2 mL de ar);
- (II) MP/F4M;
- (III) MP/F4M branca e
- (IV) fármaco AAS puro.

Foi realizada análise histologia e histopatológica de todos os animais mortos, detectando a integridade ou ocorrência de dano tecidual dos pulmões, coração, fígado, rins, estômago e intestino delgado. Os tecidos foram avaliados de modo semiquantitativo quanto a presença de hiperemia, hemorragia e inflamação, como descrito na literatura (GAUTIER, 2010; LI *et al.*, 2012; RUEHL-FEHLERT *et al.*, 2003; TREUTING & DINTZIS, 2011).

#### **4.4.1 Avaliação do potencial antiagregante plaquetário *ex vivo***

O sangue dos ratos Wistar machos e fêmeas (250 - 300 g) tratados foi captado por punção cardíaca utilizando seringas descartáveis e adicionados a tubos falcon com proporção de 1:100 de heparina (40 mg/mL). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue a 1000 rpm, por 10 minutos, e em seguida o mesmo foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Além disso, foi necessário realizar diluição do PRP devido à grande concentração de plaquetas presentes, utilizando o tampão Tyrode empregue na plaqueta lavada.

Inicialmente, 135  $\mu$ L de Tyrode foi adicionado à cubetas específicas, além de 5  $\mu$ L de cloreto de cálcio 1M. Em seguida, 150  $\mu$ L de PRP foi adicionado e a reação foi disparada adicionado 10  $\mu$ L de ADP (3  $\mu$ M) ou colágeno (5  $\mu$ g/mL). A agregação plaquetária foi monitorada utilizando-se um agregômetro Pack-4<sup>®</sup> (Helena Laboratories, USA), seguindo o método turbidimétrico de Born e Cross. (BORN & CROSS, 1963; PIERDONÁ *et al.* 2014) e os ensaios foram realizados em um total de seis animais.

#### **4.4.2 Avaliação do perfil antitrombótico *in vivo* através do ensaio de trombose arterial induzida por cloreto férrico**

Esse ensaio é baseado em injúria endotelial local, que é sensível para fármacos anticoagulantes e antiagregantes plaquetários. A trombose na artéria carótida foi induzida pelo método proposto por Li, McIntyre e Silverstein (LI, MCINTYRE,

SILVERSTEIN, 2013). A artéria carótida direita foi isolada através de uma incisão na linha mediana cervical e um disco de papel Whatman (1 x 2mm) embebido em uma solução de cloreto férrico (20 %) foi aplicado na artéria por um período de três minutos. Imediatamente após a retirada do papel Whatman, a artéria carótida foi lavada com 400µL de salina e uma sonda de fluxo ultrassônico (modelo 0,5 VB; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, E.U.A.) foi justaposta em volta da artéria para aferição do tempo de formação do trombo (oclusão total). Os grupos foram os mesmos citados anteriormente com administração intratraqueal e oral.

Além disso, para observar os efeitos de uma administração prolongada (crônica), foram realizados ensaios com uma administração por dia, durante três dias (72 horas). Os resultados foram expressos em tempo de oclusão (minutos), sendo considerado não-oclusão um período maior ou igual a 60 minutos.

#### **4.4.3 Avaliação do potencial hemorrágico *in vivo* através do tempo de sangramento**

Para avaliar o tempo de sangramento *in vivo*, após total indução anestésica, a cauda do animal foi cortada a 5 mm da sua extremidade e imersa em um tubo falcon contendo 10 mL de reagente de Drabkin (Bioclin®). O reagente de Drabkin lisa a hemácia e transforma a hemoglobina em cianometahemoglobina, descrita na literatura como estável. A densidade óptica foi analisada com o auxílio de um espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices®) a 420 nm, de três em três minutos em um total de 30 minutos, transferindo 100 µL do tubo falcon para uma placa 96 poços, em quintuplicata. Essa quantidade foi repostada ao final de cada intervalo de tempo e a quantidade de hemoglobina foi obtida utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Quantidade de hemoglobina (g/dL)} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{FT}$$

O fator de calibração (FT) foi obtido dividindo a concentração do padrão de hemoglobina (Bioclin®) com a absorbância do padrão, como descrito na metodologia do kit. Foram utilizados seis animais para cada formulação e a massa de hemoglobina perdida foi determinada (ELG, GUSTAFSSON, CARLSSON, 1999; FRATTANI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; SONG, WANG, ZHAO, 2012), com os grupos citados anteriormente no ensaio de trombose arterial.

#### **4.4.4 Histologia e análise histopatológica**

A histologia e análise histopatológica foram desenvolvidas em no laboratório de Histologia sob supervisão da Professora Doutora Nádia Campos de Oliveira Miguel e da doutoranda Priscila Furtado, do LabHex, ambas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para realizar a análise histopatológica foram analisadas regiões em comum em cada lâmina, considerando áreas semelhantes com presença de estruturas específicas de cada órgão, de forma a realizar uma descrição geral delas.

##### *4.5.4.1 Preparo das amostras*

Após a necropsia, o pulmão, coração, fígado, rins, estômago e intestino delgado foram retirados e dispostos em cassetes plásticos devidamente identificados. A fixação dos órgãos foi realizada em paraformaldeído tamponado a 5% durante um período de 48 h. O volume do fixado utilizado para esta etapa foi 20 vezes maior do que o dos órgãos. As amostras foram preparadas, segundo a rotina para crioproteção, sendo imersas durante 48 horas em cada uma das seguintes soluções: (1) Sacarose 10 % (2) Sacarose 20 % e (3) Sacarose 30 %. Os cortes histológicos foram realizados em criótomo com espessura de 10 µm e corados por Hematoxilina de Harris e Eosina (LI *et al.*, 2012).

##### *4.5.4.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina*

Os cortes do pulmão, coração, fígado, rins, estômago e intestino delgado dos ratos dos diferentes grupos experimentais foram corados por hematoxilina-eosina, conforme as seguintes etapas: a) hidratação, com imersões por 30 segundos em soluções de álcool absoluto a 100% I e II, álcool 90% e álcool 80% b) impregnação pelos corantes, com prévia lavagem em água corrente por um minuto e, posteriormente, I) solução de eosina alcóolica 1% por um minuto; (II) água corrente por 30 segundos; (III) solução de Hematoxilina de Harris por um minuto; (IV) água corrente por 30 segundos; (V) desidratação em banhos em álcool 90%, 80% e 70% por trinta segundos em cada etapa e (VI) clarificação em banhos de xilol e selamento (RUEHL-FEHLERT *et al.*, 2003; GAUTIER, 2010; TREUTING & DINTZIS, 2011; LI *et al.*, 2012).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o software SPSS 14.0 for Windows aplicando-se a análise de variância (ANOVA), e na sequência o teste de Tukey, sendo um valor de  $p \leq 0,05$  considerado significativo. Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão quando aplicável.



## 5 RESULTADOS

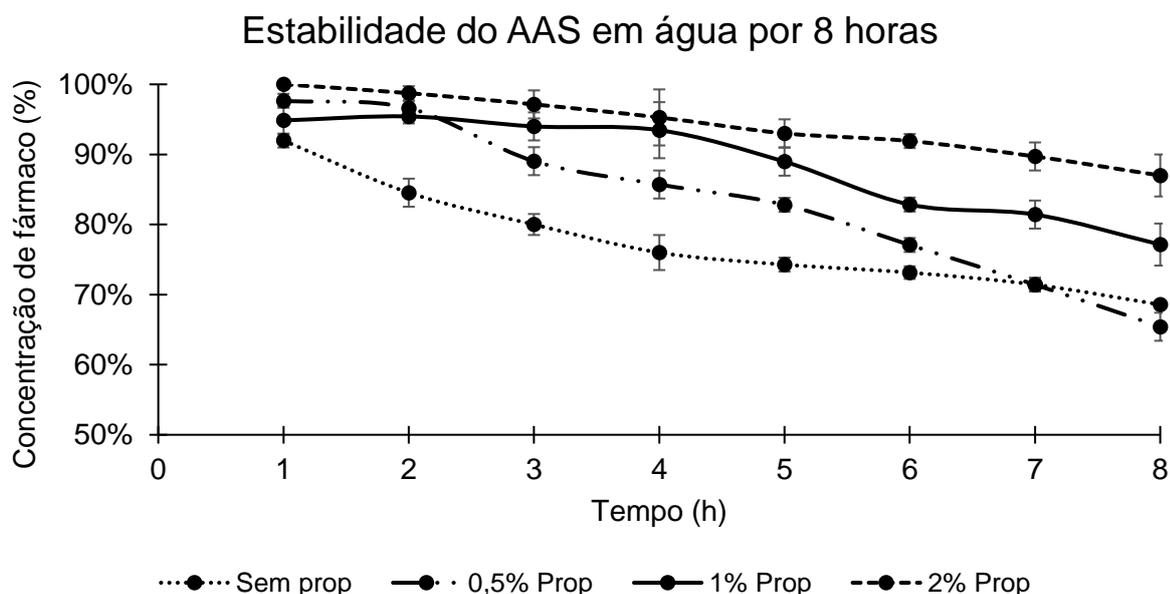
---



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ESTABILIDADE DO AAS EM ÁGUA

Foi realizado um ensaio de estabilidade do AAS com misturas de diferentes concentrações de propilenoglicol em água. Os resultados evidenciaram que a presença de propilenoglicol a 2% foi capaz de manter o AAS estável por 8 horas (período da maioria dos experimentos expostos) (**Figura 18**). Desta forma, adotou-se tal medida para todos os estudos posteriores.



**Figura 18** – Estabilidade do ácido acetilsalicílico (AAS) com ou sem agente anti-hidrolítico (propilenoglicol).

**Abreviaturas:** Prop = Propilenoglicol.

### 5.2 DELINEAMENTO DA FORMULAÇÃO DE PÓ INALÁVEL CONTENDO AAS E FUCOIDANA

Inicialmente, foram desenvolvidas formulações com poloxamer 188 (FP), deoxicolato de sódio (Fds) e cloreto de benzalcônio (Fcb).

As formulações contendo poloxamer 188 (Pluronic® F-68) independentemente de sua concentração e parâmetros de solubilização (tempo de agitação ou sonicação), demonstraram ser inexecutáveis quanto a coleta dos pós após secagem devido à forte aderência dos mesmos na parede do equipamento, onde apenas a FP<sub>3</sub> apresentou algum rendimento no processo de secagem (10%) (**Tabela 6**).

**Tabela 6** – Constituintes das formulações para secagem, assim como parâmetros utilizados para solubilização.

Formulação	Constituintes		Parâmetros		Rendimento (%)
	Poloxamer 188 (g)	AAS (g)	TA (min)	Sonicação (min)	
FP <sub>1</sub>	0,10	0,15	50	40	0
FP <sub>2</sub>	0,25	0,15	50	40	0
FP <sub>3</sub>	0,50	0,15	50	40	10
FP <sub>4</sub>	0,25	0,15	60	30	0
FP <sub>5</sub>	0,25	0,15	40	50	0
FP <sub>6</sub>	0,25	0,15	30	30	0

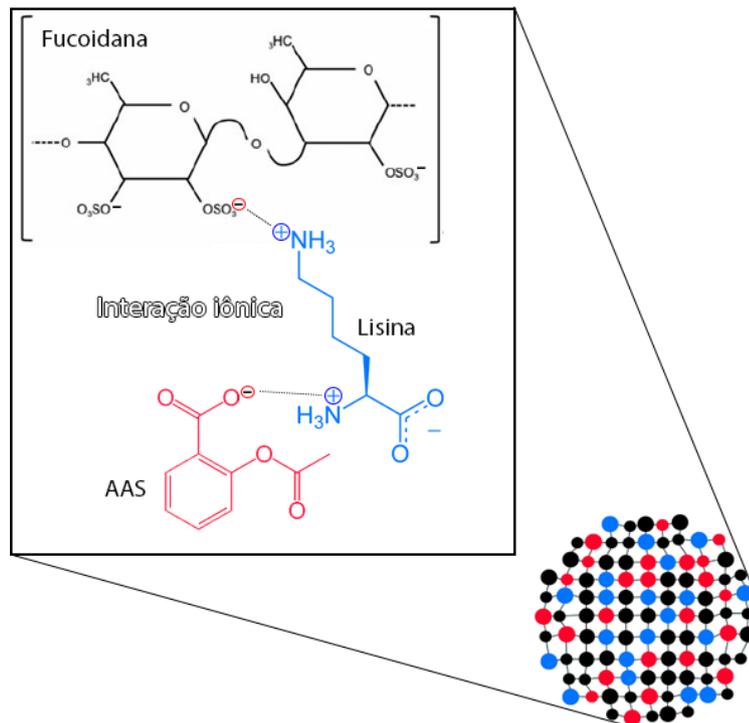
**Abreviaturas:** FP = Formulação contendo Poloxamer 188 (Pluronic® F-68); AAS = ácido acetilsalicílico; TA = tempo de agitação; g = gramas e min = minutos.

Para formulações contendo deoxicolato de sódio (Fds) e cloreto de benzalcônio (Fcb) procedeu-se com a metodologia citada anteriormente. Entretanto, a dificuldade de solubilização e formação de um gel impossibilitou a continuação do processo de secagem, evidenciando incompatibilidade destes produtos com o sistema desenvolvido. Logo, o delineamento do sistema carreador contendo AAS e fucoidana foi conduzido considerando suas características de solubilidade e carga iônica.

Compreende-se que o AAS apresenta valor de pKa = 3,41 (MarvinSketch®, DrugBank®), desta forma, em pH = 5,0 (pH aproximado de trabalho), a maior parte da concentração de AAS está ionizado negativamente, e que a fucoidana é um polissacarídeo aniônico. Baseado em um estudo anterior do grupo, buscou-se um ligante capaz de interagir quimicamente com ambos visando a formação de um complexo para a obtenção das partículas (ZATTA *et al.*, 2018). Neste sentido, a L-Lisina, um aminoácido de natureza catiônica, foi utilizada como mediadora da ligação entre o AAS e a fucoidana.

A L-lisina exibe dois grupamentos amina em sua estrutura que lhe confere carga positiva, possibilitando a interação iônica com estruturas de carga oposta como o AAS e a fucoidana (**Figura 19**) e formação de um complexo de micropartículas (MP).

Para a formulação de micropartículas contendo L-Lisina (MP<sub>1-8</sub>) foi possível determinar que o tempo de agitação, assim como tempo de sonicação por ultrassom da formulação influenciava diretamente no rendimento, sendo que o melhor resultado foi para a formulação MP<sub>7</sub> (25 %) (**Tabela 7**).



**Figura 19** – Esquema ilustrativo do possível arranjo do sistema carreador baseado na formação do complexo por interação iônica (MP).  
 Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

Em seguida, foram utilizados 60 minutos de agitação (devido ao resultado anterior), modificando a concentração do aminoácido (MP<sub>9-13</sub>). Além disso, a ordem de mistura dos componentes da formulação foi alterada, onde:

**Tabela 7** – Constituintes das formulações para secagem, assim como parâmetros utilizados para solubilização.

Formulação	Constituintes		Parâmetros			Rendimento %
	L-Lisina (g)	AAS (g)	TA (min)	Sonicação (min)		
MP <sub>1</sub>	0,25	0,15	50	40	14	
MP <sub>2</sub>	0,25	0,15	50	40	15	
MP <sub>3</sub>	0,25	0,15	50	40	13	
MP <sub>4</sub>	0,25	0,15	50	40	15	
MP <sub>5</sub>	0,25	0,15	40	30	15	
MP <sub>6</sub>	0,25	0,15	30	30	16	
MP <sub>7</sub>	0,25	0,15	60	0	25	
MP <sub>8</sub>	0,25	0,15	30	0	23	

**Abreviaturas:** MP = Formulação de micropartículas contendo L-Lisina; AAS = ácido acetilsalicílico; TA = tempo de agitação; g = gramas e min = minutos.

– MP<sub>13</sub>: preparação de uma solução de L-Lisina (0,3 g) + 10 mL de H<sub>2</sub>O + 2 mL de propilenoglicol mantida sob agitação magnética moderada a 37 °C por 60 minutos (**solução A**). Após, em um eppendorf, foi solubilizado o AAS (0,15 g) em 1 mL de água e 1 mL de acetona com auxílio de vortex por um minuto (**solução B**). A **solução B** foi lentamente adicionada à **solução A** utilizando uma pipeta pasteur e

permanecendo sob agitação magnética por mais cinco minutos e então, com auxílio de um funil, uma solução aquosa de fucoidana (46 mL - 100 µg/mL) previamente preparada foi adicionada continuando sob agitação por mais cinco minutos (**solução MP**).

– MP<sub>14</sub>: modificação da ordem, onde a **solução A** foi adicionada à **solução B**;

– MP<sub>15</sub>: solução de fucoidana solubilizada em conjunto com o AAS (**solução B**), seguindo os passos anteriores;

– MP<sub>16</sub>: solubilização de todos os componentes (0,3g de L-Lisina + 10mL de H<sub>2</sub>O + 2mL de propilenoglicol 2% + 50 mL de uma solução aquosa de fucoidana em conjunto (**Tabela 8**).

**Tabela 8** – Constituintes das formulações para secagem, assim como parâmetros utilizados para solubilização.

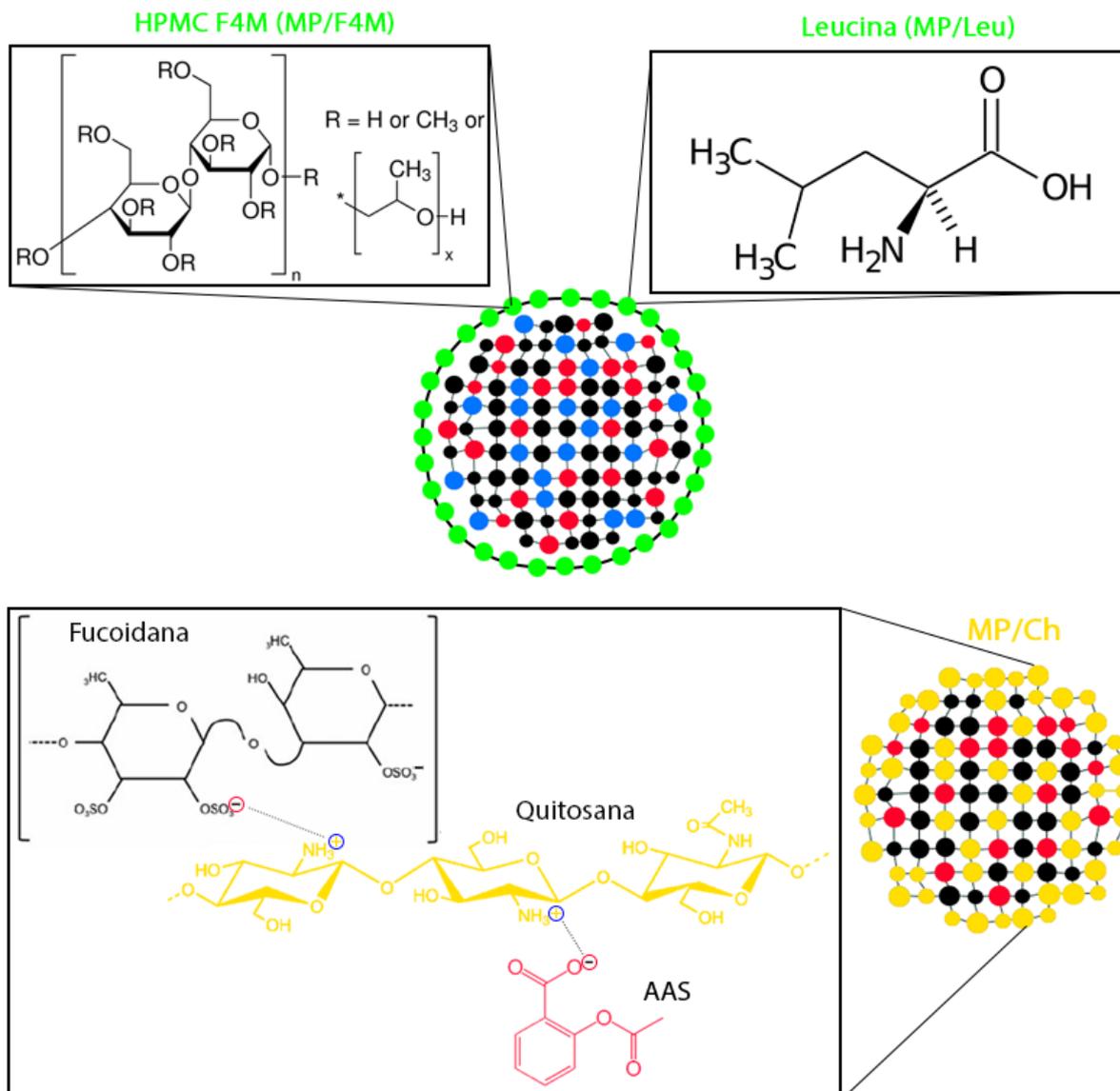
Formulação	Constituintes		Parâmetros		Rendimento (%)
	L-Lisina (g)	AAS (g)	TA (min)	Sonicação (min)	
MP <sub>9</sub>	0,50	0,15	60	0	0
MP <sub>10</sub>	0,30	0,15	60	0	28
MP <sub>11</sub>	0,10	0,15	60	0	0
MP <sub>12</sub>	0,06	0,15	60	0	0
MP <sub>13</sub>	0,30	0,15	60	0	29
MP <sub>14</sub>	0,30	0,15	60	0	0
MP <sub>15</sub>	0,30	0,15	60	0	0
MP <sub>16</sub>	0,30	0,15	60	0	27

**Abreviaturas:** MP = Formulação de micropartículas contendo L-Lisina; AAS = ácido acetilsalicílico; TA = tempo de agitação; g = gramas e min = minutos.

Todas as formulações (MP<sub>9-13</sub>) mostraram resultados insatisfatórios quanto ao rendimento (< 30 %), levando à adição de diferentes adjuvantes nestas formulações de micropartículas (MP), como o Methocel® F4M (MP/F4M), a L-Leucina (MP/Leu) e a quitosana (MP/Ch).

A **Figura 20** ilustra o possível arranjo do sistema carreador após adição desses adjuvantes de secagem, sendo a estruturação da MP/F4M semelhante à MP/Leu, enquanto a MP/Ch apresenta interação do adjuvante com o AAS e fucoidana, devido as diferenças de cargas existentes nas matérias-primas.

Foi possível observar que a adição destes adjuvantes de secagem melhorou o rendimento do processo de secagem da formulação, sendo semelhantes para as três formulações (MP/F4M = 55 ± 5 %; MP/Leu = 52 ± 3 % e MP/Ch = 50 ± 7 %).



**Figura 20** – Esquema ilustrativo do possível arranjo do sistema carreador baseado na formação de micropartículas por interação iônica com adição do adjuvante de secagem. A linha pontilhada indica possíveis locais de interação iônica.

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana.

Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

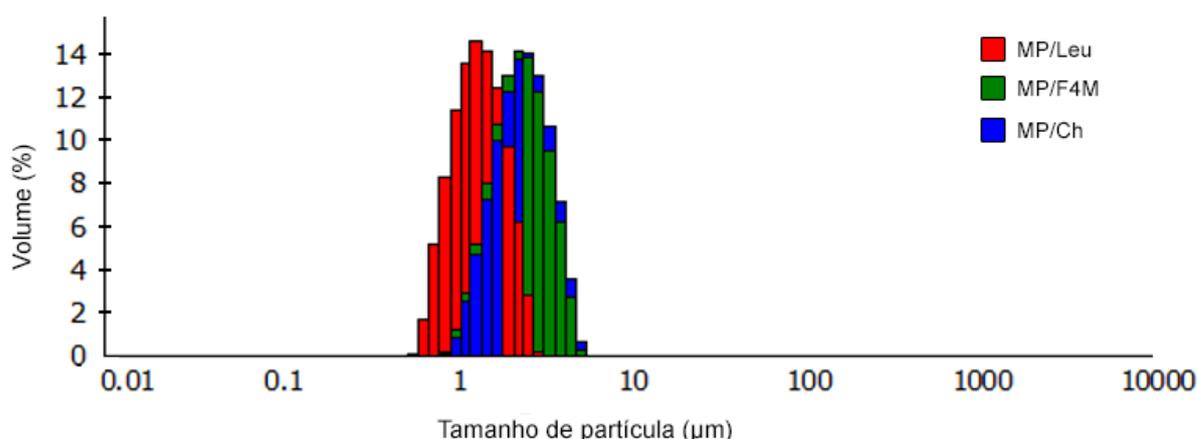
### 5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE PÓS INALÁVEIS

#### 5.3.1 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica dos pós inaláveis

Os resultados evidenciaram que a MP/Leu apresentava os menores valores de tamanho de partícula e SPAN ( $1,460 \pm 0,015$  e  $0,921 \pm 0,017$ , respectivamente). Por

sua vez, MP/F4M e MP/Ch exibiram resultados semelhantes para o  $D_{[4,3]}$  ( $2,512 \pm 0,022$  e  $2,603 \pm 0,032$ , respectivamente), assim como para o SPAN ( $0,957 \pm 0,012$  e  $0,951 \pm 0,023$ , respectivamente). (**Figura 21 e Tabela 9**)

Todas as formulações revelaram comportamento unimodal e distribuição de tamanho de partícula com estreito intervalo (SPAN < 1,3), além de rendimentos do processo de secagem próximos entre si (aproximadamente 50%), conforme **Figura 21 e Tabela 9**.



**Figura 21** – Tamanhos de partícula obtidos pela técnica de difração de laser através da análise por volume para as formulações de pós inaláveis com diferentes adjuvantes (n = 3).

**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana.

**Tabela 9** – Diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica

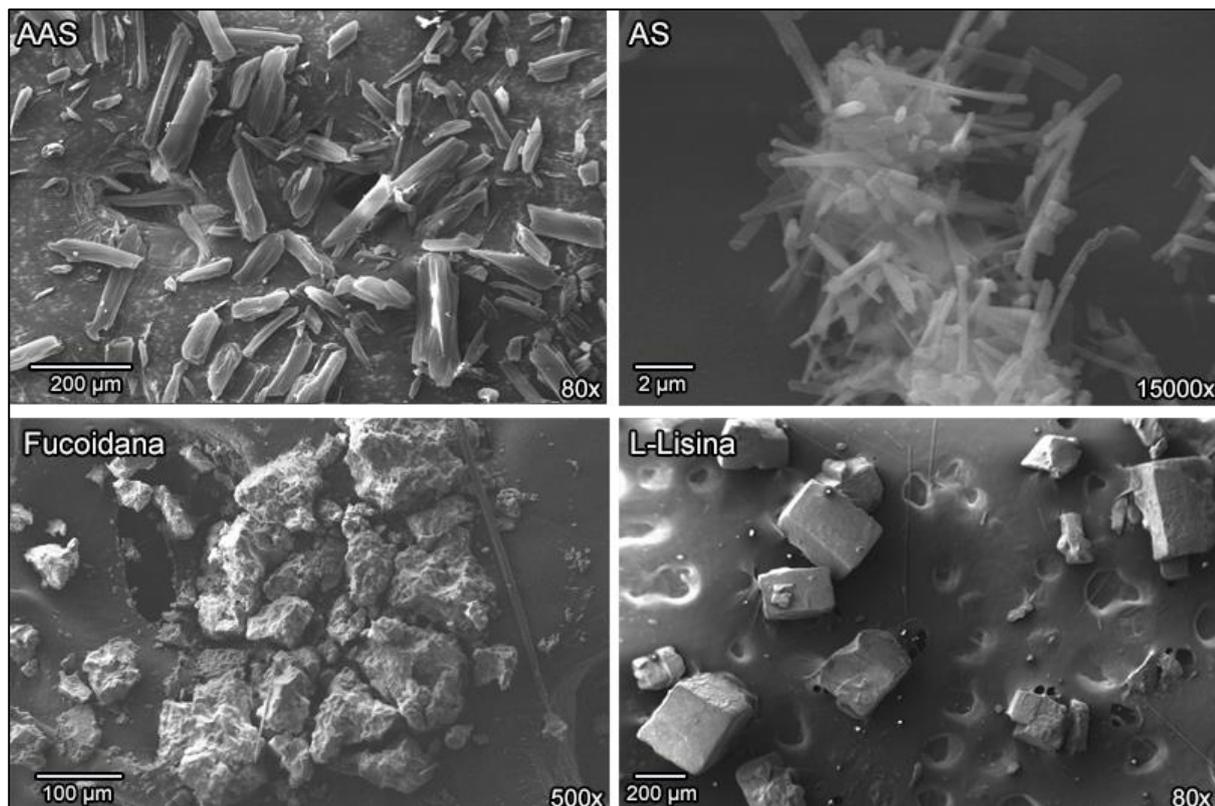
Amostra	Tamanho de partícula				
	$D_{10}$ µm	$D_{50}$ µm	$D_{90}$ µm	$D_{[4,3]}$ µm	SPAN
MP/F4M	1,464 ± 0,010	2,390 ± 0,030	3,750 ± 0,026	2,512 ± 0,022	0,957 ± 0,012
MP/Leu	0,883 ± 0,015	1,383 ± 0,013	2,157 ± 0,018	1,460 ± 0,015	0,921 ± 0,017
MP/Ch	1,513 ± 0,035	2,485 ± 0,030	3,875 ± 0,045	2,603 ± 0,032	0,951 ± 0,023

**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana

### 5.3.2 Análise morfológica

Os resultados demonstraram que ambos, fármaco e produto de degradação (AAS e AS, respectivamente), apresentavam-se em forma de bastão e a fucoidana como um aglomerado amorfo. De forma geral, todos os componentes tinham em sua

constituição carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo que apenas a fucoidana, por ser um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas, exibiu outros constituintes (grande parte sendo enxofre) (**Figura 22** e **Tabela 10**).



**Figura 22** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV): imagens obtidas dos componentes utilizados para obtenção das formulações de micropartículas (MP) em diferentes aumentos. O aumento escolhido foi maior ou menor dependendo do caso para melhor visualização.

**Abreviaturas:** AAS = Ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico.

Em relação às micropartículas, foi observado que as partículas da formulação MP (micropartícula sem adjuvante de secagem) exibiram morfologia indefinida, o que pode ter contribuído para a dificuldade de coleta do pó. Por outro lado, as partículas da formulação MP/F4M apresentaram morfologia irregular com presença de concavidades (colabadas); MP/Leu, morfologia esférica com presença de invaginações (morfologia de hemácia) e MP/Ch, morfologia totalmente esférica. Para as três formulações foi verificada superfície levemente rugosa (**Figura 23**).

**Tabela 10** - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) com identificação de diferentes elementos presentes em cada componente.

Elemento (%)	AAS	AS	L-Lisina	Fucoidana
Carbono	81,02	86,75	68,61	60,90
Nitrogênio	0,6	0,17	10,23	0,50
Oxigênio	18,38	13,08	8,10	12,90
Cloro	-----	-----	13,07	0,41
Sódio	-----	-----	-----	0,54

Magnésio	-----	-----	-----	0,20
Alumínio	-----	-----	-----	0,50
Silício	-----	-----	-----	0,93
Fósforo	-----	-----	-----	0,73
Enxofre	-----	-----	-----	7,61
Cálcio	-----	-----	-----	1,09
Massa total	100	100	100	100

Massa total em porcentagem (%).

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico e AS = ácido salicílico.

Além disso, de acordo com a análise do campo total verificou-se ausência de estruturas com morfologia semelhante às matérias-primas analisadas, o que é um indicativo de não haver excesso de fármaco nas formulações, já que todos os componentes passaram pelo processo de secagem de forma separada afim de verificar estrutura semelhantes (**Figura 23**).

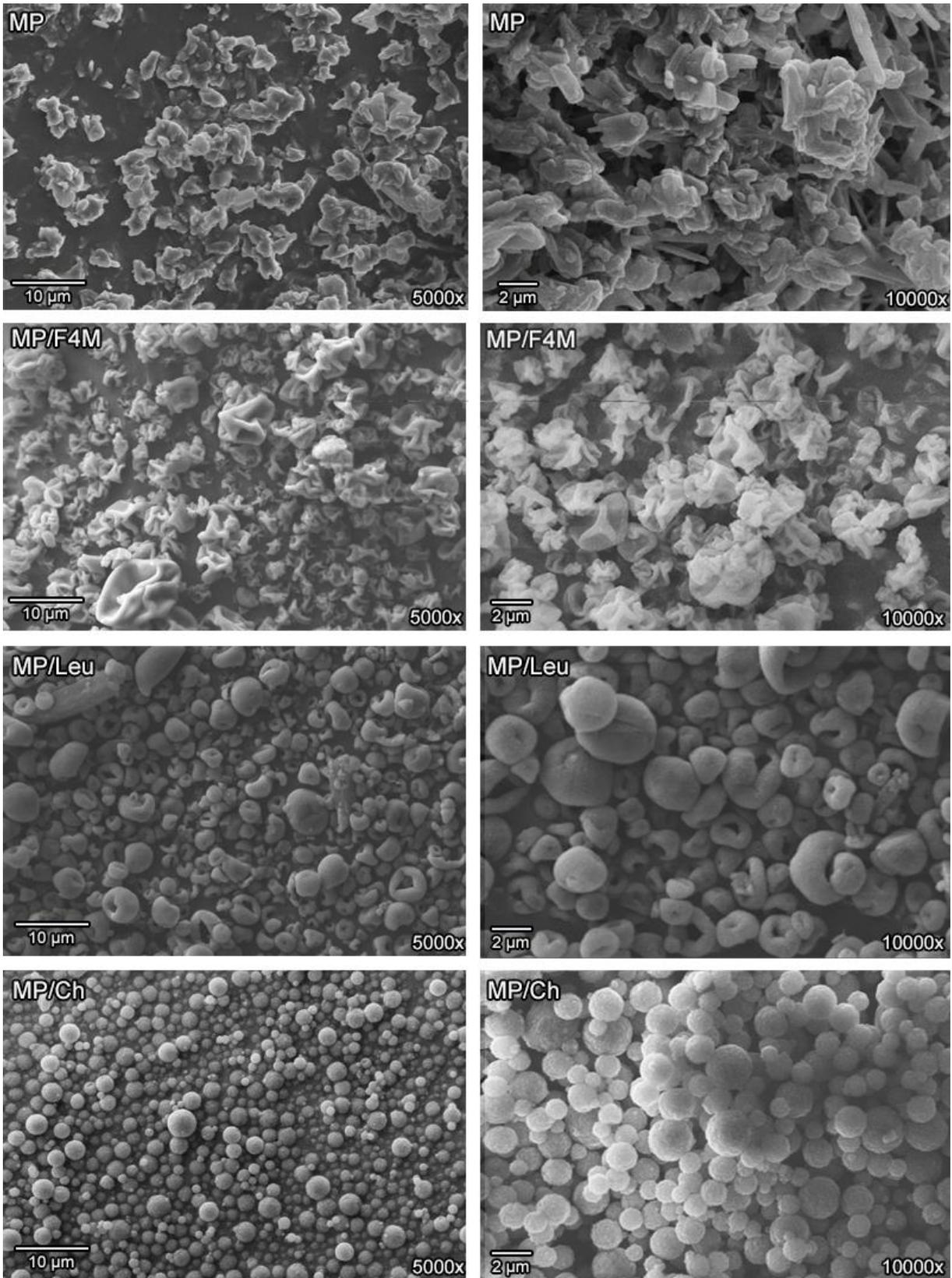
Em relação a análise do EDS, foi constatada pequena porcentagem de enxofre proveniente da fucoidana, o que garante sua presença nas diferentes preparações. Também foi demonstrada presença de cloro, o qual é decorrente da L-lisina e resíduos de água (**Tabela 11**).

**Tabela 11** – Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) com identificação de diferentes elementos presentes em cada formulação

Elemento (%)	MP	MP/F4M	MP/Leu	MP/Ch
Carbono	-----	69,33	85,25	73,06
Nitrogênio	34,42	16,75	4,85	10,34
Oxigênio	26,40	3,84	4,26	15,58
Cloro	39,18	9,07	5,58	0,57
Sódio	-----	-----	0,54	0,42
Enxofre	-----	1,01	0,05	0,04
Massa total	100	100	100	100

Massa total em porcentagem (%).

**Abreviaturas:** MP = Formulação sem adjuvante de secagem (L-Lisina + H<sub>2</sub>O + propilenoglicol 2%); MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana; AAS = ácido acetilsalicílico e AS = ácido salicílico.



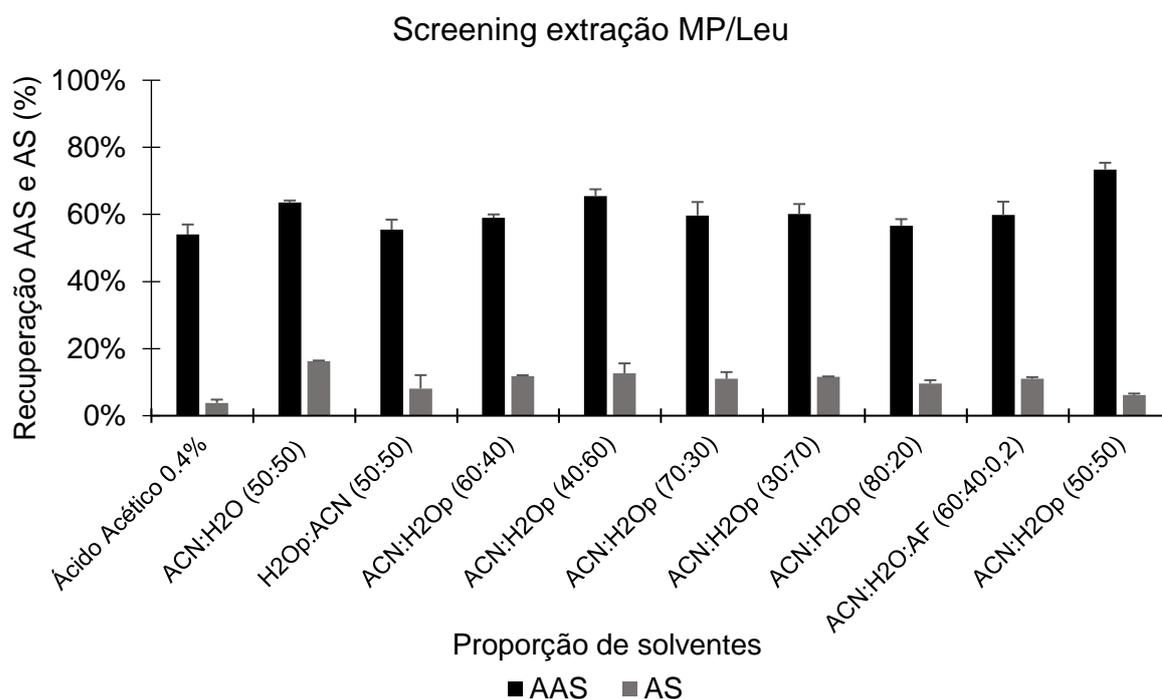
**Figura 23** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV): imagens obtidas das formulações após processo de secagem. Aumentos de 100x, 5000x e 10000x.

**Abreviaturas:** MP = Formulação sem adjuvante de secagem (L-Lisina + H<sub>2</sub>O + propilenoglicol 2%); MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M;

MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana.

### 5.3.3 Determinação da concentração de AAS e padronização das extrações

Em relação à MP/Leu, o primeiro solvente (5 mL) foi adicionado a um balão volumétrico contendo o pó e mantido sob ultrassom por 60 minutos, seguido da adição de 5 mL do segundo solvente (quando aplicável) até completar 120 minutos de extração (**Figura 24**).

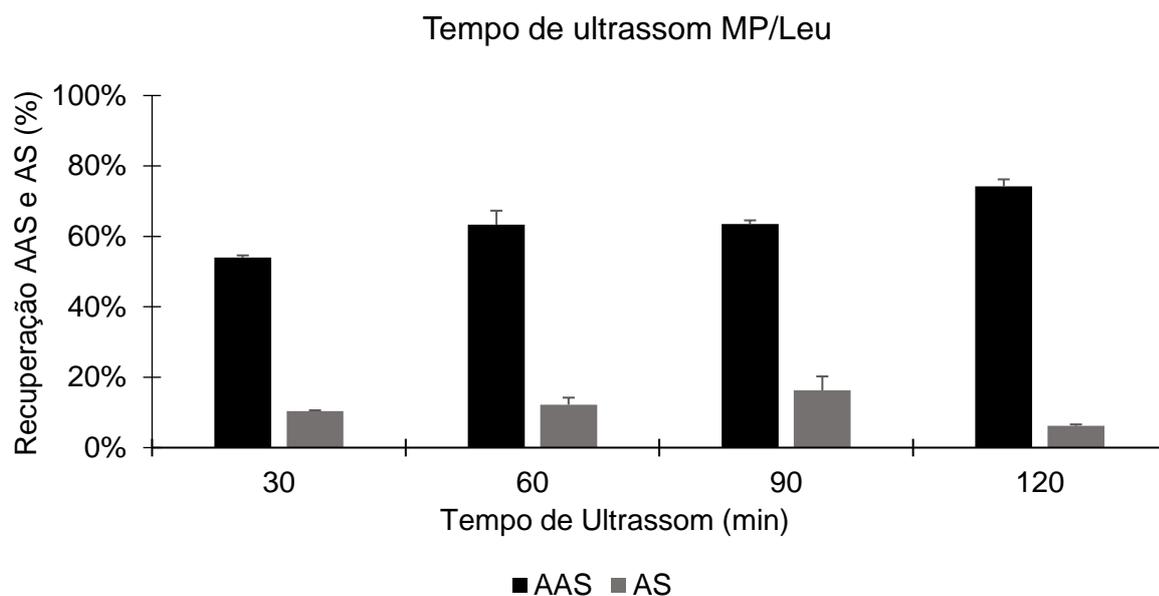


**Figura 24** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu utilizando diferente ordem e quantidade de solvente (n = 3). Proporção expressa em (v/ v).

**Abreviaturas:** H<sub>2</sub>Op = Água com propilenoglicol 2%; AF = ácido fosfórico; AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina.

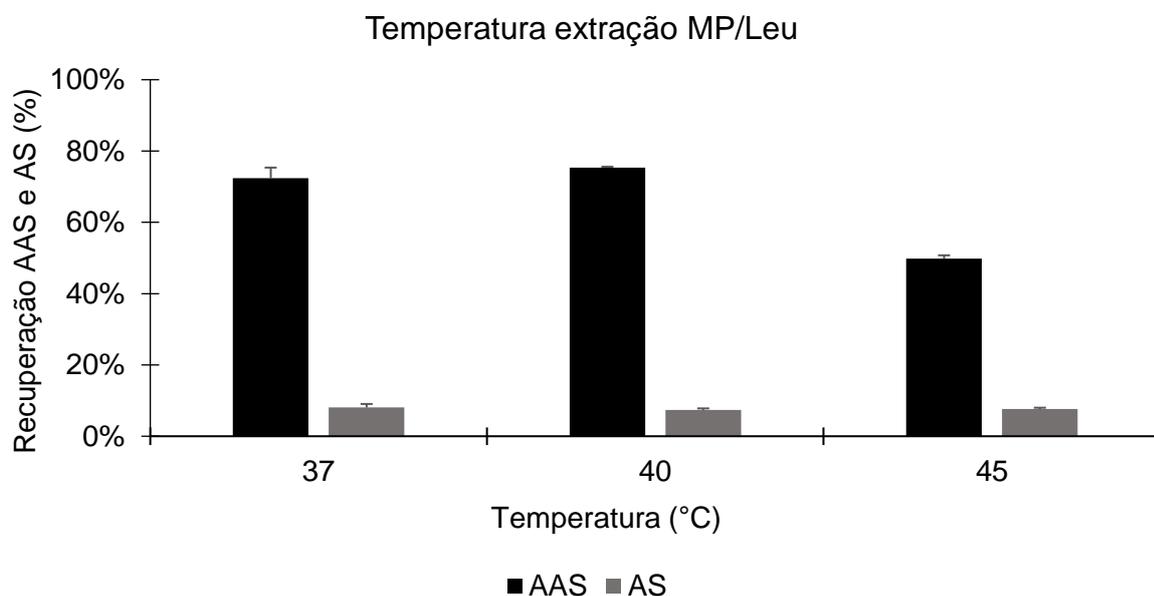
Em seguida, utilizando o melhor resultado obtido anteriormente (ACN:H<sub>2</sub>Op – 50:50 – v/ v), foi apurado se o tempo de sonicação (ultrassom – 30, 60, 90 e 120 minutos) promovia diferenças na recuperação do fármaco, sendo o melhor resultado para 120 minutos (**Figura 25**).

Finalmente, diferentes temperaturas foram analisadas (**Figura 26**), concluindo a padronização da quantificação da concentração de fármaco por grama de pó da MP/Leu, com 40 °C.



**Figura 25** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu utilizando diferentes tempos de ultrassom empregando ACN:H<sub>2</sub>O - 50:50 (v/v) (n = 3).

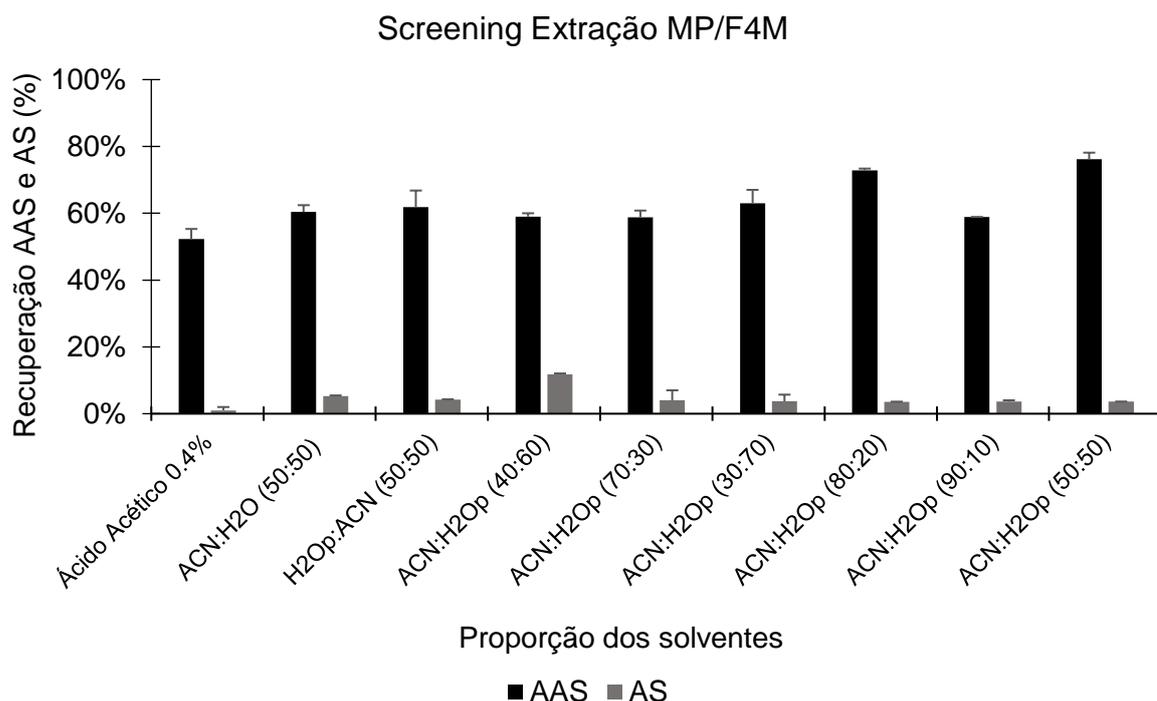
**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina.



**Figura 26** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu utilizando diferentes temperaturas empregando ACN:H<sub>2</sub>O - 50:50 (v/v) (n = 3).

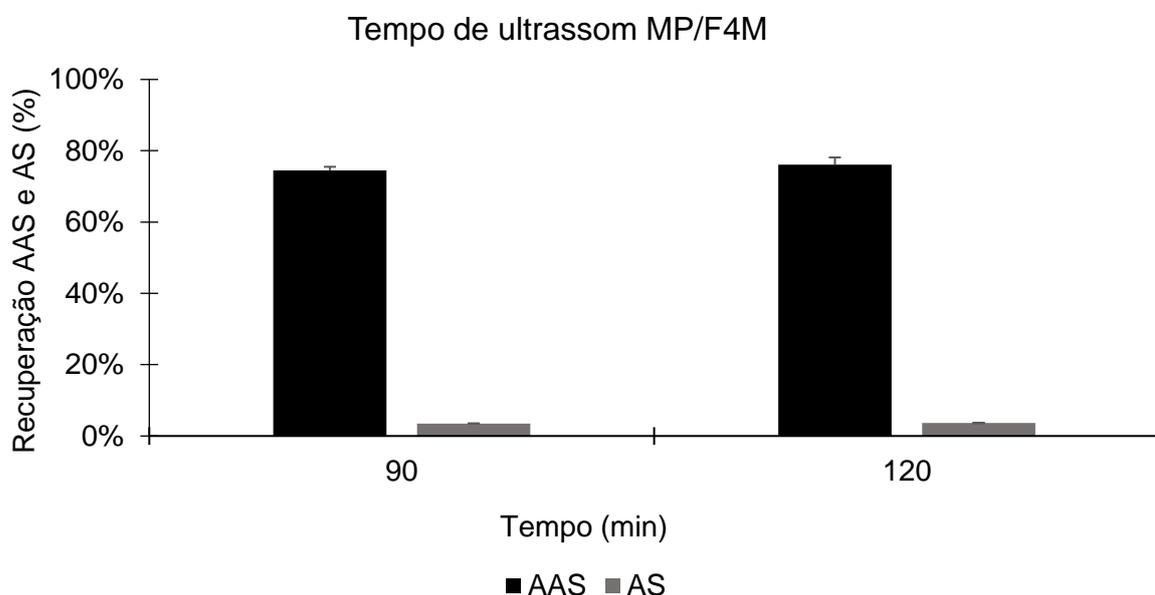
**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina.

Os resultados para a MP/F4M foram semelhantes, considerando os ensaios de determinação da proporção de solventes, tempo de ultrassom e temperatura ótima (**Figuras 27, 28 e 29**, respectivamente).



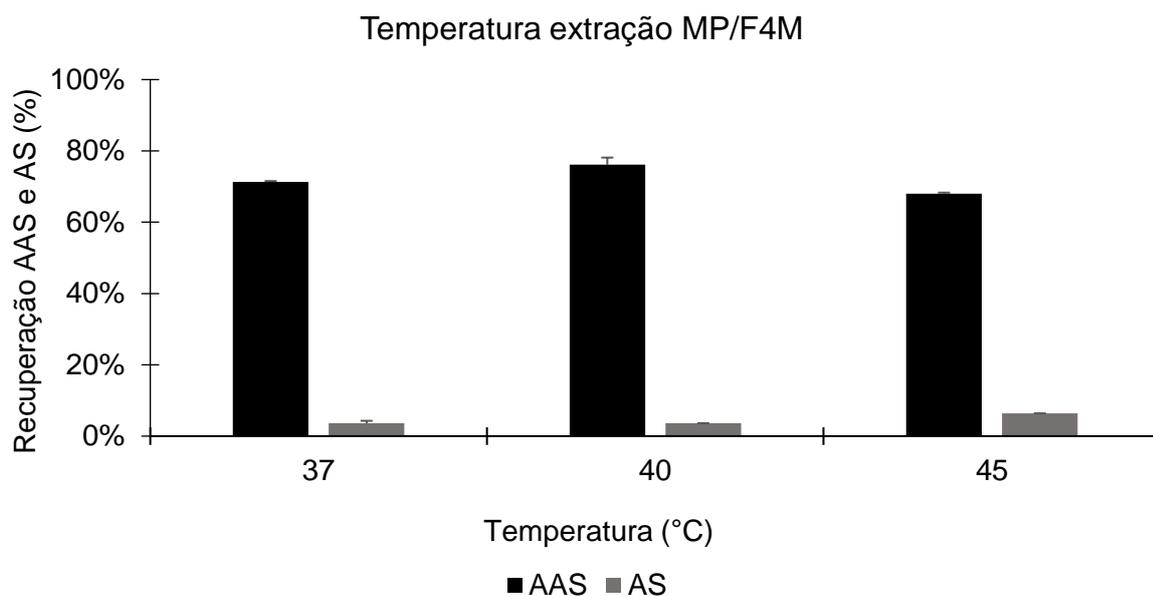
**Figura 27** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M utilizando diferente ordem e quantidade de solvente (n = 3). Proporção expressa em (v/v).

**Abreviaturas:** H<sub>2</sub>Op = Água com propilenoglicol 2%; AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.



**Figura 28** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M utilizando diferentes tempos de ultrassom empregando ACN:H<sub>2</sub>Op - 50:50 (v/v) (n = 3).

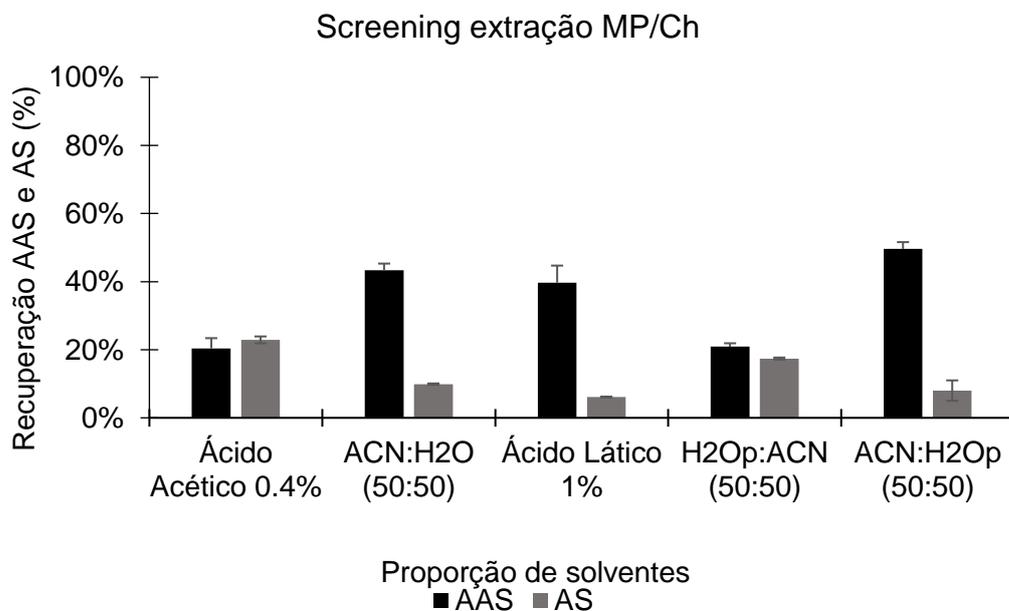
**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.



**Figura 29** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/F4M utilizando diferentes temperaturas empregando ACN:H<sub>2</sub>O<sub>p</sub> - 50:50 (v/ v) (n = 3).

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

Por fim, para a formulação MP/Ch, apenas o *screening* de diferentes solventes e ordem dos mesmos foi realizado devido aos resultados observados na estabilidade do AAS nas micropartículas (**Figura 30**).



**Figura 30** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Ch utilizando diferente ordem e quantidade de solvente (n = 3). Proporção expressa em (v/ v).

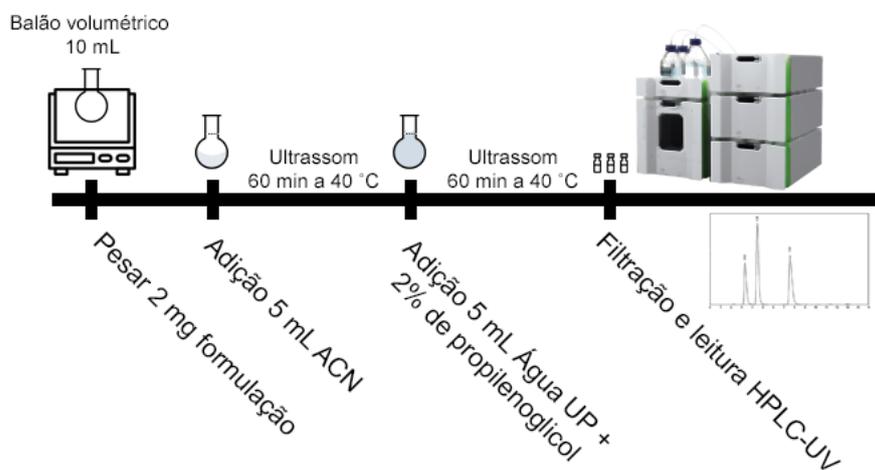
**Abreviaturas:** H<sub>2</sub>O<sub>p</sub> = Água com propilenoglicol 2%; AAS = ácido acetilsalicílico e AS = ácido salicílico.

Após ampla análise destes dados, foi possível perceber que o AAS foi melhor extraído das formulações MP/Leu e MP/F4M utilizando acetonitrila: água + propilenoglicol 2% (50:50 – v/ v), com tempo total de extração de 120 min e temperatura de 40 °C, resultando em  $73,40 \pm 0,02 \%$  e  $76,13 \pm 0,02 \%$  de recuperação do AAS, respectivamente. Em relação à hidrólise do AAS em AS, foi observado  $6,20 \pm 0,00 \%$  e  $3,63 \pm 0,00\%$  para MP/Leu e MP/F4M, respectivamente.

Em contrapartida, a MP/Ch apresentou o pior desempenho, com apenas  $49,60 \pm 0,02\%$  de recuperação do AAS e  $8,00 \pm 0,03\%$  de hidrólise com as mesmas condições acima citadas para análise de teor no tempo zero. Além disso, formulação MP/Ch não foi mantida para a continuidade dos experimentos devido à intensa de hidrólise do AAS, conforme demonstrado no tópico seguinte.

Com isso, foi padronizada a extração conforme descrito abaixo (**Figura 31**):

1. Pesagem de 2 mg da formulação em balão volumétrico de 10 mL;
2. Adição de 5 mL de acetonitrila (ACN);
3. Ultrassom por 60 minutos a 40 °C;
4. Adição de 5 mL de água ultrapura com 2% de propilenoglicol;
5. Ultrassom por 60 minutos a 40 °C, totalizando 120 minutos e
6. Quantificação por HPLC-UV



**Figura 31** – Esquema ilustrativo da extração para determinação da concentração de fármaco nas micropartículas (MP).

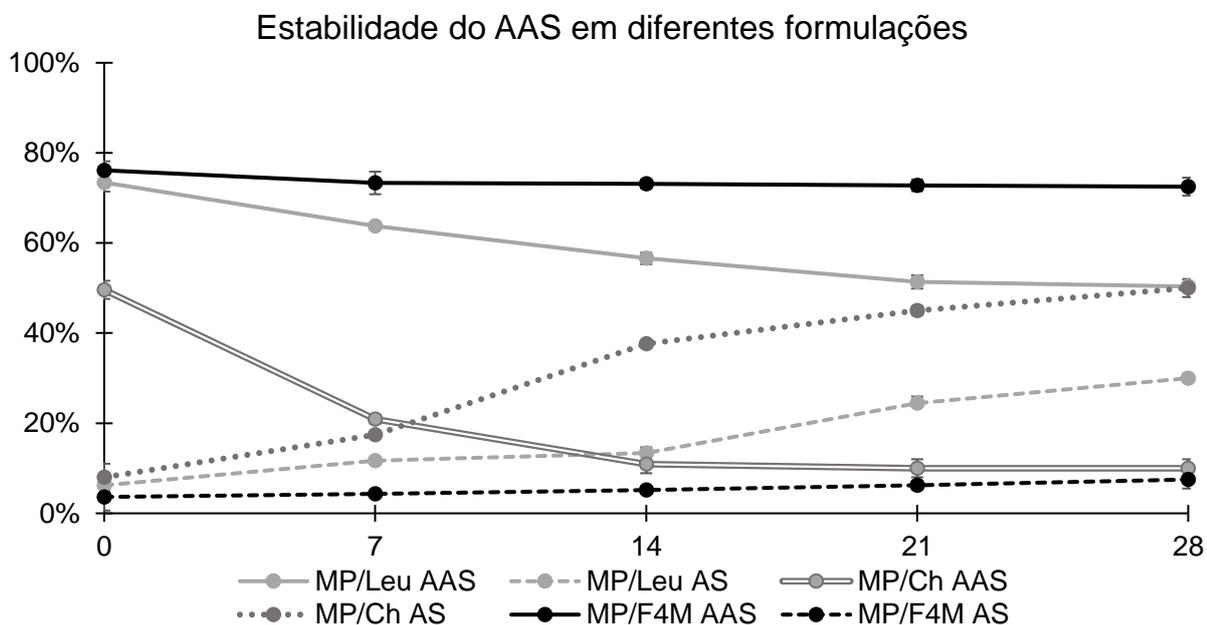
**Abreviaturas:** ACN = acetonitrila; UP = ultrapura; Min = minutos, °C = celsius e HPLC-UV = cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.

Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

### 5.3.4 Estabilidade do AAS nas micropartículas

A **Figura 32** mostra os resultados do estudo de estabilidade do AAS nas formulações, além da quantificação de seu produto de hidrólise (AS) nas três

formulações desenvolvidas, em um período de 28 dias, armazenadas em condições ambientais.



**Figura 32** – Recuperação do AAS e AS (%) da formulação MP/Leu, MP/Ch e MP/F4M avaliada nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 (n = 3).

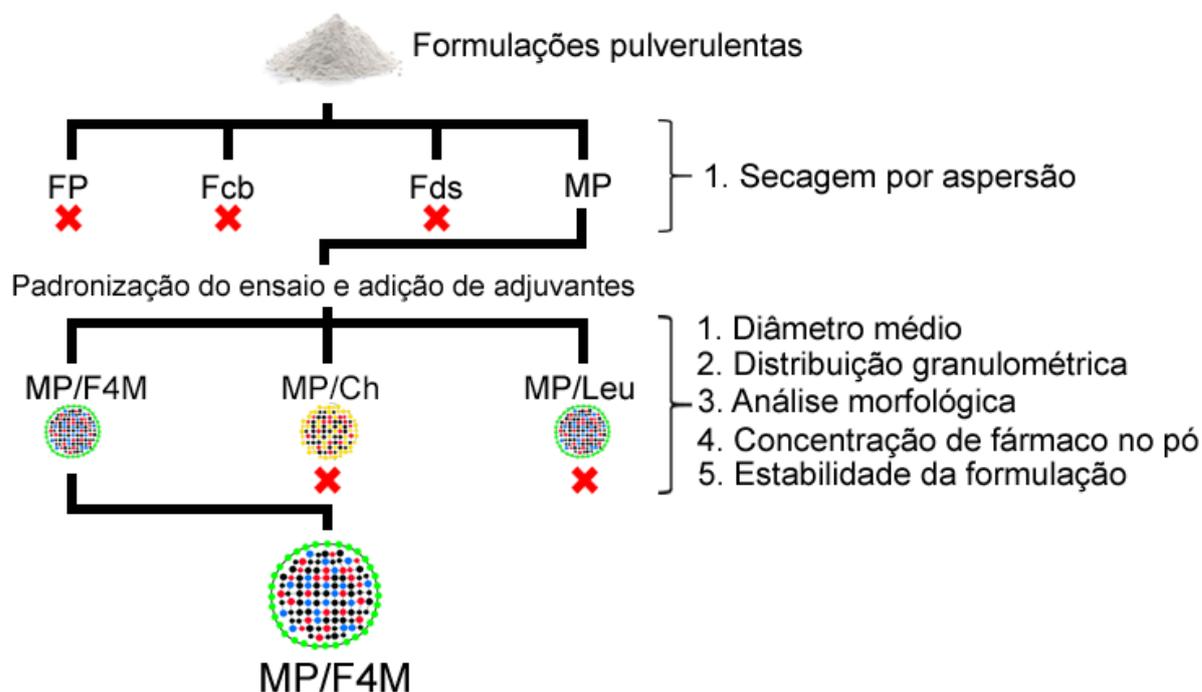
**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; AS = ácido salicílico e MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina, MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana.

Os resultados apontaram a formulação MP/F4M como a mais estável, demonstrando baixa degradação do AAS (Dia 0 =  $76,13 \pm 0,02$  % e dia 28 =  $72,5 \pm 0,02$  %), com conseqüente pequeno aumento do AS ao longo dos dias (Dia 0 =  $3,63 \pm 0,00$  % e dia 28 =  $7,50 \pm 0,00$  %). Adicionalmente, a mesma formulação foi reavaliada após 90 dias (AAS =  $66,20 \pm 0,02$  % e AS =  $11,10 \pm 0,00$  %), confirmando a estabilidade deste sistema.

Em contrapartida, a MP/Leu exibiu elevada hidrólise do AAS (Dia 0 =  $73,42 \pm 0,02$  % e dia 28 =  $50,35 \pm 0,01$  %), com recuperação do AS no dia 0 de  $6,22 \pm 0,00$  % e no dia 28 de  $30,00 \pm 0,00$  %), assim como MP/Ch (Dia 0 =  $49,60 \pm 0,02$  % e dia 28 =  $10,00 \pm 0,02$  %), com recuperação de AS no dia 0 de  $8,00 \pm 0,03$  % e no dia 28 de  $50,00 \pm 0,02$  %, inviabilizando a utilização destes sistemas microparticulados.

Esses resultados possibilitaram o desenvolvimento e produção de um sistema terapêutico de pó inalável para liberação pulmonar do AAS associado à fucoidana, através da técnica de secagem por aspersão utilizando o HPMC F4M como adjuvante

de secagem e promotor de liberação prolongada. A **Figura 33** ilustra os ensaios realizados até a escolha da formulação pulverulenta MP/F4M.



**Figura 33** – Esquema ilustrativo resumido do desenvolvimento da formulação MP/F4M. Alguns ensaios foram omitidos e toda metodologia dos ensaios citados aparece no texto.

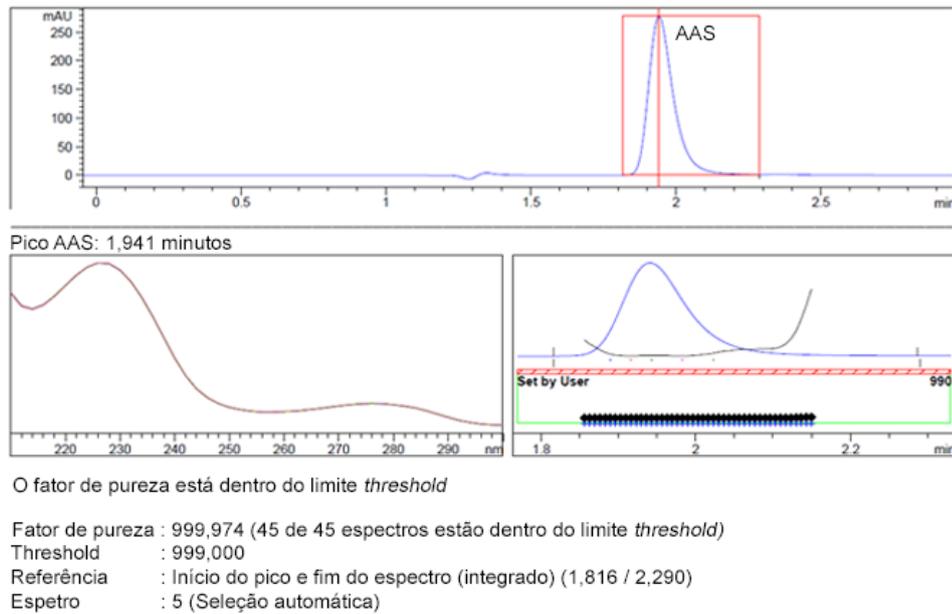
**Abreviaturas:** FP = Formulação contendo Polaxamer 188 (Pluronic® F-68); Fcb = Formulação contendo cloreto de benzalcônio; MP = Formulação de micropartículas contendo L-Lisina; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina; MP/Ch = Formulação de micropartículas contendo quitosana.

Fonte: SAITO *et al.*, 2018.

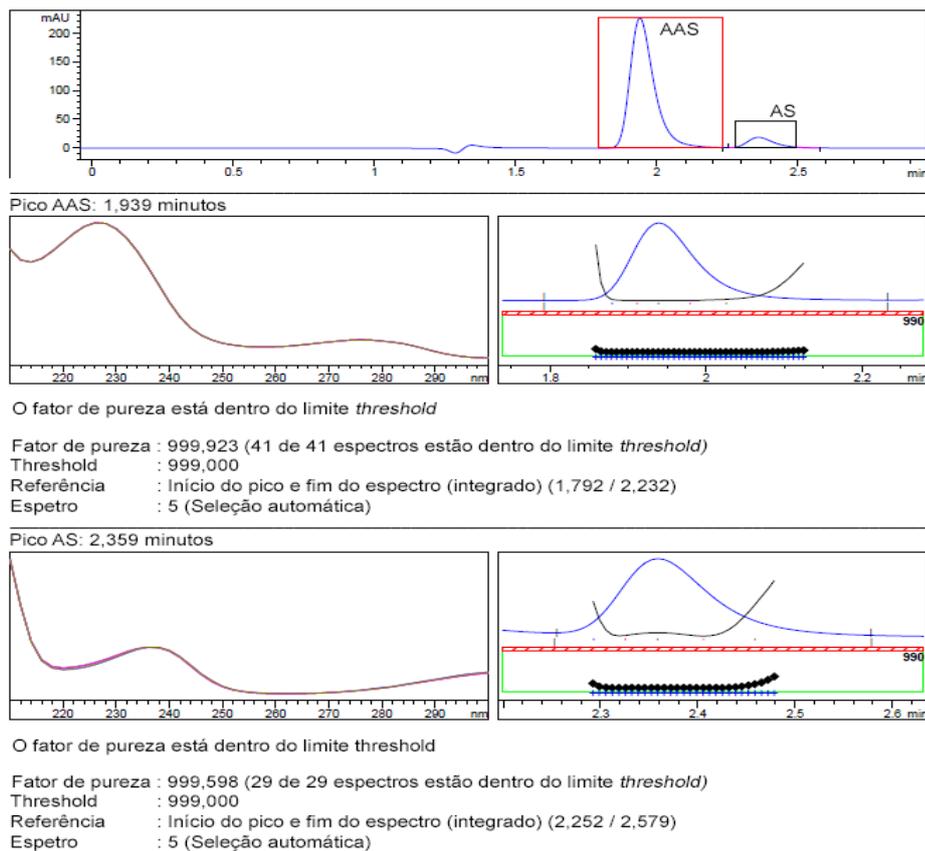
### 5.3.5 Pureza de pico cromatográfico

Com o objetivo de determinar impurezas ou sobreposição de picos que poderiam estar relacionados com a recuperação abaixo de 80% para a formulação MP/F4M, fez-se necessário a análise da pureza de pico cromatográfico.

Os resultados apresentados revelaram fator de pureza de 999,923 e 999,974 para o AAS livre (**Figura 34**) e AAS presente na formulação MP/F4M (**Figura 35**), respectivamente.



**Figura 34** – Pureza de pico do ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS).

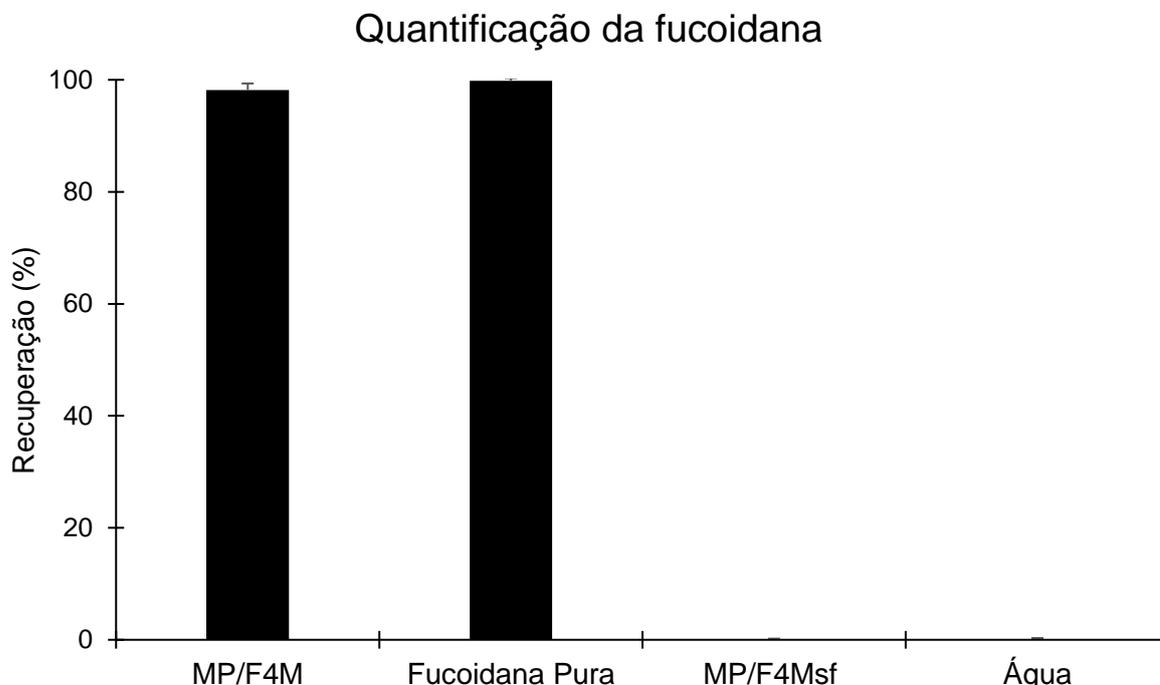


**Figura 35** – Pureza de pico do ácido acetilsalicílico (AAS) presente na formulação MP/F4M.

#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DA FUCOIDANA NAS MICROPARTÍCULAS

Aproximadamente 100% da concentração de fucoidana incorporada na formulação MP/F4M ( $98,20 \pm 1,15\%$ ) foi recuperada, valor comparável com a

quantificação de fucoidana pura (diluída em água sem passar pelo processo de secagem =  $99,80 \pm 0,50\%$ ). Além disso, o ensaio mostrou-se específico para detecção do polissacarídeo (água pura =  $0,00 \pm 0,20\%$  e formulação sem fucoidana MP/F4Msf =  $0,00 \pm 0,30\%$ ) (**Figura 36**).



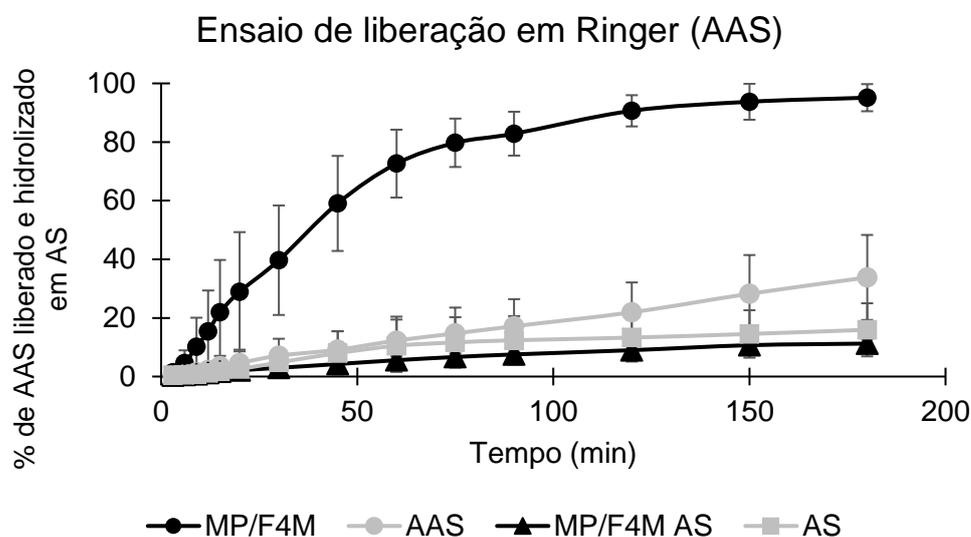
**Figura 36** – Recuperação da fucoidana avaliada em três lotes de três dias diferentes da formulação MP/F4M e da formulação sem fucoidana MP/F4Msf. Para efeitos de comparação, foi utilizado água como controle negativo e fucoidana livre como controle positivo.

**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

### 5.5 PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO AAS A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS UTILIZANDO CÁPSULAS DE GELATINA DURA

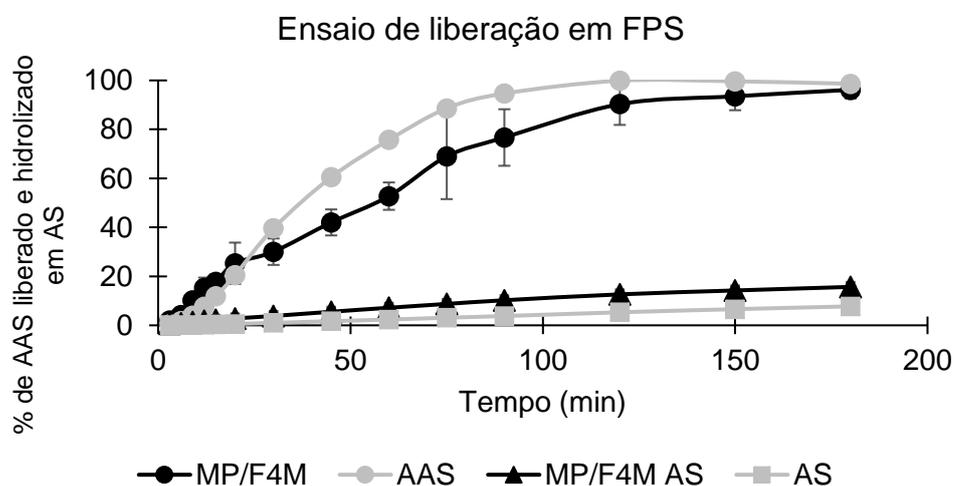
Analisando os resultados, foi possível perceber que tanto a formulação MP/F4M quanto o fármaco puro, resultaram em perfis de liberação prolongados em ambos os meios testados (FPS e Ringer), apresentando elevado valor de desvio-padrão. Estes resultados corroboram com estudos já descritos na literatura, que remetem à ligação cruzada do AAS com a gelatina constituinte da cápsula dura utilizada como invólucro (DIGENIS, GOLD, SHAH, 1994; GOWTHAMARAJAN & SINGH, 2010; MARQUES, 2014; OFNER *et al.*, 2001; OHARA *et al.*, 2005). Além disso, a alta cristalinidade do fármaco puro pode ter retardado sua solubilização. Assim, estes fatores podem ter interferido na dissolução do fármaco gerando um perfil de liberação pseudo

sustentado (**Figuras 37 e 38**). Devido à estas problemáticas, o ensaio só foi realizado em Ringer e FPS.



**Figura 37** – Perfil de liberação *in vitro* da formulação MP/F4M e fármaco puro em Ringer. Na mesma figura, a linha cinza com quadrado expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco puro durante o tempo de ensaio e a linha preta com triângulo expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco presente na formulação MP/F4M durante o tempo de ensaio.

**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.



**Figura 38** – Perfil de liberação *in vitro* da formulação MP/F4M e fármaco puro em Fluido Pulmonar Simulado (FPS). Na mesma figura, a linha cinza com quadrado expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco puro durante o tempo de ensaio e a linha preta com triângulo expressa a porcentagem de AS provenientes da hidrólise do fármaco presente na formulação MP/F4M durante o tempo de ensaio.

**Abreviaturas:** FPS = Fluido pulmonar simulado e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

## 5.6 PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO AAS A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS UTILIZANDO PÓ COESO

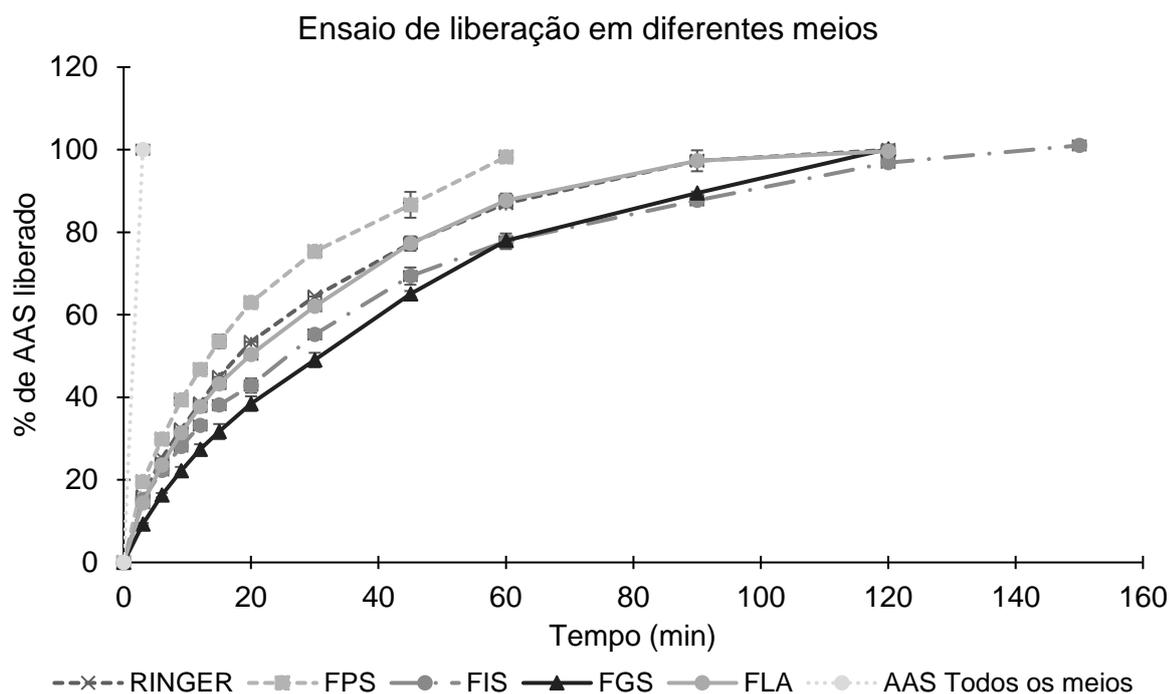
O desenvolvimento de uma técnica para obtenção de um pó coeso e de um aparato de dissolução específico para este ensaio permitiram determinar o perfil de liberação do AAS puro e presente na formulação MP/F4M em diferentes meios (Ringer, Fluido Pulmonar Simulado - FPS, Fluido Lisossomal Artificial – FLA, Fluido Gástrico Simulado – FGS e Fluido Intestinal Simulado – FIS) sem grandes variações intra-ensaio (baixo desvio-padrão), diferentemente do que foi observado utilizando cápsulas de gelatina dura.

Devido ao método proposto substituir a utilização de cápsulas de gelatina dura ou outro meio de confinamento e o aparato possibilitar a realização deste ensaio com pequenas quantidades de amostra, ambos foram objeto de patenteamento junto ao INPI (**BR1020180090933**), conforme **ANEXO 10.2 - MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE PÓS E APARATO DISSOLUTOR**.

Nos ensaios de liberação *in vitro* utilizando pó coeso, os resultados demonstraram que o AAS puro coeso dissolveu rapidamente, apresentando 100% da concentração disponível em menos de 3 minutos em todos os meios testados. Por outro lado, quando associado às micropartículas, foi percebido controle da liberação do AAS (FPS = 60 min; Ringer, FGS e FLA = 120 min e FIS = 150 min) (**Figura 39**).

A formulação MP/F4M coesa demonstrou hidrólise do AAS em AS abaixo de 5% para os meios Ringer (pH 7,4), FPS (pH 7,4) e FLA (pH 4,5). Já para os meios FGS (pH 1,2) e FIS (pH 6,8), observou-se uma hidrólise aumentada ( $9,12 \pm 0,13$  % e  $12,16 \pm 0,49$  %, respectivamente), possivelmente devido ao pH mais ácido do FGS e da concentração de sais do FIS (**figura omitida**).

Os valores de critério de seleção do modelo matemático para modulação dos perfis de liberação foram calculados e encontram-se descritos na **Tabela 12**, considerando os melhores valores de coeficiente de correlação (MSC) e r quadrado ( $r^2$ ) obtidos através dos dados experimentais.



**Figura 39** – Perfil de liberação *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro (linha cinza clara pontilhada).

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; FPS = Fluido Pulmonar Simulado; FLA = Fluido Lisossomal Artificial; FGS = Fluido Gástrico Simulado e FIS = Fluido Intestinal Simulado e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

**Tabela 12** – Perfis de liberação de primeira ordem ou segunda ordem

Liberação de primeira ordem					
	Ringer	FPS	FGS	FIS	FLA
r <sup>2</sup>	0,864 ± 0,008	0,913 ± 0,003	0,883 ± 0,009	0,936 ± 0,005	0,883 ± 0,004
r	0,909 ± 0,009	0,936 ± 0,005	0,932 ± 0,009	0,962 ± 0,003	0,937 ± 0,003
k	0,002 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000
MSC	0,453 ± 0,076	0,815 ± 0,041	0,680 ± 0,095	1,483 ± 0,099	0,355 ± 0,031
Liberação de segunda ordem					
	Ringer	FPS	FGS	FIS	FLA
r <sup>2</sup>	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000
r	0,998 ± 0,000	0,998 ± 0,001	0,998 ± 0,001	0,999 ± 0,000	0,999 ± 0,000
MSC	4,916 ± 0,144	5,015 ± 0,440	4,751 ± 0,094	5,645 ± 0,258	5,369 ± 0,374
A	10,975 ± 0,767	9,451 ± 1,494	11,652 ± 1,311	87,289 ± 3,317*	14,933 ± 1,672
α	0,050 ± 0,004	0,083 ± 0,007	0,004 ± 0,0423	0,000 ± 0,0004	0,035 ± 0,003
B	89,417 ± 0,792*	90,274 ± 1,483*	87,559 ± 1,303*	12,370 ± 3,220	83,720 ± 1,367*
β	0,0003 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,0004 ± 0,000	0,000 ± 0,031 ± 0,009	0,0002 ± 0,000

**Abreviaturas:** FPS = Fluido Pulmonar Simulado; FLA = Fluido Lisossomal Artificial; FGS = Fluido Gástrico Simulado; FIS = Fluido Intestinal Simulado; r = coeficiente de

correlação;  $k$  = constante de velocidade;  $A$  = percentual liberado na etapa rápida;  $\alpha$  = velocidade de  $A$ ;  $B$  = percentual liberado na etapa lenta e  $\beta$  = velocidade de  $B$ .

A modelagem matemática revelou que o melhor ajuste foi determinado pela liberação de segunda ordem, caracterizada por duas etapas de liberação ( $A$  = rápida e  $B$  = lenta) para todos os meios. Cabe ressaltar que apenas para o FIS houve uma alteração de perfil, no qual aproximadamente 87% de fármaco ( $87,289 \pm 3,317$  %) foi liberado na etapa rápida ( $A$ ) e 12% ( $12,370 \pm 3,220$  %) na etapa lenta ( $B$ ).

Por fim, a análise do perfil de liberação pela Lei das Potências, adequada a formulações contendo HPMC (SIEPMANN & PEPPAS, 2012) demonstrou mecanismo de liberação do tipo transporte anômalo ( $0,43 < n < 0,85$ ) em todos os meios (**Tabela 13**).

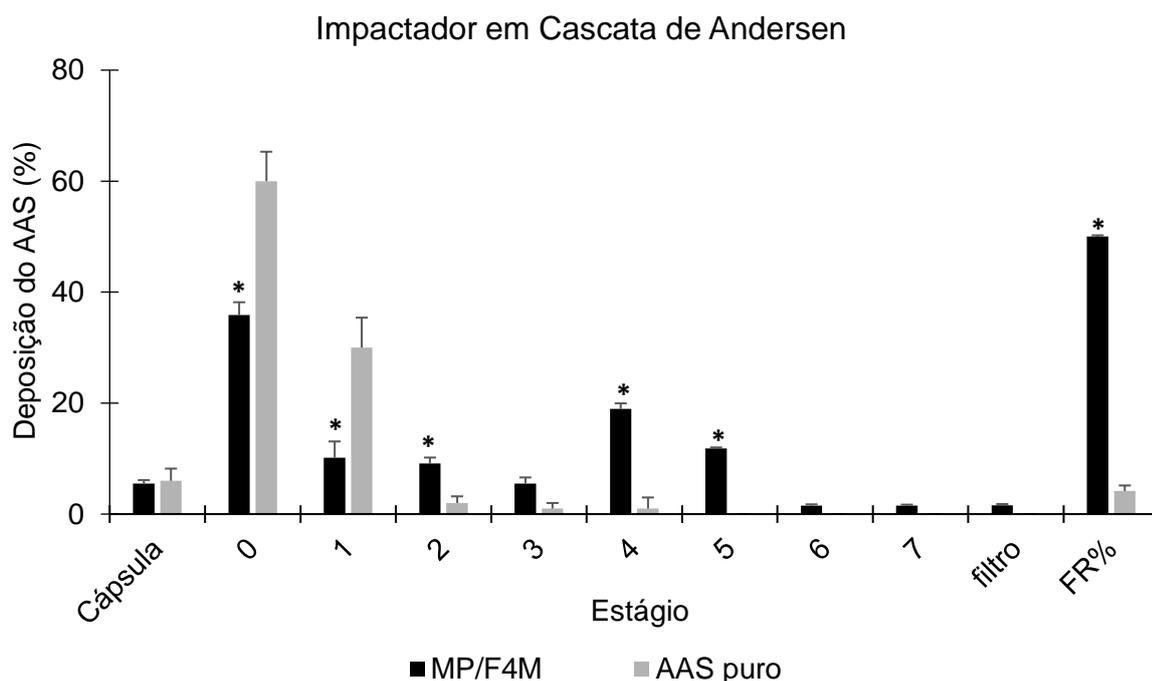
**Tabela 13** – Resultados obtidos aplicando Lei das Potências.

Lei das Potências				
Ringer	FPS	FGS	FIS	FLA
$0,57 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,00$	$0,67 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,01$

**Abreviaturas:** FPS = Fluido Pulmonar Simulado; FLA = Fluido Lisossomal Artificial; FGS = Fluido Gástrico Simulado e FIS = Fluido Intestinal Simulado.

## 5.7 DESEMPENHO AERODINÂMICO *IN VITRO*

Na análise dos valores obtidos no Impactador em Cascata de Andersen (ACI-DPI), foi possível detectar e quantificar o AAS em todos os estágios, sendo que aproximadamente 50% da concentração total do fármaco ( $50,02 \pm 0,21$ %) ficou depositada nos estágios 2-7, os quais, representam a fração de partículas respiráveis (FR), enquanto que para o AAS puro, cerca de 90% do fármaco ficou depositado na porção orofaríngea (estágios 0-1). A análise estatística apresentou diferenças significativas quanto a fração de partículas finas (FPF) e fração respirável (FR) da formulação MP/F4M em relação ao AAS puro ( $p < 0,05$ ), indicando que a associação do AAS ao sistema carreador resultou em propriedades aerodinâmicas adequadas para administração pulmonar visando deposição média a profunda (CARVALHO *et al.* 2011; ZATTA *et al.* 2018) (**Figura 40 e Tabela 14**).



**Figura 40** – Desempenho de deposição do AAS (%) em cada estágio do Impactador em Cascata de Andersen para a formulação MP/F4M e AAS puro e \* =  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e FR = fração respirável.

**Tabela 14** – Propriedades aerodinâmicas determinadas pelo Impactador em Cascata de Andersen.

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

\* =  $p < 0,05$

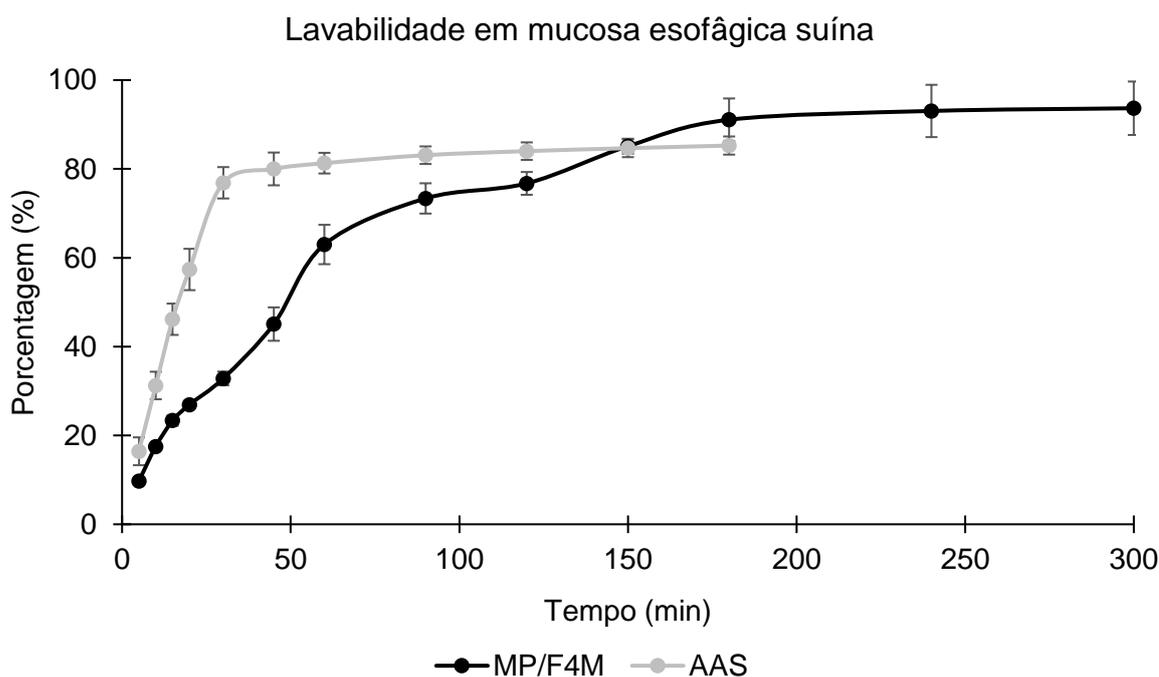
**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; DE = dose emitida; FPF = fração de partículas finas e FR = fração respirável

## 5.8 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS *IN VITRO*

### 5.8.1 Perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína *in vitro*

A formulação MP/F4M ficou visivelmente aderida à mucosa suína, observado pelo lento perfil de lavabilidade. Após 180 minutos, a concentração de fármaco (AAS) lavado entrou em estado de equilíbrio, obtendo-se  $91,08 \pm 4,79$  % de fármaco recuperado do total administrado. Este resultado confirma a capacidade bioadesiva da formulação, possivelmente relacionada à utilização do HPMC conforme descrito por Zatta e colaboradores (ZATTA *et al.*, 2018). O AAS puro foi analisado como controle, apresentando baixa concentração de fármaco no fluido lavado, entrando em estado de equilíbrio após 60 minutos de experimento com apenas 80% de

recuperação da concentração total ( $83,09 \pm 1,97 \%$ ) (**Figura 41**). Ao final do experimento, o meio receptor (FPS), assim como a mucosa utilizada foram quantificados em relação à concentração de fármaco permeado e retido, respectivamente. A quantificação no meio receptor demonstrou  $4,30 \pm 0,13 \%$  e  $1,12 \pm 0,30 \%$  para o AAS presente na formulação e para o AAS puro, respectivamente. Além disso, foi observado concentração de  $1,11 \pm 0,13 \%$  (AAS presente na formulação) e  $0,42 \pm 0,20 \%$  (AAS puro) na mucosa.



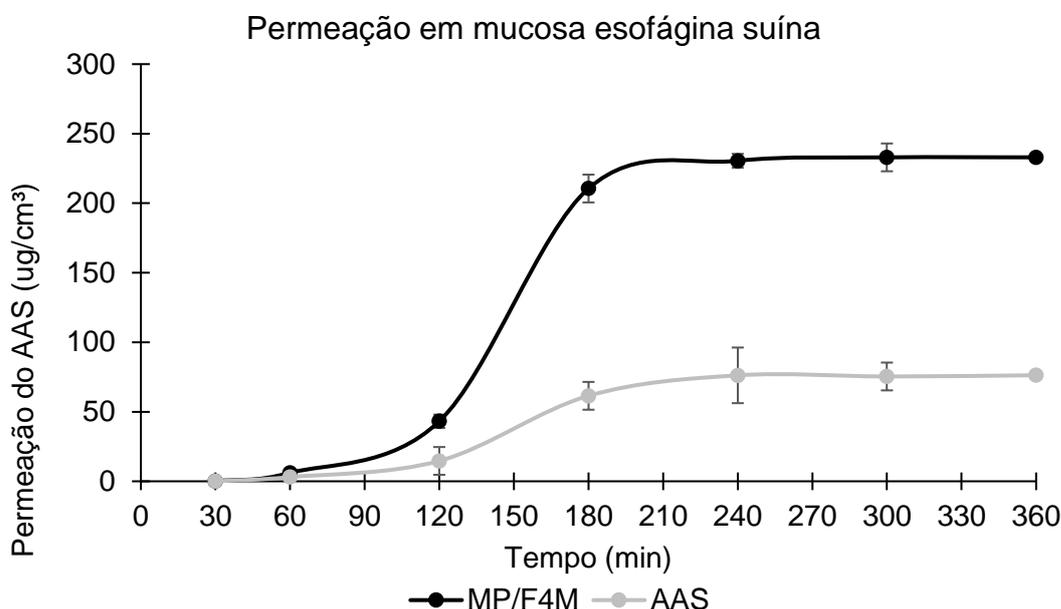
**Figura 41** – Perfil de lavabilidade em mucosa esofágica suína *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando Fluido Pulmonar Simulado (FPS) como meio receptor. **Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

### 5.8.2 Perfil de permeação em mucosa esofágica suína *in vitro*

Para a análise do perfil de permeação *in vitro*, foi utilizado esôfago suíno visto que ele apresenta a proteína mucina, a qual está presente em pulmões humanos. Para esse ensaio foram utilizados como parâmetro de finalização do ensaio, dois tempos após primeiro ponto de platô (três tempos totais).

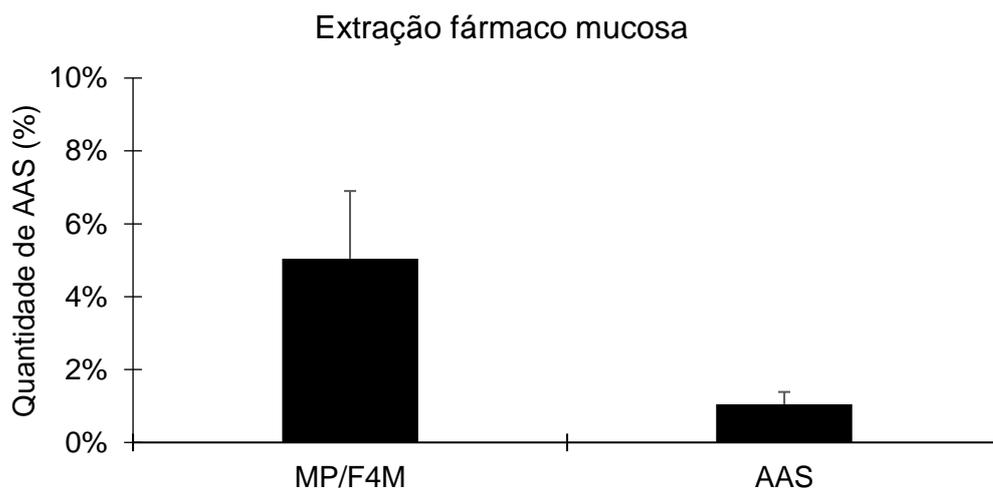
A permeabilidade da formulação MP/F4M ( $232,97 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de AAS) foi muito maior quando comparada ao fármaco livre ( $76,26 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de AAS), corroborando a capacidade de permeação da formulação. Ainda, o equilíbrio foi observado no tempo

de aproximado de 200 minutos para a formulação, sendo semelhante aos resultados de lavabilidade para a formulação MP/F4M (Figura 42).



**Figura 42** – Perfil de permeação em mucosa esofágica suína *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando Fluido Pulmonar Simulado (FPS) como meio receptor. **Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

Por fim, na extração do AAS na mucosa após 360 minutos, foi possível perceber que aproximadamente 5 % do fármaco da formulação MP/F4M ficou retido na mucosa, de forma diferente ao fármaco puro (1 %) (Figura 43).



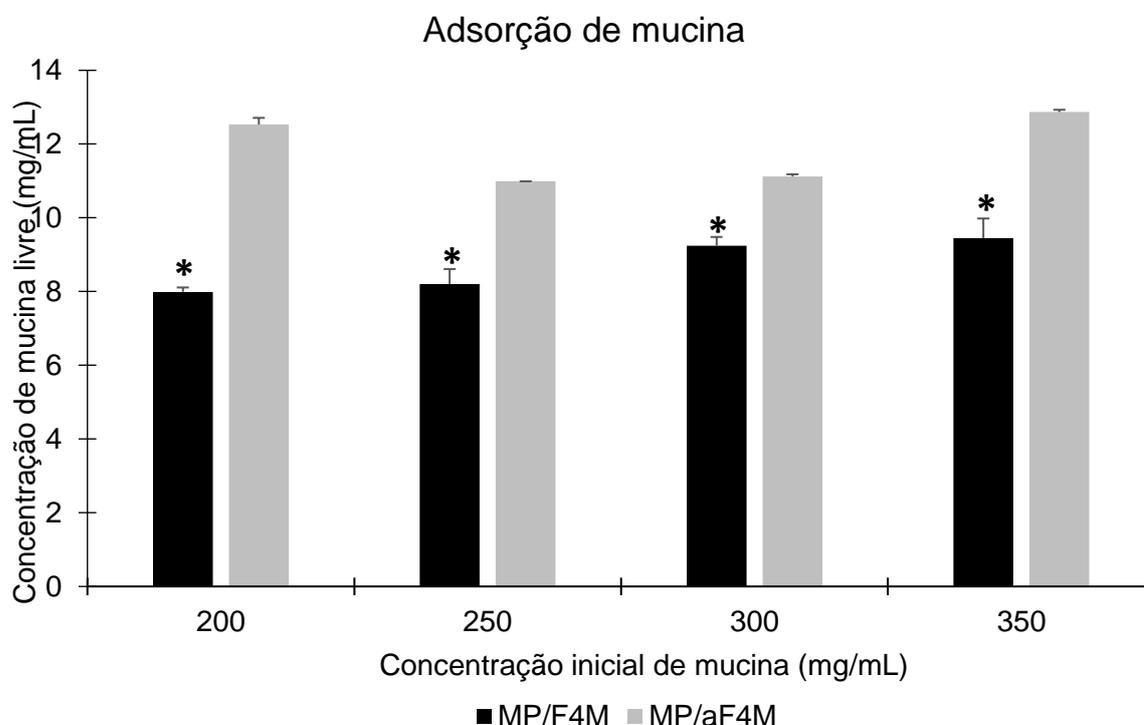
**Figura 43** – Porcentagem de fármaco retido da mucosa após de permeação *in vitro* da formulação MP/F4M e AAS puro utilizando Fluido Pulmonar Simulado (FPS) como meio receptor.

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico e MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M.

### 5.8.3 Perfil de adsorção de mucina

A análise estatística por ANOVA demonstrou diferença significativa na capacidade de adsorção de mucina pela formulação na presença de HPMC (MP/F4M). A partir desta análise pode-se perceber que a capacidade de adsorção da partícula tem um limite em relação à quantidade de mucina do meio, não havendo uma relação direta concentração de mucina versus capacidade de adsorção (**Figura 44**).

Com isso, a presença de HPMC na estruturação da partícula proporciona significativo aumento no potencial mucoadesivo, que é constante ao atingir sua capacidade máxima de adsorção (**Figura 44**).



**Figura 44** – Perfil de adsorção de mucina *in vitro* da formulação MP/F4M e MP/aF4M B em concentrações conhecidas de mucina, onde \* =  $p < 0,05$ . Abreviaturas: MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/aF4M = Formulação com os constituintes com exceção do HPMC.

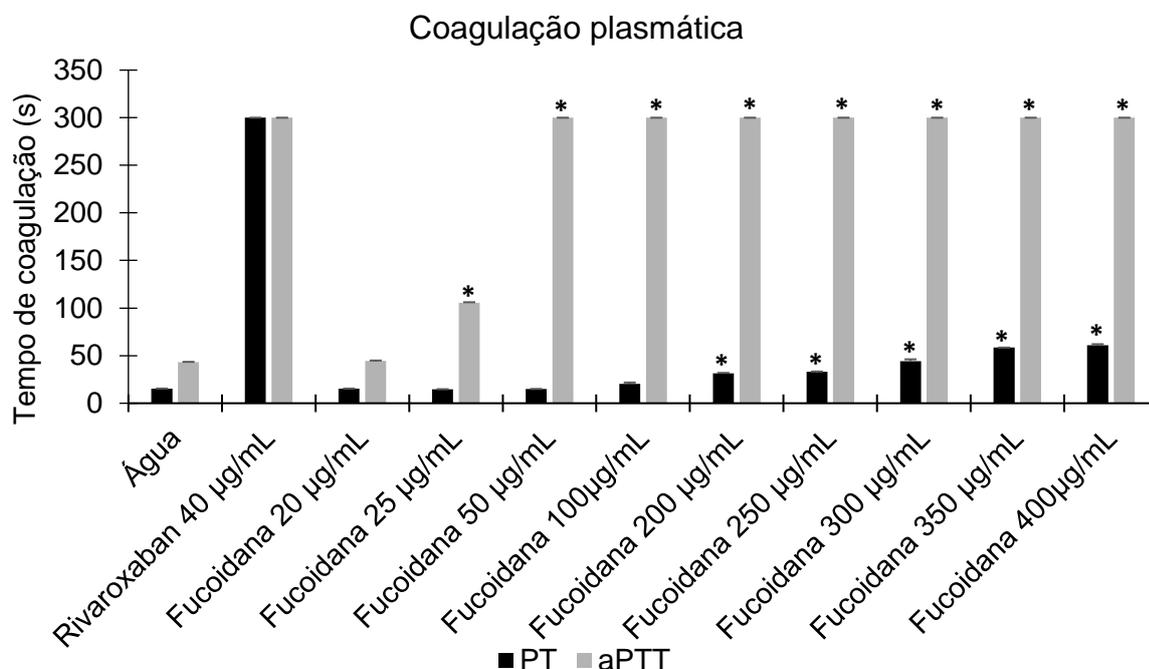
### 5.9 ENSAIOS ANTIHEMOSTÁTICOS *IN VITRO*

Para os ensaios antihemostáticos *in vitro*, foram utilizados diferentes controles positivos para cada ensaio específico. Os resultados foram analisados estatisticamente comparando os com o controle negativo ou positivo, onde o asterisco (\*) refere-se a um p valor menor que 0,05.

### 5.9.1 Ensaios de coagulação plasmática *in vitro*

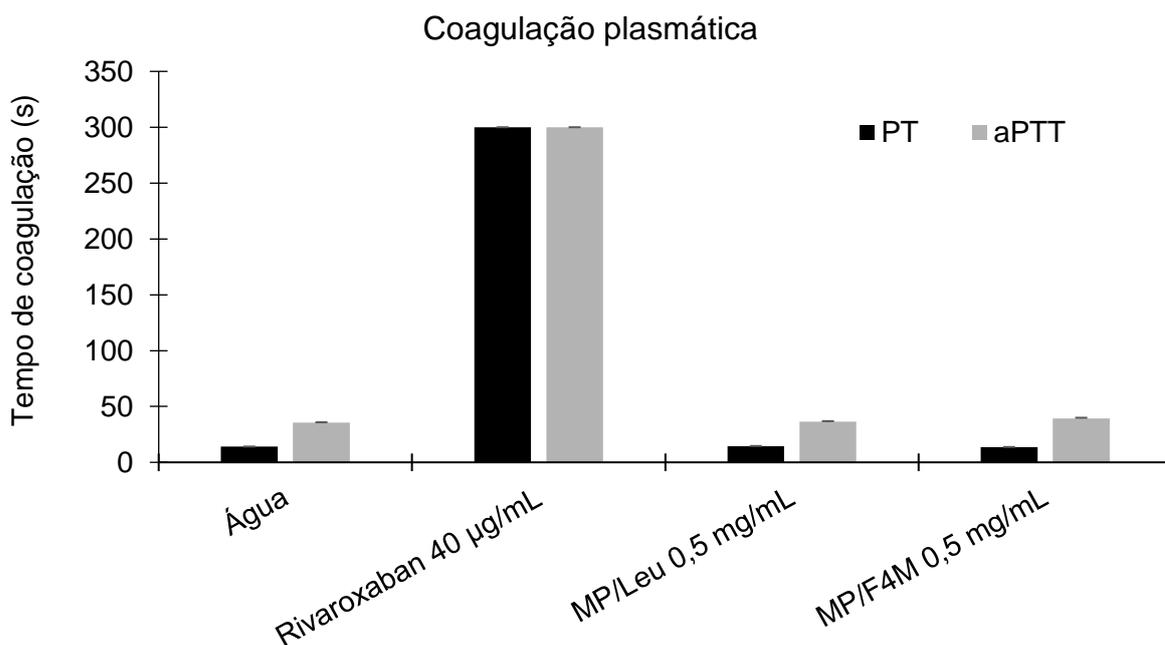
Inicialmente, foram realizados ensaios de coagulação *in vitro* através do teste de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) para diversas concentrações de fucoidana (25, 50, 100, 200, 250, 300, 350 e 400 µg/mL) afim de analisar seu perfil anticoagulante descrito na literatura (CUMASHI *et al.*, 2007; ALE, MIKKELSEN, MEYER, 2011b; ZHAO *et al.*, 2016), utilizando a água como controle negativo e rivaroxabana, um inibidor direto do fator Xa, como controle positivo (**Figura 45**).

Analisando os resultados, foi possível perceber que no PT, a fucoidana dobrava o tempo de coagulação na concentração de 200 µg/mL, exibindo este mesmo perfil no aPTT na concentração de 25 µg/mL.



**Figura 45** – Avaliação da atividade anticoagulante da fucoidana em diversas concentrações através dos ensaios de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), \* =  $p < 0,05$ .

Com isso, procedeu-se aos ensaios de coagulação plasmática *in vitro* utilizando as formulações MP/F4M e MP/Leu (0,5 mg/mL). De forma interessante, as formulações na concentração de 0,5 mg/mL que apresentavam 33 µg/mL de fucoidana em sua constituição, não apresentaram atividade anticoagulante no PT ou aPTT, diferindo dos resultados observados anteriormente para a fucoidana pura no ensaio do aPTT (**Figura 46**).



**Figura 46** – Avaliação da atividade anticoagulante das formulações MP/F4M e MP/Leu através dos ensaios de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT).

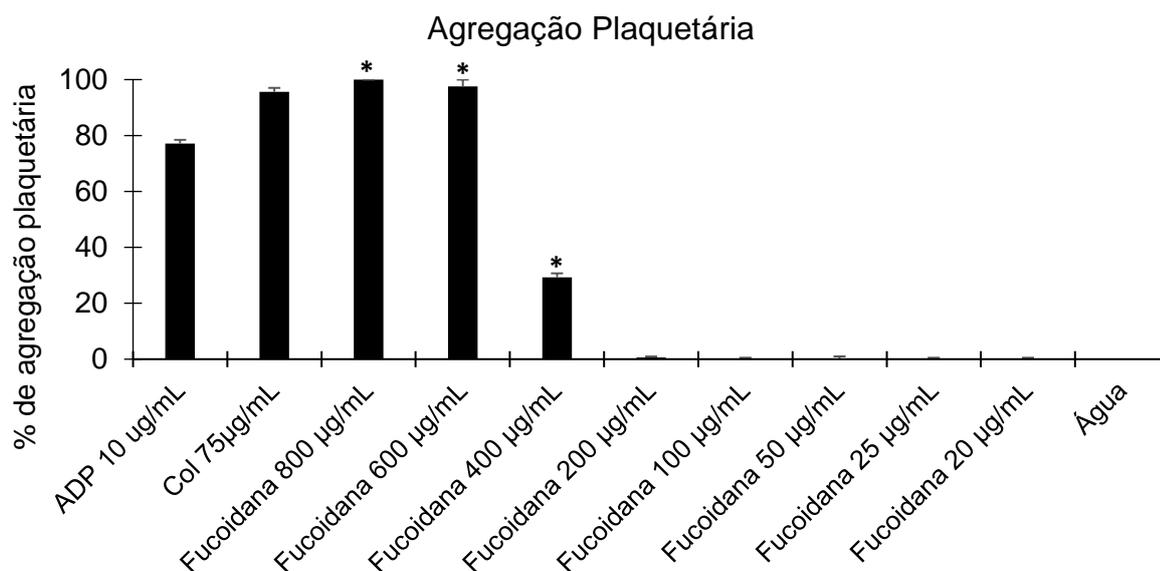
**Abreviaturas:** MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M; MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina.

### 5.9.2 Ensaios de agregação plaquetária *in vitro*

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

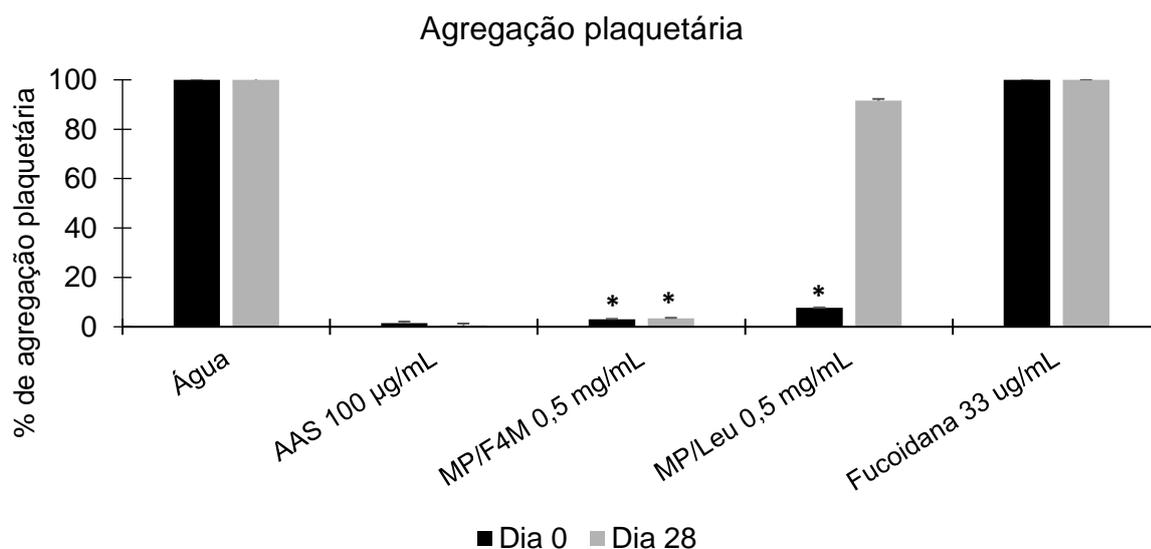
Através da análise dos resultados apresentados na **Figura 47**, é possível perceber que a fucoidana na concentração de 400 µg/mL exibe atividade agregante plaquetária, podendo ser definida como um agonista plaquetário.

Os ensaios de agregação plaquetária *in vitro* utilizando as formulações MP/F4M e MP/Leu (0,5 mg/mL) foram realizados (concentração de AAS e fucoidana no sistema iguais a 100 µg/mL e 33 µg/mL, respectivamente), utilizando o ácido araquidônico (ARA - 500 µM) como agonista plaquetário devido sua interação com o mesmo sítio de ligação do AAS. Os resultados demonstraram atividade antiagregante plaquetária para ambas as formulações MP/F4M e MP/Leu (3,08 ± 0,14 % e 7,69 ± 0,14 % de agregação plaquetária, respectivamente) (**Figura 48**).



**Figura 47** – Avaliação da atividade pró-agregante plaquetária da fucoïdana em diversas concentrações através do ensaio de agregação plaquetária e \* =  $p < 0,05$ .

A fim de corroborar com os achados anteriores sobre a estabilidade do fármaco nas formulações, os ensaios foram repetidos após 28 dias, onde não foi detectada atividade antiagregante plaquetária para a formulação MP/Leu ( $91,56 \pm 0,71$  % de agregação plaquetária), diferente do observado para a MP/F4M ( $3,40 \pm 0,24$  % de agregação plaquetária). Por fim, a fucoïdana foi analisada utilizando a mesma concentração presente nas formulações ( $33 \mu\text{g/mL}$ ), a qual, não exibiu atividade antiagregante plaquetária (**Figura 48**).

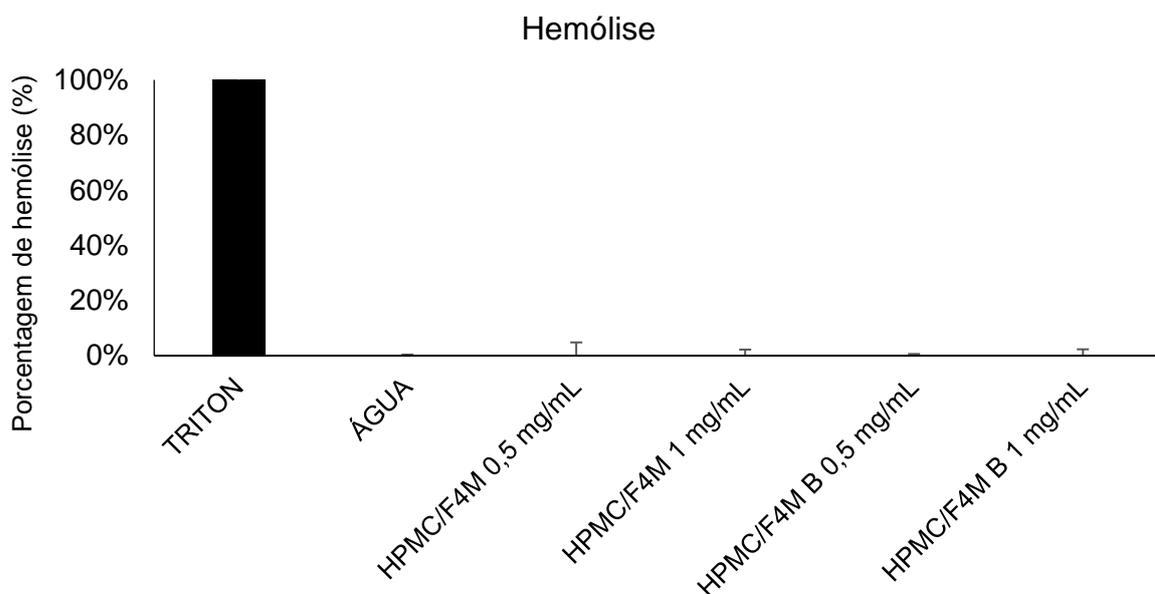


**Figura 48** – Avaliação da atividade antiagregante plaquetária das formulações MP/F4M e MP/Leu através do ensaio de agregação plaquetária e \* =  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/Leu = Formulação de micropartículas contendo L-Leucina.

### 5.9.3 Avaliação da atividade hemolítica *in vitro*

Nenhuma das concentrações da formulação HPMC/F4M utilizadas (0,5 e 1 mg/mL) apresentou atividade hemolítica, assim como a formulação branca (HPMC/F4M B), corroborando com o caráter biocompatível do fármaco e dos componentes da formulação (**Figura 49**).



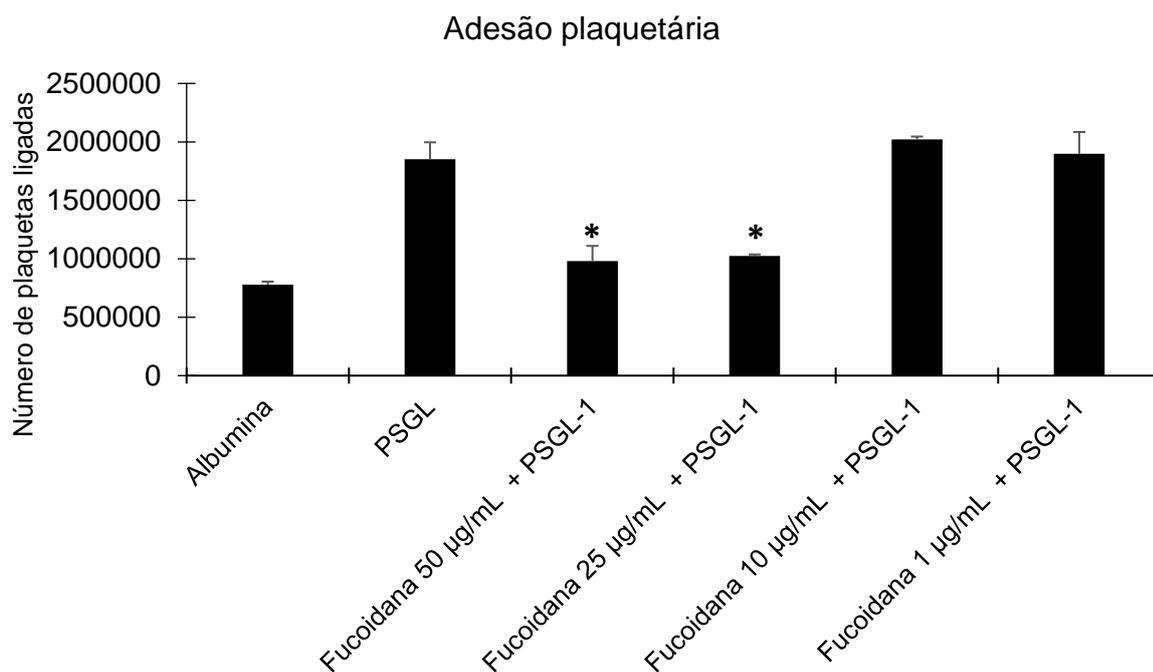
**Figura 49** - Avaliação da atividade hemolítica *in vitro* das formulações MP/F4M e MP/F4M B \* =  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/F4M B. Formulação branca

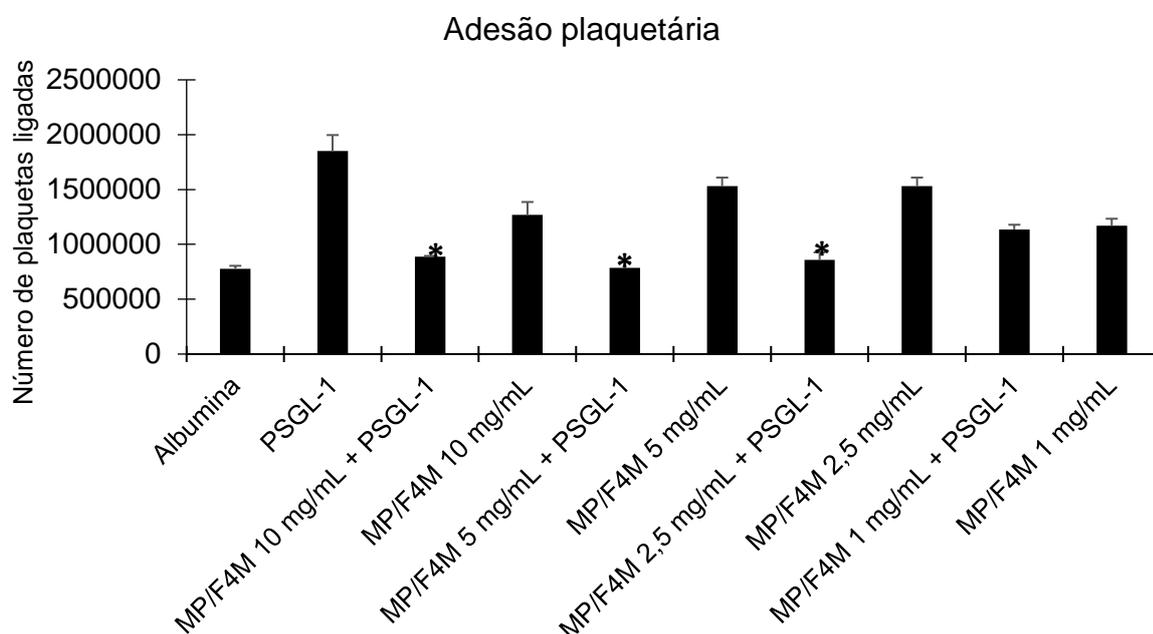
### 5.9.4 Ensaio de adesão plaquetária *in vitro*

Para os ensaios de adesão plaquetária *in vitro*, a fucoidana inibiu a ligação das plaquetas à proteína recombinante, conforme observado na **Figura 50**. Duas concentrações apresentaram interação competitiva com a P-selectina das plaquetas ativadas (50  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$ ), observando resultados semelhantes ao controle negativo albumina. Concentrações abaixo de 25  $\mu\text{g/mL}$  (10 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ) não apresentaram impedimento da ligação das plaquetas (**Figura 50**).

Em relação à formulação MP/F4M, foi possível notar que a formulação sem PSGL-1 aumentou o número de plaquetas ligadas e quando comparado ao conjunto MP/F4M e PSGL-1, houve inibição da adesão plaquetária para as concentrações 10, 5 e 2,5 mg/mL, corroborando o fato da competição da fucoidana e da PSGL-1 por P-selectina de plaquetas ativadas (**Figura 51**).



**Figura 50** - Avaliação da ligação das plaquetas com diferentes concentrações de fucoidana com proteína recombinante PSGL através do ensaio de adesão plaquetária *in vitro*. \* =  $p < 0,05$ .



**Figura 51** – Avaliação da ligação das plaquetas com diferentes concentrações da formulação MP/F4M com e sem proteína recombinante PSGL através do ensaio de adesão plaquetária *in vitro*. \* =  $p < 0,05$ .

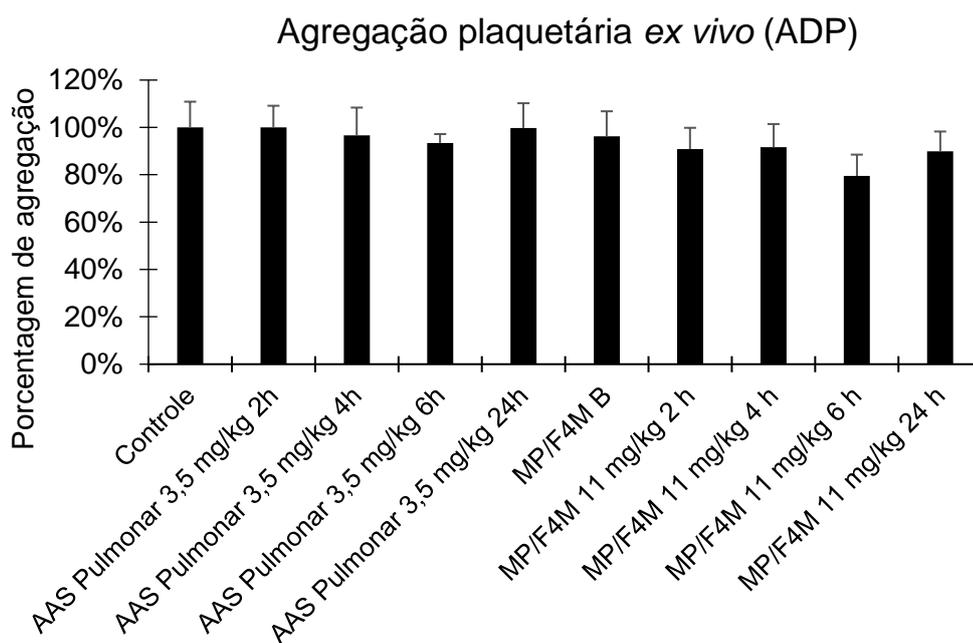
## 5.10 ENSAIOS *IN VIVO* E *EX VIVO*

### 5.10.1 Avaliação do potencial antiagregante plaquetário *ex vivo*

Diante dos resultados, foi possível perceber que não houve alteração significativa na agregação plaquetária induzida por ADP para o controle (2 mL de ar), formulação branca (MP/F4M B) e AAS (3,5 mg/kg). De forma interessante, houve modificação na agregação plaquetária dos grupos que foram tratados com a formulação MP/F4M (11 mg/kg) após 6 horas (agregação de  $79 \pm 9$  %) (**Figura 52**).

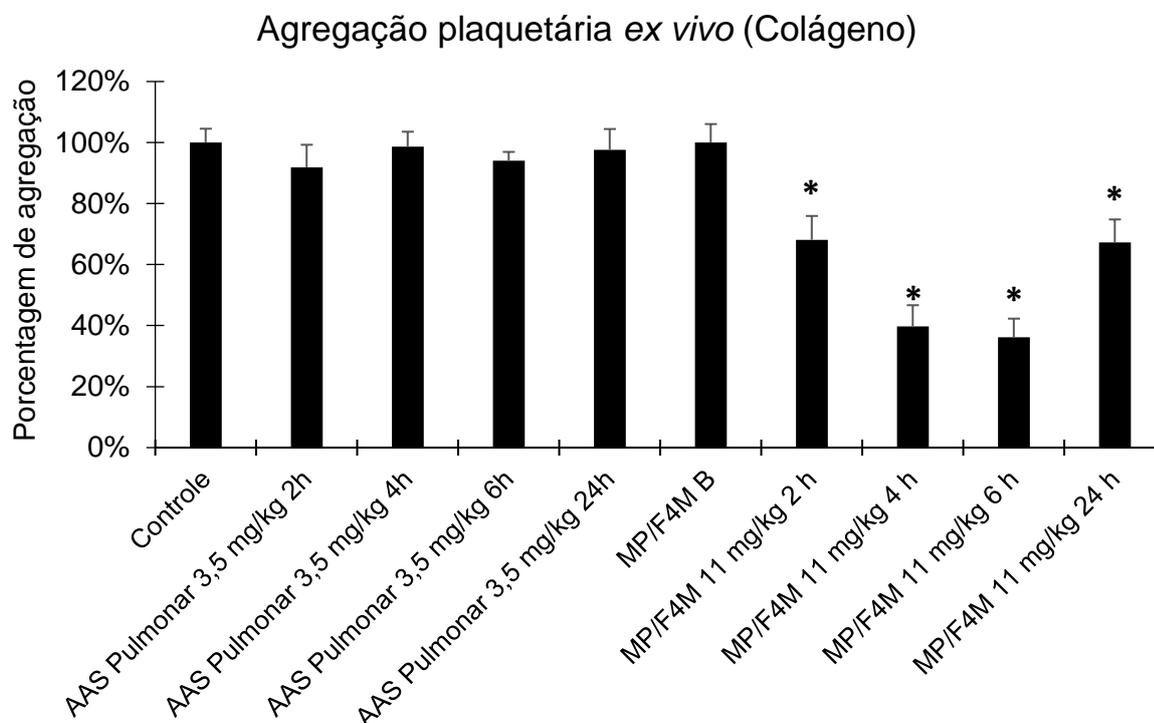
Além disso, os resultados apresentaram-se mais acentuados na agregação plaquetária induzida por colágeno. A concentração de AAS (3,5 mg/kg) não apresentou atividade em nenhum dos tempos testados e a formulação MP/F4M demonstrou maior atividade antiagregante plaquetária para os tempos 4 e 6 horas (agregação de  $40 \pm 7$  % e  $60 \pm 6$  %, respectivamente). De forma interessante, mesmo após 24 horas do tratamento único (agregação de  $68 \pm 8$  %) foi possível perceber inibição da agregação plaquetária semelhante ao início do tratamento (2 horas após administração tendo agregação de  $67 \pm 7$  %) (**Figura 53**).

Para fins de comparação, foi realizado um ensaio com grupo que recebeu AAS 3,5 mg/kg por gavagem com coleta após 6 horas, apresentando resultados de agregação de  $71 \pm 4$  % para agregação induzida por colágeno e agregação de  $78 \pm 2$  % induzida por ADP (**dados não mostrados**).



**Figura 52** – Avaliação da atividade antiagregante plaquetária *ex vivo* do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando como agonista plaquetária o ADP. \* =  $p < 0,05$

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/F4M B. Formulação branca



**Figura 53** – Avaliação da atividade antiagregante plaquetária *ex vivo* do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando como agonista plaquetário o colágeno. \* =  $p < 0,05$

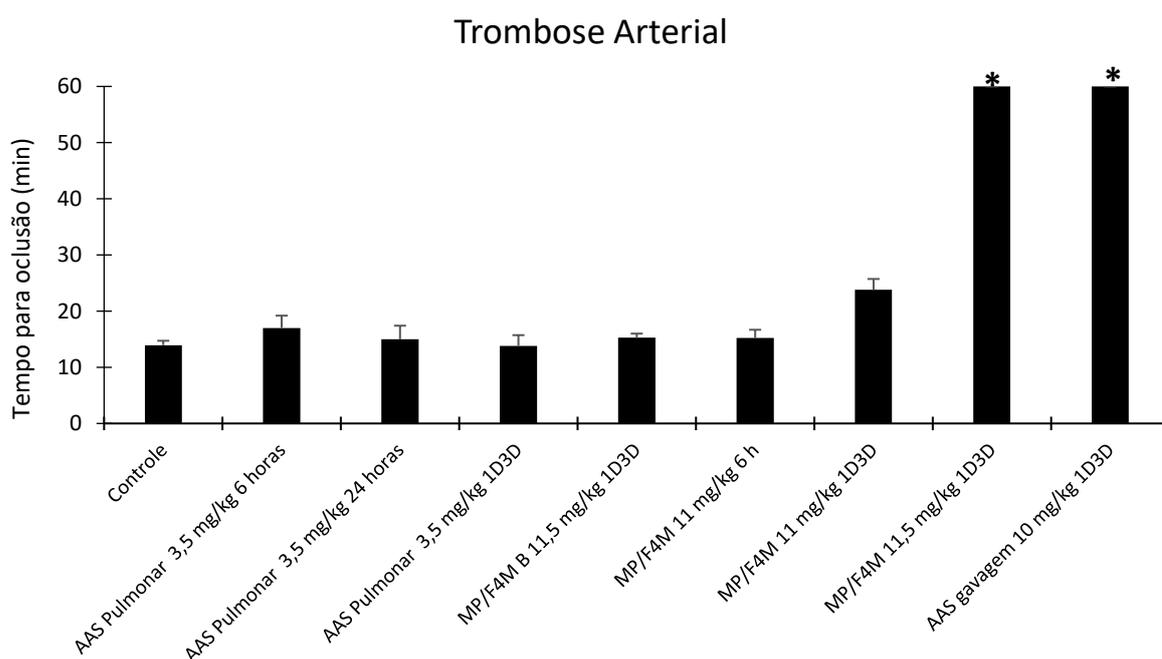
**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/F4M B. Formulação branca

### 5.10.2 Avaliação do perfil antitrombótico *in vivo* através do ensaio de trombose arterial induzida por cloreto férrico

Com os achados do ensaio anterior, foram realizados ensaios com o melhor tempo (6 horas). Como observado na **Figura 54**, os grupos AAS pulmonar 3,5 mg/kg 6 horas, MP/F4M B e MP/F4M 11 mg/kg 6 horas, não apresentaram aumento do tempo para oclusão.

Então, com o intuito de investigar se a dose administrada em tratamento prolongado poderia aumentar o tempo de oclusão, foram realizados ensaios com uma administração por dia, durante três dias (1D3D – abreviado 1Dose por dia, durante 3Dias), totalizando três administrações.

De forma interessante, houve um discreto aumento para a formulação MP/F4M 11 mg/kg 1D3D e o aumento da dose administrada (de 11 mg/kg para 11,5 mg/kg) evidenciou não-occlusão, comparável com o grupo que recebeu 10 mg/kg de AAS por gavagem 1D3D, corroborando com o perfil antitrombótico da formulação (**Figura 54**). Como o AAS gavagem 3,5 mg/kg não apresentou atividade (**dados não mostrados**), optamos por utilizar uma alta concentração presente na literatura (10 mg/kg, aproximadamente 3 vezes a concentração na formulação).



**Figura 54** – Avaliação do perfil antitrombótico *in vivo* do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M nos tempos 6, 24 e 72 horas através da trombose arterial. \* =  $p < 0,05$

**Abreviaturas:** 1D3D = uma dose por dia, durante três dias, totalizando três doses; AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/F4M B. Formulação branca

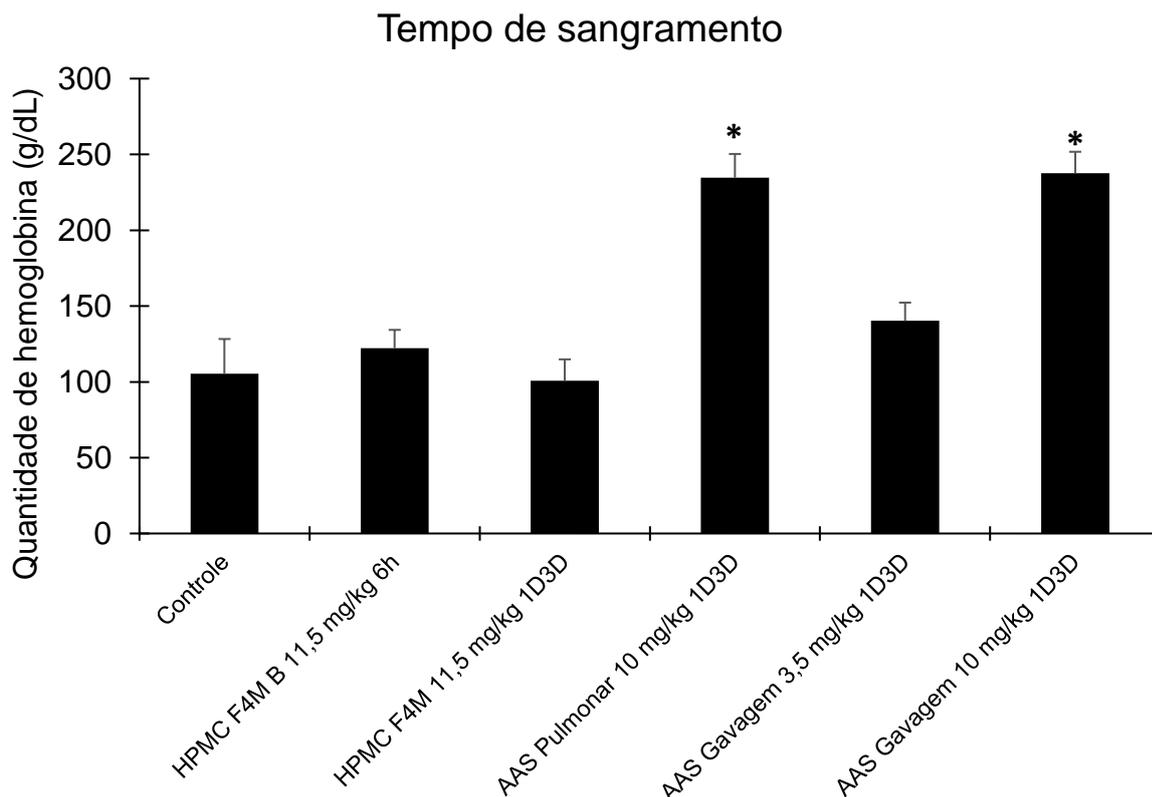
### 5.10.3 Avaliação do potencial hemorrágico *in vivo* através do tempo de sangramento

Afim de refletir o melhor resultado na trombose arterial, foi definida uma administração por dia, durante três dias (1D3D), totalizando três administrações.

Com isso, nos resultados para o tempo de sangramento no período de 30 minutos, percebemos que a formulação MP/F4M (11,5 mg/kg), a qual, apresentou atividade antitrombótica *in vivo*, não apresentou diferenças na quantidade de hemoglobina quando comparada ao controle, assim como a formulação branca sem

fármaco MP/F4M B 11,5 mg/kg e também a 3,5 mg/kg de AAS por gavagem (**Figura 55**).

De forma interessante, o AAS pulmonar e AAS por gavagem em alta concentração (10 mg/kg) aumentaram a quantidade de hemoglobina perdida em aproximadamente 2,5 vezes (243 g/dL e 237 g/dL, respectivamente versus 105 g/dL do controle) (**Figura 55**).



**Figura 55** – Avaliação do perfil antitrombótico *in vivo* do fármaco livre (AAS) e das formulações MP/F4M B e MP/F4M através do tempo de sangramento no tempo de 6 horas ou 72 horas \* =  $p < 0,05$

**Abreviaturas:** 1D3D = uma dose por dia, durante três dias, totalizando três doses  
AAS = ácido acetilsalicílico; MP/F4M = Formulação de micropartículas contendo HPMC F4M e MP/F4M B. Formulação branca

#### 5.10.4 Análise histopatológica

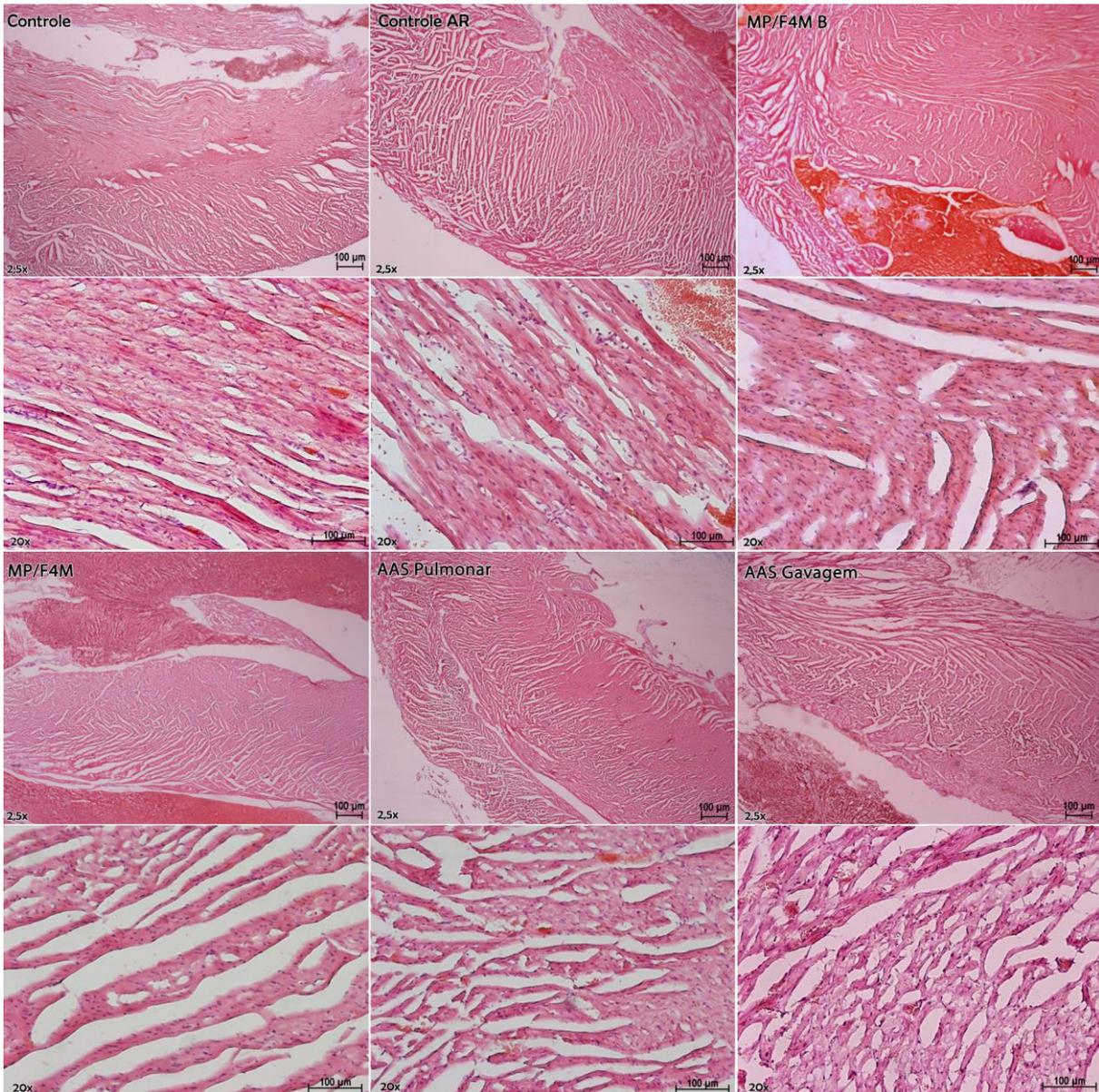
Por fim, foram observados o pulmão, coração, fígado, rim, estômago e intestino delgado dos animais provenientes do ensaio do tempo de sangramento.

Foi observada a estrutura de cada órgão, considerando a sua arquitetura (cardiomiócitos para o coração; hepatócitos para o fígado; glomérulos renais para o rim; vilosidades para estômago e intestino delgado e alvéolos e espaços alveolares para o pulmão). Adicionalmente, foram analisados quanto a presença de hemorragias,

hiperemia, inflamação ou qualquer outro quadro que modificasse a estrutura do órgão, em menor e maior aumento. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias (1D3D).

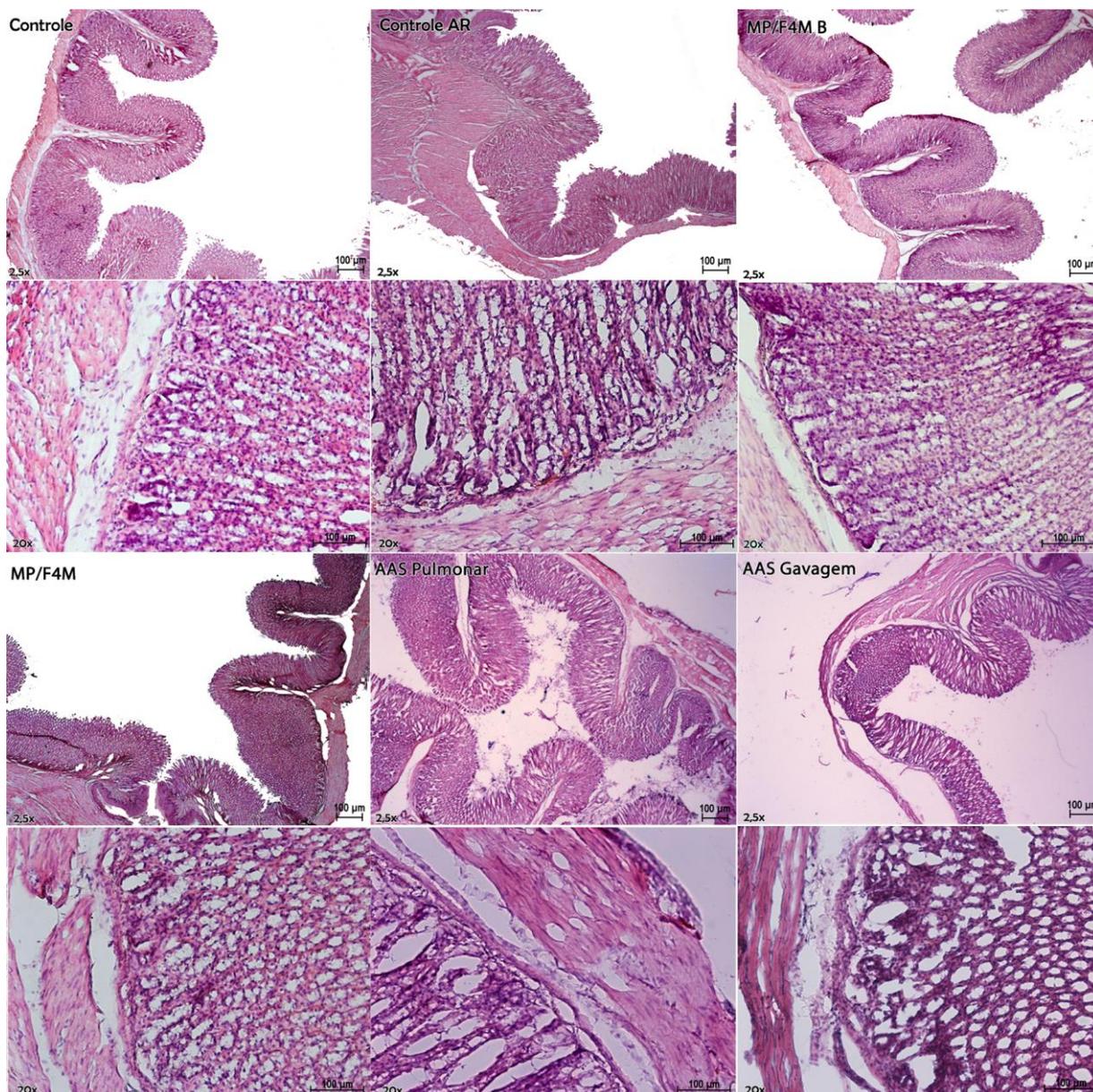
Não foram observadas modificações estruturais no coração (**Figura 56**); estômago (**Figura 57**); intestino delgado (**Figura 58**); fígado (**Figura 59**); rim (**Figura 60**).

Em relação ao pulmão, os grupos controle (sem insuflação de ar e AR), MP/F4M B, MP/F4M e AAS Gavagem não apresentaram modificações estruturais, hemorragias, hiperemia ou inflamação (**Figura 61**). Para o grupo AAS Pulmonar, foi possível perceber locais com discreta inflamação (**Figura 62**). No entanto, é importante ressaltar que a grande quantidade de AAS administrado (10 mg/kg) pela via pulmonar não apresenta estudos na literatura e, podem ocasionar danos severos na arquitetura pulmonar. Considerando um animal do grupo AAS pulmonar (10 mg/kg) que morreu, o mesmo apresentou dificuldade para respirar logo após a última administração (terceira administração, no terceiro dia). Na análise do pulmão deste animal (**Figura 62 – AAS Pulmonar 02**), foi possível observar locais de inflamação, provavelmente associados à grande quantidade de fármaco administrado (**Figura 62**).

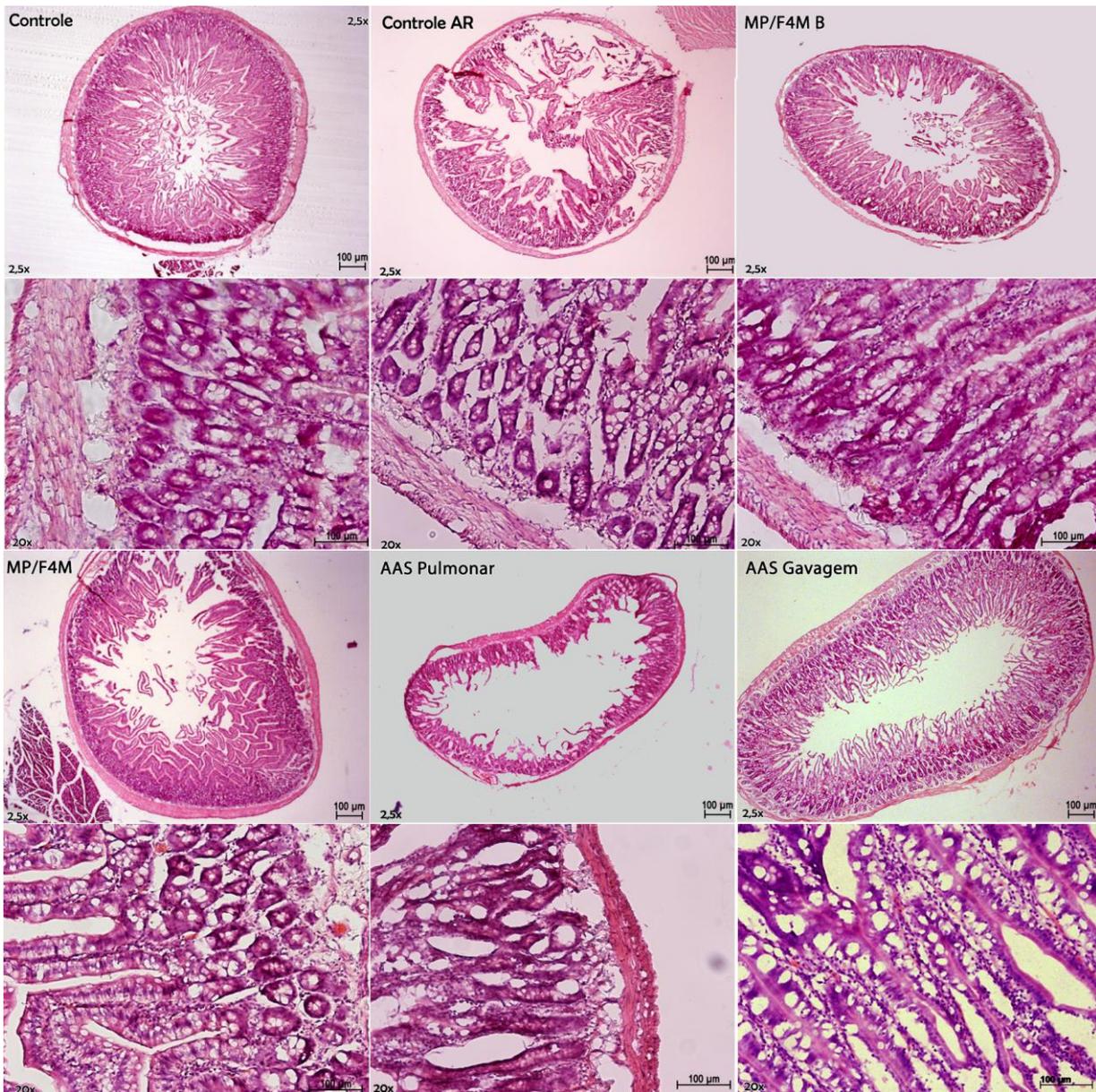


**Figura 56** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do coração dos animais provenientes do tempo de sangramento, evidenciando cardiomiócitos e fibras musculares com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

**Abreviaturas:** Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar; MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar; AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.

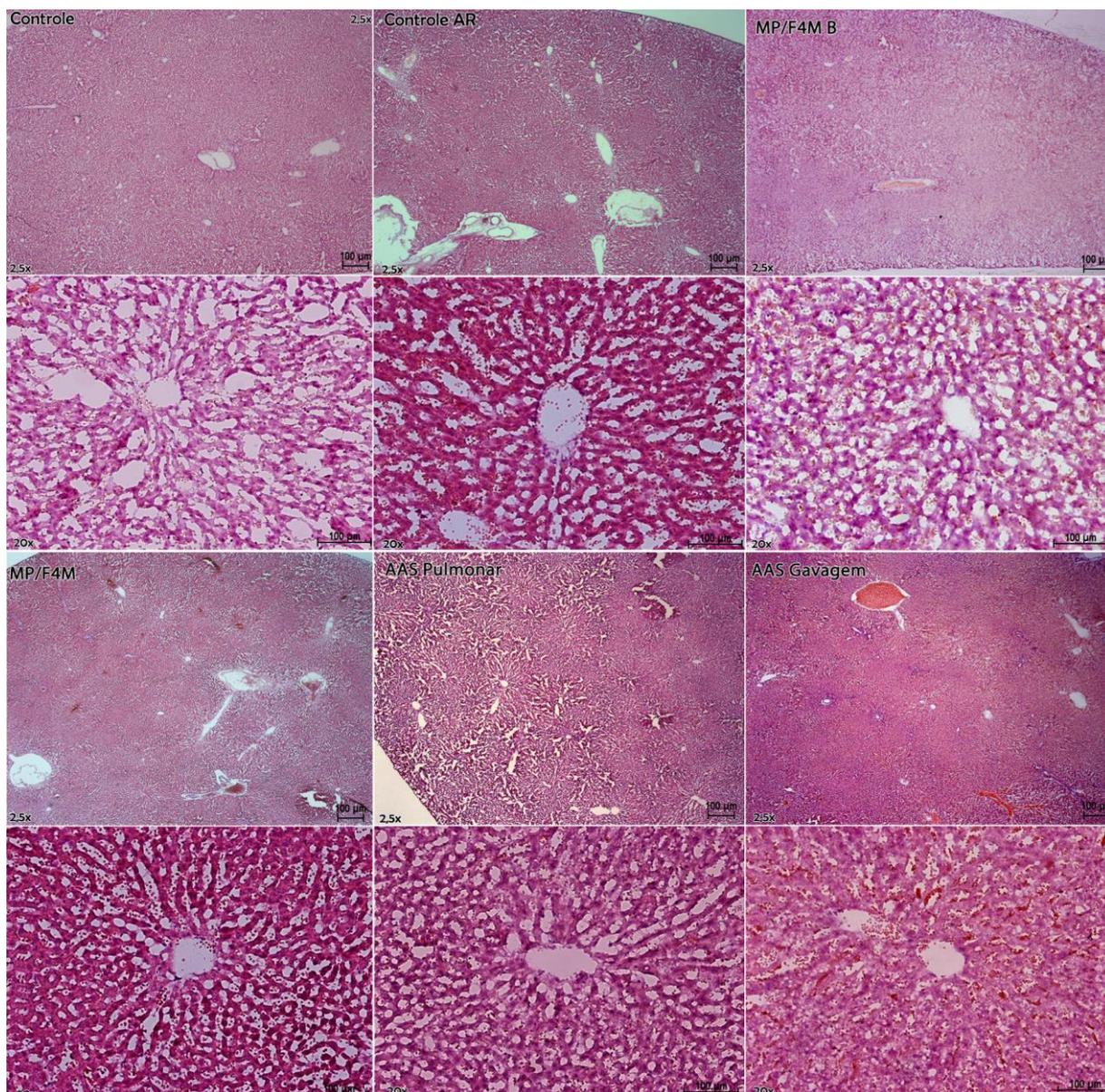


**Figura 57** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do estômago dos animais provenientes do tempo de sangramento, evidenciando as vilosidades com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local. **Abreviaturas:** Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar; MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar; AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.



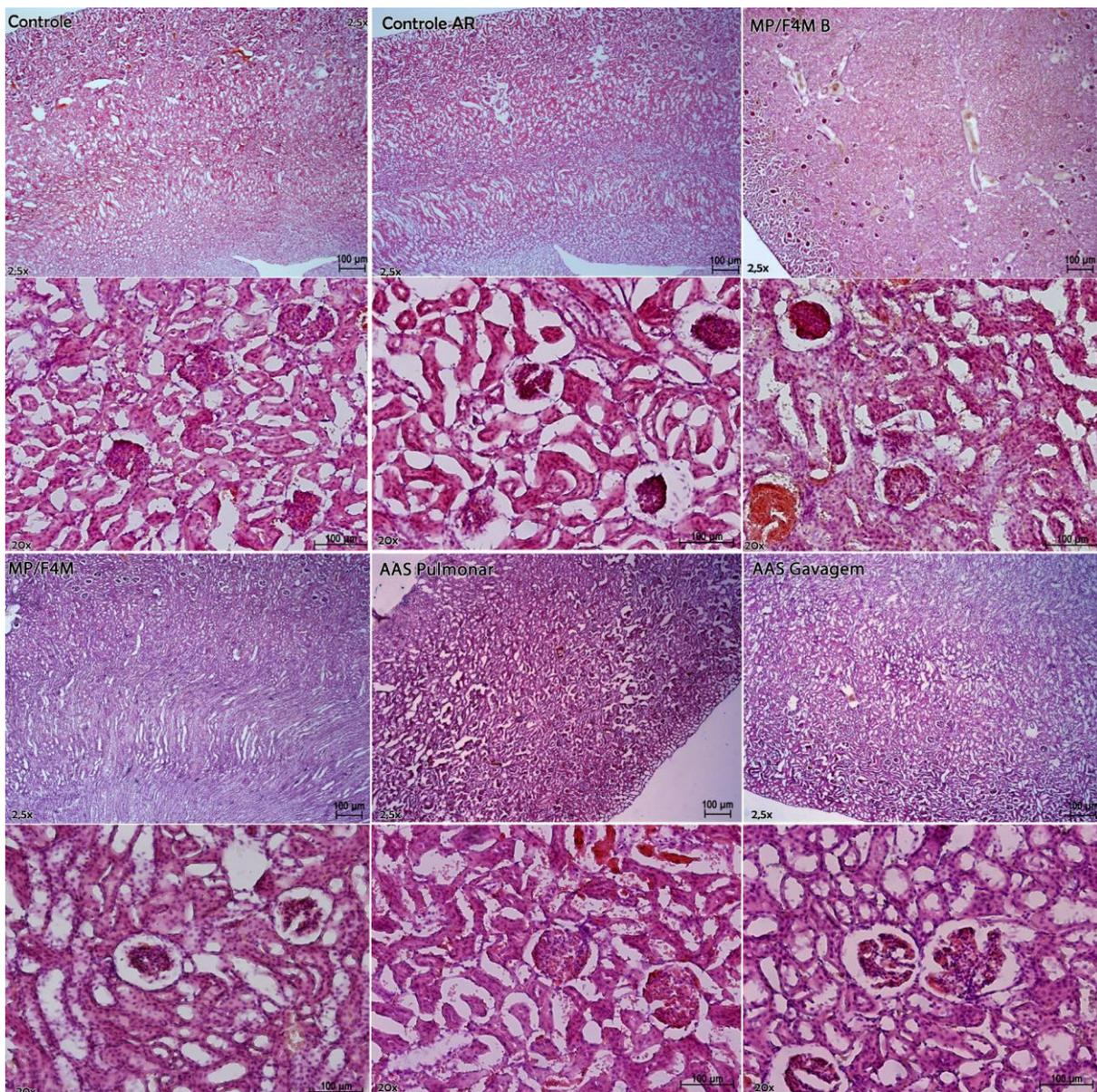
**Figura 58** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do intestino dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

**Abreviaturas:** Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar; MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar; AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.



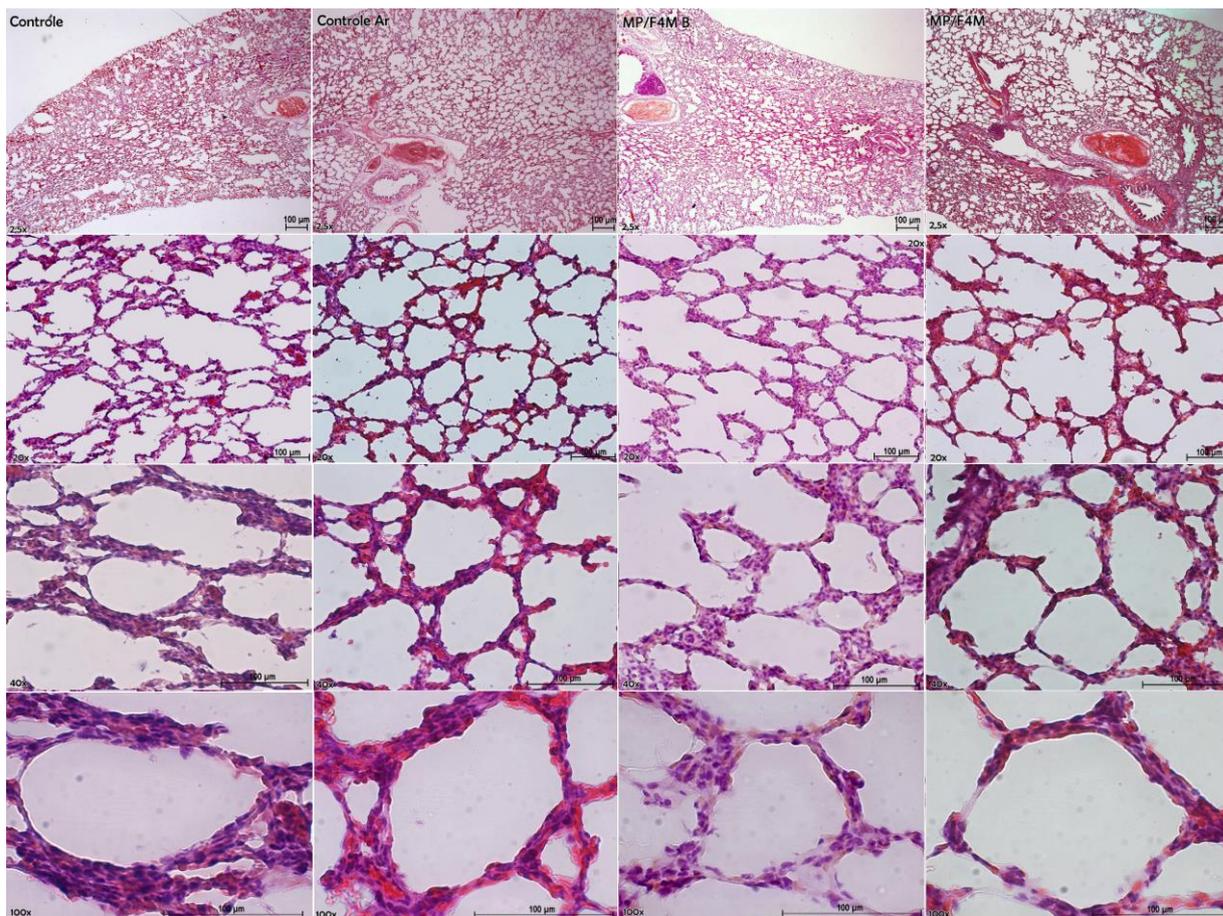
**Figura 59** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do fígado dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura, presença da tríade portal e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

**Abreviaturas:** Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar; MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar; AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.



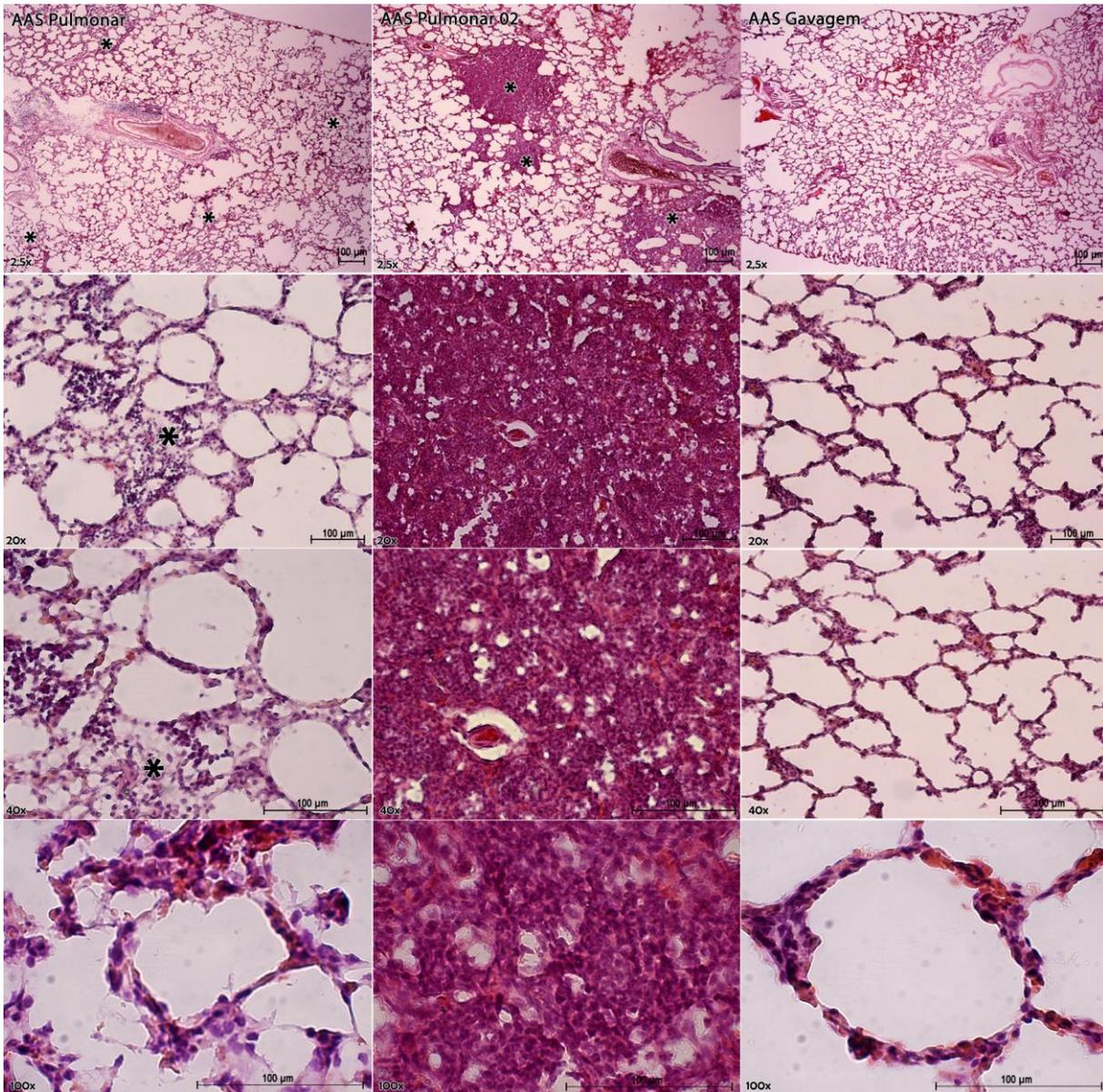
**Figura 60** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do rim dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos glomérulos renais e espaços glomerulares, com ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

**Abreviaturas:** Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar; MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar; AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.



**Figura 61** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos alvéolos e espaços alveolares e ausência de hiperemia, hemorragia ou inflamação no local.

**Abreviaturas:** Controle = Animal sem nenhum procedimento além do tempo de sangramento; Controle AR = Insuflação de 5 mL de ar; MP/F4M B = Administração de 11,5 mg/kg da Formulação branca pela via pulmonar e MP/F4M = Administração de 11,5 mg/kg da formulação de micropartículas contendo HPMC F4M pela via pulmonar. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.



**Figura 62** – Fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão dos animais provenientes do tempo de sangramento, com manutenção da estrutura dos alvéolos e espaços alveolares e ausência de hiperemia e hemorragia. (\*) = locais de espessamento do septo alveolar com presença de células inflamatórias (fibroblastos, macrófagos ou neutrófilos).

**Abreviaturas:** AAS Pulmonar = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar; AAS Pulmonar 2 = Administração de 10 mg/kg de AAS pela via pulmonar, com morte do animal no terceiro dia após administração e AAS Gavagem = Administração de 10 mg/kg de AAS por gavagem. Todos os ensaios foram realizados de forma crônica, com uma dose por dia, durante três dias.



## 6. DISCUSSÃO

---



## 6 DISCUSSÃO

Segundo a OMS, as doenças cardiovasculares são a maior causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo, destacando-se a trombose venosa e a trombose arterial, estimando os custos de atenção médica (remédios, médicos e cuidados hospitalares) com aumento de 500 bilhões até 2030 (OMS, 2018; (BENJAMIN *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2016; GROENEWEGEN *et al.*, 2016; PIEPOLI *et al.*, 2016; WILKINS *et al.*, 2017).

Atualmente, existem diversos fármacos antitrombóticos disponíveis no mercado para o tratamento desses quadros patológicos, podendo-se citar o AAS, o clopidogrel e o ticagrelor em terapia única ou conjunta (AWTRY & LOSCALZO, 2000; CURTIN, COX, FITZGERALD, 2002; KOLBER & KOROWNYK, 2014; SHAH *et al.*, 2014). Contudo, a grande problemática das abordagens terapêuticas atuais são as limitações em seu uso e efeitos adversos variados tais como, neutropenia, anemia aplásica, trombocitopenia e principalmente as hemorragias (ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014; SHAH *et al.*, 2014; CHAU *et al.*, 2017; LUNI *et al.*, 2017). Adicionalmente, diversos estudos relatam desistência do tratamento devido à essas complicações, mesmo em formulações revestidas, com impacto direto na ocorrência / recorrência das doenças cardiovasculares (AL-GOUSOUS & LANGGUTH, 2018; BLIDEN *et al.*, 2016; HEDBERG *et al.*, 2013; MARTÍN-MERINO *et al.*, 2014; SHAH *et al.*, 2014).

Com isso, evidencia-se a necessidade de novos protótipos medicamentosos que possam auxiliar na determinação de novas terapias de menor risco, maior eficiência e aceitação do paciente (AL-GOUSOUS & LANGGUTH, 2018; BARON, KAMATH, MCBANE, 2014; CHAPMAN & YUEN, 2014), como formulações para administradas pela via pulmonar.

A via pulmonar tem sido bastante estudada devido suas vantagens frente a vias mais comuns (oral e intravenosa), podendo ser citados: a grande vascularização tecidual (5 L/min); ampla área superficial alveolar (aproximadamente 100 m<sup>2</sup>); reduzido do efeito de primeira passagem; fina barreira epitelial (50 - 60 µm na traqueia e diminui até aproximadamente 0,2 µm no alvéolo); maior biodisponibilidade dos fármacos; facilidade de aceitação do paciente ao tratamento devido à diminuição de efeitos colaterais e possibilidade de diminuição das doses em tratamentos

prolongados (DAEAR, LAI, PRENNER, 2018; GILL *et al.*, 2007; MINZ & PANDEY, 2018; MORALES-BURGOS *et al.*, 2018; MORÇÖL *et al.*, 2018; NAZAR, 2018).

O presente trabalho combina dados disponíveis na literatura conforme exposto anteriormente, para propor um novo sistema para administração pulmonar contendo um polissacarídeo natural (fucoidana), um antitrombótico clássico (ácido acetilsalicílico – AAS) e um dos três adjuvantes de secagem expostos (HPMC, quitosana e L-Leucina).

Inicialmente, foram desenvolvidas micropartículas contendo polaxamer 188, com características não-iônicas, visto que diversos estudos na literatura o utilizaram para a via pulmonar, como visto por Steckel & Brandes (2004); Jaspert e colaboradores (2007) e Platakis e colaboradores (2011) (JASPART *et al.*, 2007; PLATAKI *et al.*, 2011; STECKEL & BRANDES, 2004). Já o deoxicolato de sódio ou cloreto de benzalcônio foram utilizados devido suas características aniônicas e catiônicas, respectivamente, que poderiam influenciar no processo de secagem das formulações e conseqüentemente, no rendimento deste processo. Por fim, a L-Lisina, um aminoácido de natureza catiônica, foi utilizada com o intuito de formar um complexo através da sua interação com o AAS e com a fucoidana.

Entretanto, devido à resultados insatisfatórios utilizando polaxamer 188, deoxicolato de sódio e cloreto de benzalcônio, ensaios com diferentes adjuvantes de secagem foram realizados. Foram analisados o Methocel® F4M (hidroxipropilmetilcelulose – HPMC), um polímero inerte, biocompatível, promotor de liberação prolongada e de bioadesão (DAVIS, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2017; ZATTA *et al.*, 2018) e a L-Leucina, um aminoácido apolar, biocompatível, capaz de modificar a tensão superficial de micropartículas e melhorar as propriedades aerodinâmicas de aerossóis (LI *et al.*, 2017b; MANGAL *et al.*, 2018; NAJAFABADI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de pós respiráveis a partir desses sistemas foi realizado com sucesso (MP/F4M; MP/Leu e MP/Ch), obtendo-se micropartículas sem atividade anticoagulante e potente atividade antitrombótica, alguns com disposição semelhante aos relatados na literatura (ISHIKAWA *et al.*, 2000; NAJAFABADI *et al.*, 2004; BACHELET *et al.*, 2009; ALE, MIKKELSEN, MEYER, 2011b; HUANG & LAM, 2011; HEDBERG *et al.*, 2013).

Ainda, foram realizados diversos experimentos até a determinação dos constituintes das formulações considerando as características únicas de cada um para

formação de uma micropartícula com propriedades físico-químicas e parâmetros aerodinâmicos importantes para a via pulmonar.

Inicialmente, a escolha do AAS e da fucoidana teve por objetivo a obtenção de pós com atividade antitrombótica expressiva e direcionamento para locais mais prováveis de desenvolverem quadros trombóticos (alta expressão de P-selectina).

Como descrito por McEver (2015) e Prakash e colaboradores (2017), a P-selectina está diretamente relacionada com endotélio lesionado e é expressa nas plaquetas ativadas, auxiliando no desenvolvimento de eventos trombóticos (MCEVER, 2015; PRAKASH, NAYAK, CHAUHAN, 2017). Com o intuito de direcionar a formulação para estes locais, foi utilizada a fucoidana extraída da espécie *Ascophyllum nodosum*.

Conforme Bachelet e colaboradores (2009) e Cumashi e colaboradores (2007), essa fucoidana apresenta uma discreta atividade anticoagulante quando comparada à heparina ou a fucoidana extraída da alga marrom *Fucus vesiculosus* (disponível comercialmente), com alta seletividade para P-selectina, sendo biodegradável e biocompatível, além de já ser utilizada em dietas nutricionais, justificando a seleção desse produto natural como constituinte da formulação (BACHELET *et al.*, 2009; CUMASHI *et al.*, 2007; FOLEY *et al.*, 2011).

Como principal fármaco antitrombótico, foi escolhido o ácido acetilsalicílico (AAS), um dos antiagregantes plaquetários mais antigos e, conseqüentemente, um dos poucos com estudos de toxicidade a longo prazo. Para fins de curiosidade, o AAS foi inicialmente comercializado denominado de aspirina® pela Bayer® em 1899, estando ainda disponível no mercado atualmente, sendo listado pela organização mundial de saúde (OMS) como medicamento essencial, devido sua segurança e eficácia (AWTRY & LOSCALZO, 2000; CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; CLELAND, 2002; GARCÍA RODRÍGUEZ, HERNÁNDEZ-DÍAZ, DE ABAJO, 2001; GOLDSTEIN *et al.*, 2016; HAYDEN *et al.*, 2002; ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014; JEFFREYS, 2008; OMS, 2018).

Sua maior problemática relaciona-se diretamente com a administração por via oral, já que pacientes com úlceras, gastrites e outros problemas gastrointestinais precisam de acompanhamento médico ou utilização de medicamentos mucoprotetores em conjunto, como o omeprazol (IVEY, PAONE, KRAUSE, 1980; CRYER & FELDMAN, 1999; ALTMAN, RIVAS, GONZALEZ, 2012; DE BERARDIS G

*et al.*, 2012; SEO *et al.*, 2012; AZOULAY *et al.*, 2013; BASSAND, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

De forma interessante, Sørensen e colaboradores (2000) realizaram um estudo de coorte sobre a utilização de AAS com e sem revestimento em baixas doses (100 ou 150 mg), expondo que o revestimento não foi eficaz e a incidência de quadros hemorrágicos foi ligeiramente maior, corroborando estudos de Kelly e colaboradores (1996), o qual evidenciou um aumento do risco hemorrágico em pacientes que fizeram uso do AAS revestido ou tamponado (KELLY *et al.*, 1996; SØRENSEN *et al.*, 2011). Com isso, percebe-se a importância do desenvolvimento de uma formulação capaz de superar esses efeitos adversos, em consonância com o objetivo do trabalho.

Esses quadros hemorrágicos são a grande limitação associada ao tratamento e/ou prevenção de eventos trombóticos em pacientes que utilizam AAS, levando a diversas sociedades regularem sua utilização (*American Heart/Stroke Association; American College of Chest Physicians, European Society of Cardiology e Canadian Cardiovascular Society*) (CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; ITTAMAN, VANWORMER, REZKALLA, 2014).

Recentemente, Bais e colaboradores (2016) desenvolveram uma formulação de AAS micronizada associada a lactose monohidratada pelo método de precipitação, relatando apenas as características físico-químicas passíveis de serem utilizadas para a via pulmonar, sem estudos de sua atividade *in vitro* ou *in vivo* (BAIS *et al.*, 2016) e a patente de Yadidi (2014) teve como mérito a descrição de inaladores de pós secos e AAS, sem demonstrar resultados para esta via ou para esta formulação (YADIDI, 2014), de forma diferente do presente trabalho, o qual, apresenta resultados *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Em 2017, Lefrançais e colaboradores publicaram um artigo inédito evidenciando que os pulmões são os locais mais importantes de biogênese das plaquetas, refutando que a medula óssea era o principal órgão de produção. Logo, além da via pulmonar ser um local de acesso para fármacos antitrombóticos conseguirem atingir a via sistêmica, a inibição das plaquetas no pulmão pode ser uma terapia de grande valor (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017), evidenciando a importância da via escolhida. Considerando o exposto, é interessante o desenvolvimento de uma formulação contendo AAS para via pulmonar com distribuição sistêmica direcionada sem ocasionar lesões gástricas, conforme premissa desta tese.

A L-lisina, presente nas formulações MP/F4M e MP/Leu foi selecionada devido a necessidade de um mediador biocompatível e biodegradável para interagir com os grupamentos iônicos do AAS e fucoidana. Conforme descrito por Morton e colaboradores (2017); Fayon e colaboradores (2016) e Copeland e colaboradores (2015) já existem formulações utilizando lisina para via pulmonar aprovados pelo FDA, como o aztreonam lisina (AZLI; Cayston®, Gilead Pharmaceuticals®, USA) para tratamento de fibrose cística causada por bactérias (COPELAND *et al.*, 2015; FAYON *et al.*, 2016; MORTON *et al.*, 2017).

Estudos pioneiros, como de Christie e colaboradores (1992), assim como de Vargas e colaboradores (1992) já haviam relatado a utilização de lisina conjugada ao AAS (Lisina - Aspirina) por via pulmonar para diagnóstico de pacientes com hipersensibilidade ao AAS (asma induzida por AAS). Embora a asma induzida por este fármaco seja um limitante para a via pulmonar, a literatura descreve que mesmo pela via oral, pacientes com hipersensibilidade ao AAS podem desenvolver asma e não é recomendável a utilização deste medicamento, sendo necessária atenção para pacientes que desconhecem a hipersensibilidade (KOWALSKI, 2016; PATEL, WICKEMEYER, SEKHSARIA, 2015; RAJAN *et al.*, 2015; ŚWIERCZYŃSKA-KRĘPA *et al.*, 2014).

Em relação às micropartículas contendo L-leucina como adjuvante de secagem (MP/Leu), a mesma foi escolhida após extensa pesquisa na literatura. Um dos trabalhos mais importantes para a escolha deste foi o de Najafabadi e colaboradores (2004), que revelaram a capacidade da leucina seca por aspersão em formar partículas ocas de baixa densidade para encapsulação de fármacos e liberação pulmonar (NAJAFABADI *et al.*, 2004).

Outros estudos demonstraram a eficácia deste adjuvante em conjunto com diversos fármacos, como Li e colaboradores (2017) que constataram que a L-Leucina conseguia manter o sulfato de salbutamol seco por aspersão com menor teor de umidade quando comparado ao fármaco livre, ocasionando degradação mais lenta do fármaco (LI *et al.*, 2017), auxiliando então na diminuição da hidrólise do AAS; Mangal e colaboradores (2018) que desenvolveram formulações secas por aspersão utilizando azitromicina em conjunto, com resultados satisfatórios na performance do aerossol e um melhor perfil de dissolução quando comparados ao fármaco puro (MANGAL *et al.*, 2018) e Otake e colaboradores (2016) que concluíram que a L-

leucina é capaz de diminuir a força de adesão entre as partículas e aumentar a dispersibilidade, independente do dispositivo de inalação utilizado (OTAKE *et al.*, 2016).

Para as formulações contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como adjuvante (MP/F4M), um trabalho anterior do grupo foi utilizado como referência devido à comprovação de suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis e da constatação da capacidade deste adjuvante em formar uma matriz polimérica em uma formulação pulverulenta contendo micropartículas, levando a liberação controlada do fármaco estudado (5-fluorouracil) (ZATTA *et al.*, 2018).

Adicionalmente, Hussain e colaboradores (2011) sintetizaram o HPMC conjugado com o AAS (HPMC-ASP) como um pró-fármaco macromolecular, apresentando melhoria nos parâmetros farmacocinéticos observados (HUSSAIN *et al.*, 2011). Além disso, como o AAS é pouco solúvel em água, o trabalho de Davis (2017) descreve a capacidade deste adjuvante em melhorar a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos pela via oral, evidenciando a escolha deste polímero (DAVIS, 2017).

Finalmente, a quitosana, um polímero natural, foi selecionada devido suas características catiônicas que poderiam interagir com o fármaco e constituintes da formulação, formando então o complexo AAS-quitosana-fucoidana (MP/Ch) e também devido às suas propriedades bioadesivas e capacidade de controlar a liberação controlada de fármacos (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI, 2004; CHEN *et al.*, 2014; GARCIA-FUENTES & ALONSO, 2012). Adicionalmente, Ajun e colaboradores (2009) já haviam descrito nanopartículas de AAS e quitosana com um perfil de liberação prolongado pH dependente para tratamento da reestenose (AJUN *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos focam-se na utilização de fucoidana e quitosana, como Huang e Lam (2011) descrevendo esses dois polissacarídeos para formação de nanopartículas sensíveis ao pH para a via oral (HUANG & LAM, 2011), assim como Huang e colaboradores (2014); Murakami e colaboradores (2010) e Pinheiro e colaboradores (2015) (HUANG *et al.*, 2014; MURAKAMI *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2015).

Tendo em vista a problemática relatada em diversos estudos (BICA *et al.*, 2010; VANE & BOTTING, 2003) que corroboram com os resultados obtidos e descritos

anteriormente quanto à instabilidade do fármaco AAS em meio aquoso para as microcápsulas, o qual, é facilmente hidrolisado a ácido salicílico (AS), buscou-se minimizar tal processo pela presença de um agente anti-hidrolítico, como o propilenoglicol (MIYAKE *et al.*, 1999), tendo resultados satisfatórios e assim, utilizando-o para todas as formulações desenvolvidas.

As análises morfológicas das formulações revelaram diferentes características determinadas pelo adjuvante utilizando. Conforme descrito por Najafabadi e colaboradores (2004), a L-Leucina tem capacidade de formar micropartículas com poros centrais e superfície rugosa, corroborando com nossos resultados da análise morfológica (NAJAFABADI *et al.*, 2004). A formulação MP/F4M revelou morfologia irregular com presença de concavidades rugosas, sendo comparável com a formulação obtida por Zatta e colaboradores (2018) (ZATTA *et al.*, 2018). Por fim, a morfologia totalmente esférica e rugosa para a formulação MP/Ch apresentou-se de acordo com estudo desenvolvido por Ubaidulla e colaboradores (2007) (UBAIDULLA *et al.*, 2007).

Em seguida, através da análise de EDS, foi possível perceber pequena porcentagem de enxofre, evidenciando a presença de fucoidana nas formulações, visto que é o único constituinte que contém esse resíduo, conforme analisado por Foley e colaboradores (2011) e Ale e colaboradores (2011) (ALE, MIKKELSEN, MEYER, 2011b; FOLEY *et al.*, 2011).

Nos estudos de estabilidade, apenas a formulação MP/F4M revelou-se com baixa degradação do AAS ao longo de 28 dias, apontando diferenças nos estudos de Li e colaboradores (2017) e Ajun e colaboradores (2009), os quais desenvolveram formulações contendo AAS e L-leucina ou quitosana, respectivamente, onde não foi detectada hidrólise do AAS (AJUN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2017). A maior concentração de quitosana e a ausência de fucoidana podem estar relacionadas com os resultados obtidos nesses estudos. No entanto, a formulação mais promissora (MP/F4M) seguiu em concordância com outros estudos utilizando este polímero (DAVIS, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2017; ZATTA *et al.*, 2018), visto que um dos objetivos foi desenvolver uma formulação estável com atividade antiagregante plaquetária relevante após diversos dias.

Adicionalmente, a pureza de pico indicou ausência de impurezas na corrida analítica. Sendo assim, a perda de fármaco estaria relacionada com o método de

secagem por *spray-drying* e procedimentos de coleta do pó do equipamento, visto que a etapa de *screening* considerou todas as variáveis possíveis que poderiam estar relacionadas.

Os estudos de liberação *in vitro* utilizando cápsulas de gelatina dura para a formulação MP/F4M geraram grande discussão no grupo, pois foi observado um perfil de liberação com repetibilidade comprometida e com demora na dissolução do invólucro (cápsula). Sabe-se que essa capsula de gelatina dura não é considerada uma barreira nos ensaios de liberação (ANVISA RDC 166/17, USP <1092> e USP <711>), com dissolução de seus constituintes em até 10 minutos. Esta confirmação não foi constatada em nossos estudos, os quais, apresentaram demora na dissolução da cápsula acarretando diferentes resultados para um mesmo ensaio em condições idênticas. Além disso, a cristalinidade do AAS pode ter afetado sua liberação das cápsulas, ocasionando um falso perfil de liberação sustentada.

Levando em conta as problemáticas citadas e, de acordo com a literatura, foi observado que interações cruzadas covalentes de constituintes da formulação MP/F4M, principalmente em relação ao AAS com o material da cápsula de gelatina dura, poderiam estar interferindo nos resultados (DIGENIS, GOLD, SHAH, 1994; GOWTHAMARAJAN & SINGH, 2010; MARQUES, 2014; OFNER *et al.*, 2001; OHARA *et al.*, 2005).

Copley, Son e McConville (2010) comentam sobre a pouca regulamentação ou descrição de métodos farmacopeicos para ensaios de dissolução utilizando pós inalatórios. Os autores, considerando dados da literatura, concluíram que diversas problemáticas com fármacos hidrofóbicos ou pouco solúveis podem ocorrer, refletindo em resultados com altos desvios padrões (COPLEY, SON, MCCONVILLE, 2010), reforçando os resultados aqui demonstrados para os ensaios utilizando cápsulas de gelatina dura.

Song, Cui e Xie (2011) descreveram a interação cruzada que cápsulas de gelatina dura podem promover devido a polimerização da gelatina. Esse processo é facilitado pela exposição das cápsulas a altas temperatura e umidade, radiação visível e ultravioleta, corantes e aldeídos. Com isso, percebe-se um maior tempo de desintegração da cápsula e conseqüente lentidão na liberação do fármaco. Ainda relatam sobre especificações da USP 711, que recomenda a adição de enzimas ou

surfactantes no meio, como o lauril sulfato de sódio (do inglês SLS) (SONG, CUI, XIE, 2011).

Marchais e colaboradores (2013) de forma análoga, notaram interação cruzada entre cápsulas de gelatina dura e carbamazepina utilizando como meios de dissolução o fluido gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS). Na tentativa de reverter o quadro, enzimas foram adicionadas e observou-se que a utilização das mesmas só é justificada para interação cruzada moderada do fármaco com a cápsula. Além disso, o tensioativo lauril sulfato de sódio não exibiu resultados satisfatórios (MARCHAIS *et al.*, 2003). Nota-se então, que mesmo empregando recomendações internacionais (adição de enzimas e/ou surfactantes), o método de liberação utilizando cápsulas é muito dependente dos componentes da formulação estudada, revelando a importância da criação de um novo método que ultrapasse essas dificuldades.

Considerando estes achados, fez-se necessário desenvolver um novo método para ensaios de liberação utilizando pó coeso, dispensando utilização de cápsulas para avaliar o perfil de liberação. Com isso, foi possível observar uma liberação sustentada promovida pelo HPMC e a rápida liberação do AAS puro, conforme já descritos na literatura (AJUN *et al.*, 2009; ZATTA *et al.*, 2018).

A característica do HPMC em intumescer reflete diretamente no perfil de liberação devido à formação de uma barreira entre fármaco e o meio de dissolução (ZATTA *et al.*, 2018).

Zatta e colaboradores (2018) e Siepmann e Peppas (2012), relataram que esse adjuvante, ao entrar em contato com o meio de dissolução ou solução aquosa, sofre relaxamento da cadeia polimérica e expansão de volume, caracterizado pelo intumescimento, erosão e dissolução do gel formado, levando finalmente, à liberação do fármaco (SIEPMANN & PEPPAS, 2012; ZATTA *et al.*, 2018). Ambos trabalhos corroboram o perfil de liberação sustentado da formulação do presente trabalho.

Relacionado com os meios de liberação utilizados, com o intuito de observar o perfil das formulações nas vias pulmonar e oral, os fluidos: Pulmonar Simulado (FPS, pH 7,4); Lisossomal Artificial (FLA, pH 4,5); Gástrico Simulado (FGS, pH 1,2) e Intestinal Simulado (FIS, pH 6,8) foram usados. Por outro lado, o Ringer foi empregado por ser uma solução salina para fins de comparação entre os fluidos. Além disso, o FLA foi escolhido devido à suas características semelhantes ao fluido que partículas

inaladas entram em contato após fagocitose pelos macrófagos nos alvéolos e interstício pulmonar (PAI *et al.*, 2015).

Como o perfil de liberação para o Fluido Intestinal Simulado (FIS) foi diferente quando comparado aos outros meios de dissolução, o pH mais básico do fluido em conjunto com a pancreatina poderiam estar controlando a dissolução, ocasionando uma lenta taxa de liberação devido à modificação na matriz do HPMC, conforme descrito por Ford (FORD, 2014). Por fim, a rápida liberação do fármaco no Fluido Pulmonar Simulado (FPS) estaria relacionada com a grande concentração de sais no fluido, corroborando com achados de Ford (2014).

Siepmann e Peppas (2012) comentaram sobre a utilização de HPMC em sistemas de liberação de fármacos, evidenciando que os modelos matemáticos mais simples, como o de Higuchi, precisavam ser modificados para polímeros que apresentem características distintas como intumescimento, erosão e dissolução em uma única formulação. Sendo assim, no presente estudo, foi possível perceber um perfil de liberação de segunda ordem com duas etapas (rápida e lenta) do tipo transporte anômalo, tendo como mecanismos governantes a ação da difusão *Fickiana* e do intumescimento e conseqüente relaxamento das cadeias do HPMC (SIEPMANN & PEPPAS, 2012).

O desempenho aerodinâmico associado aos resultados de diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica da formulação MP/F4M revelaram que o pó desenvolvido apresentou características desejáveis para administração pela via pulmonar, como discutido por diversos autores, os quais, evidenciam que o diâmetro de partícula ótimo para esta via é de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , além de uma deposição em estágios mais profundos do impactador em cascata (DHAND *et al.*, 2014; MORALES *et al.*, 2017; RUGE, KIRCH, LEHR, 2013; SMOLA, VANDAMME, SOKOLOWSKI, 2008; SULAIMAN *et al.*, 2017; ZELIKIN, EHRHARDT, HEALY, 2016).

Com isso, foi possível concluir que a formulação deste trabalho, devido suas características aerodinâmicas, provavelmente sofre impactação inercial e sedimentação gravitacional, tendo capacidade de alcançar os ramos mais profundos do pulmão, como os alvéolos e atingir a circulação sistêmica (DHAND *et al.*, 2014; MORALES *et al.*, 2017; RUGE, KIRCH, LEHR, 2013).

Consideração que a mucoadesão é um fenômeno essencial para a retenção da formulação na via pulmonar e posterior liberação do fármaco, de forma local ou

sistêmica (ZATTA *et al.*, 2018), o ensaio de lavabilidade evidenciou o potencial mucoadesivo da MP/F4M à mucosa e provável resistência ao *clearance* pulmonar. Por sua vez, o ensaio de permeação demonstrou uma melhor capacidade de permeação da formulação MP/F4M quando comparada ao fármaco livre e a adsorção de mucina provou a capacidade do HPMC em interagir com a mucina, já que o esôfago suíno exibe essa proteína que também está presente no pulmão de humanos, conforme demonstrado por Voynow (2002) e Kim e Lillehoj (2008) (KIM & LILLEHOJ, 2008; VOYNOW, 2002)

Essas propriedades mucoadesivas *in vitro* da formulação corroboram diversos estudos que utilizam HPMC em suas formulações, tais como o trabalho de Zatta e colaboradores (2018) em formulações para administração pulmonar; por Karavas, Georgarakis e Bikiaris (2006) para tratamento oral de complicações cardíacas; Perioli e colaboradores (2004) e Nafee e colaboradores (2004) para formulações para tratamento bucal; Valenta (2005) para administração vaginal; Llabot, Manzo e Allemandi (2002) para tratamento de candidíase oral; Limpingsa e Umprayn (2008) para administração transdérmica e por Chowdary e Rao (2003) para microcápsulas de glipizida para administração oral (CHOWDARY & RAO, 2003; KARAVAS, GEORGARAKIS, BIKIARIS, 2006; LIMPONGSA & UMPRAYN, 2008; MANUEL LLABOT, MANZO, ALLEMANDI, 2002; NAFEE *et al.*, 2004; PERIOLI *et al.*, 2004; VALENTA, 2005; ZATTA *et al.*, 2018).

Nos ensaios antihemostáticos *in vitro*, os de coagulação plasmática demonstraram que a fucoidana aumentou o tempo de coagulação para o PT e aPTT (concentração de 200 e 25 µg/mL, respectivamente), sendo semelhantes aos resultados encontrados por diversos autores (CHURCH *et al.*, 1989; MARAIS & JOSELEAU, 2001; LI *et al.*, 2008; ALE, MIKKELSEN, MEYER, 2011b; FOLEY *et al.*, 2011). Ainda foi possível perceber que a fucoidana apresentou inibição da via intrínseca (aPTT) da cascata de coagulação em concentrações menores do que as observadas para a via extrínseca (PT). Isso se deve ao seu mecanismo de ação sobre inibidores endógenos da trombina (antitrombina III e cofator II da heparina), os quais, estão mais relacionados com a via intrínseca, como relatado por Li e colaboradores (LI *et al.*, 2017a).

De forma interessante, a formulação testada para coagulação plasmática na concentração de 0,5 mg/mL (33 µg/mL), não apresentou atividade anticoagulante.

Dessa forma, é possível perceber que a associação da fucoidana na formulação modifica sua atividade anticoagulante, possivelmente devido à interação dos grupamentos sulfatos aniônicos da fucoidana com os grupamentos catiônicos da L-lisina, impedindo assim sua ligação com fatores de coagulação, provavelmente devido a impedimento estérico.

Em relação aos ensaios antiagregantes plaquetários *in vitro* para a formulação MP/F4M, foi observada inibição significativa da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico devido ao efeito antiagregante plaquetário do AAS, evidenciando presença e atividade deste fármaco na formulação, corroborando com resultados da literatura para a atividade do AAS (AWTRY & LOSCALZO, 2000; CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; HAYDEN *et al.*, 2002). Além disso, os ensaios de agregação refeitos após 28 dias demonstraram a estabilidade da formulação, confirmando os estudos de estabilidade do AAS discutidos anteriormente.

Finalmente, a concentração de fucoidana no pó não induziu agregação plaquetária (33 µg/mL). Estudos realizados somente com a fucoidana demonstraram que apenas em concentrações acima de 400 µg/mL, a fucoidana extraída da alga marrom *Ascophyllum nodosum* pode ser um agonista da agregação, como já relatado por Manne e colaboradores (2013) (MANNE *et al.*, 2013b).

Nos resultados de hemólise, foi possível perceber que a formulação, em duas concentrações diferentes (0,5 e 1 mg/mL) não apresentou atividade hemolítica, reforçando o perfil de biocompatibilidade da formulação proposta.

Com isso, os achados reforçam o objetivo do estudo, visto que a utilização concomitante de antitrombóticos que atuam em diferentes proteínas e vias elevam o risco de hemorragias conforme exposto por inúmeros autores (CASADO-ARROYO, SOSTRES, LANAS, 2013; CRYER & FELDMAN, 1999; HAYDEN *et al.*, 2002; KELLY *et al.*, 1996).

Para os ensaios de adesão plaquetária, sabendo que a PSGL-1 é o receptor da P-selectina, como demonstrado em trabalhos clássicos de Pouyani e Seed (1995) e Frenette e colaboradores (2000) e que as plaquetas ativadas expressam P-selectina (FALATI *et al.*, 2003; FRENETTE *et al.*, 1995, 2000; POUYANI & SEED, 1995), percebemos que a fucoidana utilizada apresenta seletividade pela P-selectina, através do ensaio de adesão competitiva utilizando PSGL-1, onde concentrações da formulação acima de 2,5 mg/mL apresentam seletividade com a P-selectina devido

provavelmente à presença de fucoidana suficiente para se ligar à plaquetas ativadas expressando P-selectina.

Esses resultados confirmam a capacidade da formulação em interagir com a P-selectina expressa em diversos locais, como nas plaquetas ativadas e lesões endoteliais que possam acarretar quadros patológicos trombóticos conforme já exposto anteriormente.

Diversos estudos clássicos relatam dificuldade em padronizar a ativação das plaquetas dos ratos com ácido araquidônico, onde a concentração utilizada varia de 10 a 500 mM, (BRYAN SMITH *et al.*, 1974; KULKARNI *et al.*, 2000; SAKATA *et al.*, 2017; VARGAFTIG, 1978). Como não foi possível ativar as plaquetas dos ratos utilizados no presente trabalho com ácido araquidônico, optamos por utilizar o ADP e colágeno, que já são relatados na literatura em apresentar modificações na agregação após utilização de AAS (ASHIDA, SAKUMA, ABIKO, 1980; HERBERT, BERNAT, MAFFRAND, 1993; MAFFRAND *et al.*, 1988; SEUTER, 1976; WANG *et al.*, 2002)

De forma geral, a agregação plaquetária de ratos induzida por colágeno apresenta algumas particularidades, como exposto por Takahashi (1991 e 2000). Ambos trabalhos deste autor relatam que há uma agregação reversível e é necessária uma concentração muito maior de colágeno para ativar as plaquetas de ratos quando comparados às de humano. Mesmo assim, este autor demonstrou ser possível rastrear atividade de diferentes fármacos antiagregantes plaquetários através da indução por colágeno em ratos (por exemplo, AAS, clopidogrel, ticlopidina) (TAKAHASHI, 1991, 2000).

De forma análoga, o ADP se apresenta como um potente indutor da agregação plaquetária em ratos, conforme discutido por Eyre e Gamlin (2010); Wang e King (2012) e Cimmino e Golino (2013). Além disso, Takahashi (1991 e 2000), também comenta que ratos não apresentam agregação secundária, responsável pela liberação do conteúdo granular das plaquetas e a agregação de ratos é facilmente iniciada com ADP. Com isso, essa agregação é rápida e se mantém até em pequenas concentrações, como relatado em diversos estudos (ASHIDA, SAKUMA, ABIKO, 1980; KOBAYASHI & DIDISHEIM, 1973; MAFFRAND *et al.*, 1988; TAKAHASHI, 1991, 2000).

Em nossos ensaios de agregação plaquetária *ex vivo* utilizando o ADP, não foram observadas diferenças estatísticas relacionados ao perfil antiagregante do AAS,

resultado possivelmente relacionado à baixa concentração do fármaco utilizado e a potência deste indutor, sendo descrito na literatura a necessidade de uma alta dose de AAS para se observar efeitos (HERBERT *et al.*, 1996; KOBAYASHI & DIDISHEIM, 1973; TOHTI *et al.*, 2006; VARGAFTIG, 1978; WANG *et al.*, 2002).

Mesmo assim, foram realizados experimentos *ex vivo* utilizando 3,5 mg/kg de AAS puro em diferentes tempos após administração pulmonar (2h, 6h e 24h) e indução com ADP para confirmar se o fármaco por si só apresentava modificação no padrão de agregação. Assim como a formulação MP/F4M, o AAS puro não teve atividade antiagregante plaquetária *ex vivo* expressiva, corroborando com os achados anteriores para a via do ADP.

O colágeno, devido às problemáticas citadas anteriormente para a via do ácido araquidônico (BRYAN SMITH *et al.*, 1974; KULKARNI *et al.*, 2000; SAKATA *et al.*, 2017; VARGAFTIG, 1978), é o indutor de escolha nos estudos utilizando ratos e AAS, conforme pode ser observado em vários estudos (CRUZ *et al.*, 2002; DAYKIN *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-CORREA *et al.*, 2008; MOLINA *et al.*, 2005), devido principalmente a facilidade de observar possíveis alterações na agregação plaquetária após indução (SAKATA *et al.*, 2017).

No presente estudo foram utilizados 3,5 mg/kg de AAS puro, o qual, não apresentou atividade *ex vivo*, corroborando com os trabalhos de Sakata e colaboradores (2017), onde apenas concentrações maiores de 30 mg/kg de AAS pela via oral apresentam uma atividade expressiva. Além disso, a dose única é relatada na literatura como não eficaz em inibir plaquetas de ratos *ex vivo*, conforme exposto por Daykin e colaboradores (2006), que demonstrou que concentrações abaixo de 10 mg/kg de AAS em uma administração oral não apresentaram atividade antiagregante plaquetária e Gonzales-Correa e colaboradores (2008) que utilizaram 2,42 mg/kg durante sete dias e Cruz e colaboradores (2002) que utilizaram 10 mg/kg por 3 meses (CRUZ *et al.*, 2002; DAYKIN *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-CORREA *et al.*, 2008).

No entanto, a formulação MP/F4M apresentou atividade nos tempos 2, 4, 6 e 24 horas após administração única, inferindo que há uma modulação na agregação plaquetária *ex vivo* de ratos com baixas concentrações de AAS, diferindo assim, dos resultados da literatura (CRUZ *et al.*, 2002; DAYKIN *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-CORREA *et al.*, 2008). Corroborando esses resultados, Daykin e colaboradores (2006), relataram um melhor perfil antiagregante plaquetário quando há associação

de fármacos, como AAS e enoxaparina e AAS e clopidogrel pela modulação da agregação plaquetária, o que pode estar diretamente relacionado com o AAS e o perfil de seletividade da fucoidana.

Para os ensaios *in vivo*, através da trombose arterial induzida por cloreto férrico, conforme exposto por Wang e Xu (2005) é necessário um ajuste fino da dose de cloreto férrico para que o ensaio consiga observar diferenças em ratos tratados (WANG & XU, 2005). Sendo assim, conforme exposto por diversos autores, a ausência de uma padronização faz que sejam necessários diversos estudos prévios até que a concentração de cloreto férrico seja otimizada (ELG, GUSTAFSSON, CARLSSON, 1999; LOCKYER & KAMBAYASHI, 1999; SURIN *et al.*, 2010; TANAKA, SATO, KURIMOTO, 2000; WANG *et al.*, 2006). Dessa forma, a concentração ótima de trabalho neste estudo foi de 20%.

Com intenção de observar se o AAS puro poderia influenciar no resultado, foi administrada por via pulmonar a mesma concentração dos ensaios anteriores (3,5 mg/kg). Entretanto, tanto o AAS puro quanto a formulação MP/F4M na concentração 11 mg/kg não apresentaram aumento do tempo para oclusão.

Ao observar dados na literatura, é possível perceber que a concentração de AAS utilizada nos ensaios de trombose arterial é muito maior que 3,5 mg/kg, além de alguns apresentarem modificações no tempo de tratamento ou via de administração. Isso é relatado no trabalho de Surin e colaboradores (2010), onde utilizaram 30 mg/kg de AAS, uma dose por dia, durante três dias; Lockyer e Kambayashi (1999) com administração intravenosa de 10, 30 e 100 mg/kg de AAS; Wang e colaboradores (2006) com administração intravenosa de 30 e 100 mg/kg de AAS; Tang e colaboradores (2003) com administração oral de 30 mg/kg de AAS e Prakash e colaboradores (2011) com administração oral de 30 mg/kg de AAS (LOCKYER & KAMBAYASHI, 1999; PRAKASH *et al.*, 2011; SURIN *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006).

Sendo assim, ao modificarmos o tempo de tratamento, passando de um dia para três dias e três doses de 11 mg/kg, percebemos um discreto aumento no tempo para oclusão. Logo, foram realizados ensaios adicionais com o máximo de formulação (11,5 mg/kg) possível para administração pulmonar em ratos sem causar danos ou problemas na respiração, assim como o óbito destes animais.

Os resultados foram semelhantes ao AAS por via oral (gavagem), na concentração de 10 mg/kg, uma dose por dia durante três dias, inferindo que, além de uma administração única apresentar inibição da agregação plaquetária conforme demonstrada anteriormente, uma administração mais prolongada (três dias) possui semelhante aumento do tempo de oclusão ao AAS gavagem 10 mg/kg, mas em concentração 1,5 menor (11,5 mg/kg da formulação MP/F4M para 10 mg/kg do AAS puro).

Como são dados inéditos utilizando administração pulmonar de AAS, não é possível precisar um mecanismo para a formulação MP/F4M (11,5 mg/kg) apresentar um perfil semelhante ao AAS puro 10 mg/kg por via oral. Contudo, conforme mencionando anteriormente, Lefrançais e colaboradores (2017), relataram que embora a medula óssea seja importante para a biogênese das plaquetas, o pulmão tem grande participação nesse processo, sendo um órgão de produção e distribuição de plaquetas (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017).

Sendo assim, a inibição das plaquetas em seu local de biogênese, com uma liberação controlada mantendo algum nível de inibição por um longo período (24 horas observado no ensaio de agregação *ex vivo*) pode estar relacionada com esse perfil inibitório semelhante a uma alta concentração de AAS por via oral.

Como apenas os ensaios de uma dose por dia, durante três dias apresentaram resultados para trombose arterial, esses grupos foram utilizados no tempo de sangramento. Desta forma foi possível perceber que 10 mg/kg de AAS por via pulmonar aumentou a quantidade de hemoglobina perdida mesmo sem aumentar o tempo para oclusão e 10 mg/kg de AAS por via oral também aumentou a quantidade de hemoglobina, mas apresentou resultados na trombose arterial.

Esse achados corroboram com resultados do aumento de tempo de sangramento observado por Stupnisek e colaboradores (2012 - 1 g/kg de AAS por via intraperitoneal); Shatoor e colaboradores (2012 - 25 mg/kg de AAS, uma dose por dia durante sete dias); Létiénne e colaboradores (2010 - 40 mg/kg de AAS por via oral) e Bird e colaboradores (2011 - 30 mg/kg de AAS por via intraperitoneal) (BIRD *et al.*, 2011; LÉTIENNE *et al.*, 2010; SHATOOR *et al.*, 2012; STUPNISEK *et al.*, 2012). De forma satisfatória, a formulação MP/F4M não apresentou aumento do tempo de sangramento, reforçando seu caráter antitrombótico com diminuição dos efeitos hemorrágicos.

A literatura relata que o AAS pode causar úlceras hemorrágicas em ratos, mas apenas em doses maiores que 100 mg/kg, conforme exposto por Das e Roy (2012) que utilizaram 500 mg/kg; Wang e colaboradores (2011) que utilizaram 200 mg/kg e Kodela e colaboradores (2015) que utilizaram 180 mg/kg. De forma interessante, Raghavendran e colaboradores (2011) utilizaram 400 mg/kg de AAS por via oral e perceberam que o dano na mucosa gástrica foi prevenido pela utilização de 0,02 g/kg de fucoídano (DAS & ROY, 2012; KODELA *et al.*, 2015; RAGHAVENDRAN, SRINIVASAN, REKHA, 2011; WANG *et al.*, 2011).

Como as doses de AAS (3,5 mg/kg e 10 mg/kg) estão muito abaixo do reportado na literatura, a análise histopatológica do estômago e intestino confirma a ausência de úlceras hemorrágicas, estando em concordância com os trabalhos apresentados.

Para a análise do coração, fígado e rim, não foi observada nenhuma modificação estrutural ou presença de células inflamatórias, confirmando a biocompatibilidade da formulação.

Já em relação ao pulmão, não há relato na literatura dos efeitos que a administração do AAS em um pulmão saudável possa acarretar, se tratando assim, de uma avaliação inédita. Para a avaliação do pulmão dos animais que receberam AAS pela via pulmonar, foi possível perceber áreas de espessamento do septo alveolar e presença de células inflamatórias, com resultados semelhantes expostos por Santos, Silva e Polacow (2013) com utilização de bleomicina de forma intratraqueal, que é capaz de induzir inflamação e espessamento de septo interalveolar (SANTOS *et al.*, 2013).

Em contrapartida, quando utilizada a formulação MP/F4M, não houve essas modificações estruturais no pulmão levando a crer que a formulação apresenta um efeito protetor frente aos danos causados pelo AAS. Para fins de comparação, um animal que morreu após administração de 10 mg/kg de AAS foi analisado, percebendo que o acúmulo de AAS acentuou os efeitos deletérios no pulmão deste animal, o levando a óbito.

Sendo assim, esses resultados evidenciam a possível aplicabilidade da formulação desenvolvida (MP/F4M) para a administração por via pulmonar, com parâmetros físico-químicos interessantes, além de uma grande estabilidade da formulação, perfil mucoadesivo positivo para tratamento pulmonar, com liberação

controlada, confirmando a potencialidade desta formulação para tratamento de quadros trombóticos, com diminuição do potencial hemorrágico.

## 6. CONCLUSÃO

---



## 7 CONCLUSÃO

- Foi desenvolvida uma formulação por secagem por aspersão baseada em micropartículas contendo AAS, fucoïdana, L-lisina e HPMC.

- As características físico-químicas da formulação apresentaram-se adequadas à via pulmonar, indicando potencial capacidade de administração por esta via e de deposição nas regiões mais profundas do pulmão.

- O perfil de liberação *in vitro* resultou em uma liberação prolongada do fármaco e o potencial mucoadesivo demonstrou propriedades bioadesivas necessárias para um aumento do tempo de permanência no pulmão com possível ação local e/ ou sistêmica.

- Os ensaios antihemostáticos *in vitro* evidenciaram a aplicabilidade desta formulação para tratamento de quadros trombóticos.

- Os ensaios antitrombóticos *ex vivo* demonstraram um perfil de atividade durante diversos tempos (2, 4, 6 e 24 horas após única dose).

- Os ensaios antitrombóticos *in vivo* corroboraram aumento do tempo de oclusão utilizando a formulação com concentração de AAS aproximadamente três vezes menor do que o AAS puro.

- Os ensaios de potencial hemorrágico comprovaram aumento do tempo de sangramento para o AAS puro, mas não para a formulação desenvolvida.

- Os estudos *in vivo* demonstraram que formulação administrada por via pulmonar garantiu a manutenção da arquitetura dos órgãos e ausência de hemorragia, hiperemia ou inflamação, de forma diferente ao AAS puro pulmonar que apresentou espessamento do septo alveolar com presença de células inflamatórias no pulmão.

- Considerando estes achados, pode-se afirmar que a formulação se apresentou como forte candidata a tratamento de quadros trombóticos pela via pulmonar, com resultados favoráveis de estabilidade, de liberação prolongada e manutenção da inibição da agregação plaquetária por um longo período, seletividade para P-selectina, sem ocasionar quadros de hemorragia ou danos nos órgãos em um curto tratamento.



## 8. MATERIAL SUPPLEMENTAR

---



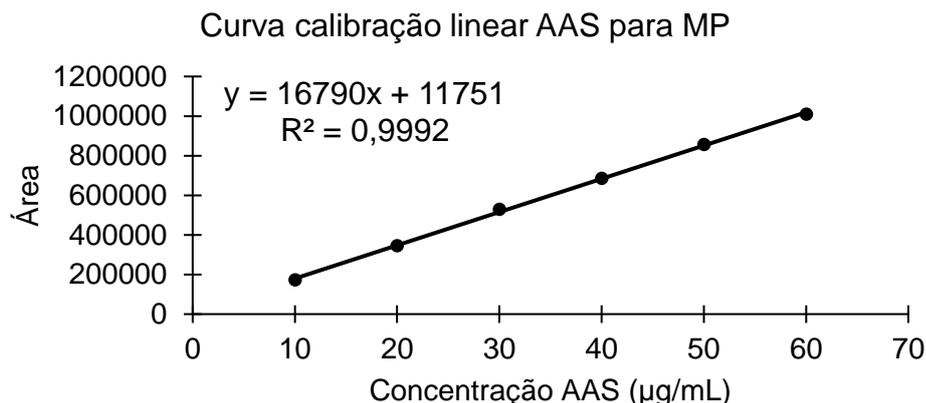
## 8 MATERIAL SUPLEMENTAR

### 8.1 FORMULAÇÕES PULVERULENTAS

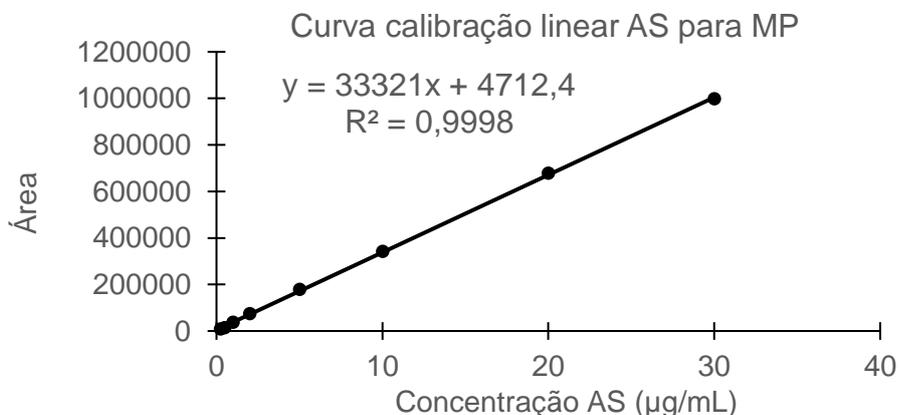
#### 8.1.1 Validação do método analítico para quantificação do ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS) nas micropartículas (MP)

O método analítico por HPLC-UV foi validado considerando os seguintes parâmetros para o fármaco AAS e seu principal produto de hidrólise (AS):

– Linearidade: três curvas de calibração foram construídas a partir de diluições de uma solução mãe do AAS (pontos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL) ou AS (0,24, 0,48, 1, 2, 5, 10, 20 e 30 µg/mL) em balão volumétrico de 25mL contendo acetonitrila: água + propilenoglicol 2% (50: 50 – v/ v) seguido de sonicação por 60 minutos. A equação de calibração obtida pela média dos pontos foi utilizada para determinação da concentração de AAS/AS por grama de pó (**Figura 63 e 64**),



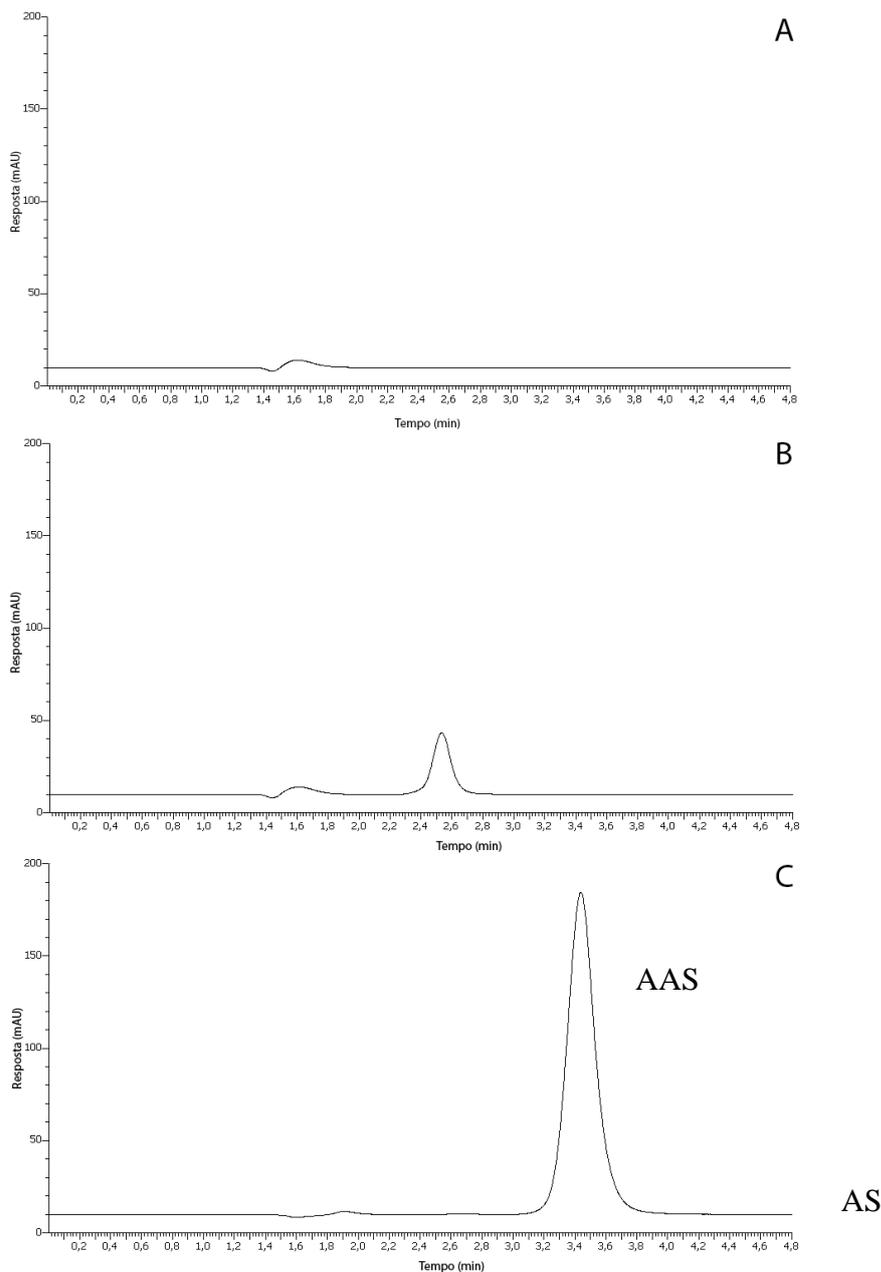
**Figura 63** – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação do fármaco AAS (ácido acetilsalicílico) nas micropartículas (MP) (n = 3).



**Figura 64** – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação do fármaco AS (ácido salicílico) nas micropartículas (MP) (n = 3).

– Seletividade: determinada pela avaliação do tempo de retenção do AAS ou AS em relação à formulação com todos os constituintes (branco), onde não foi observado interferência (**Figura 65**).

– Precisão repetibilidade: Seis réplicas de 30 µg/mL e 2 µg/mL (AAS e AS, respectivamente) individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, mesmo analista e instrumentação em uma única corrida analítica (**Tabela 15 e 16**).



**Figura 65** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Ringer.

**Tabela 15** – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica.

Concentração AAS ( $\mu\text{g/mL}$ )					
29,8	29,6	30,0	29,4	29,9	30,3
Média	29,83	DP	0,31	DPR	1,05

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

**Tabela 16** – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica.

Concentração AS ( $\mu\text{g/mL}$ )					
1,89	1,92	1,95	1,99	2,01	2,00
Média	1,96	DP	0,05	DPR	2,46

**Abreviaturas:** AS = ácido salicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

– Precisão intermediária: Seis réplicas de 30  $\mu\text{g/mL}$  e 2  $\mu\text{g/mL}$  (AAS e AS, respectivamente) individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, diferente analista e corrida analítica em dias diferentes (**Tabela 17 e 18**).

**Tabela 17** – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas.

Concentração AAS ( $\mu\text{g/mL}$ )					
28,9	29,8	30,2	29,8	29,7	30,0
Média	29,73	DP	0,45	DPR	1,50

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

**Tabela 18** – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas.

Concentração AS ( $\mu\text{g/mL}$ )					
1,92	1,95	1,90	2,03	2,00	1,99
Média	1,97	DP	0,05	DPR	2,55

**Abreviaturas:** AS = ácido salicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

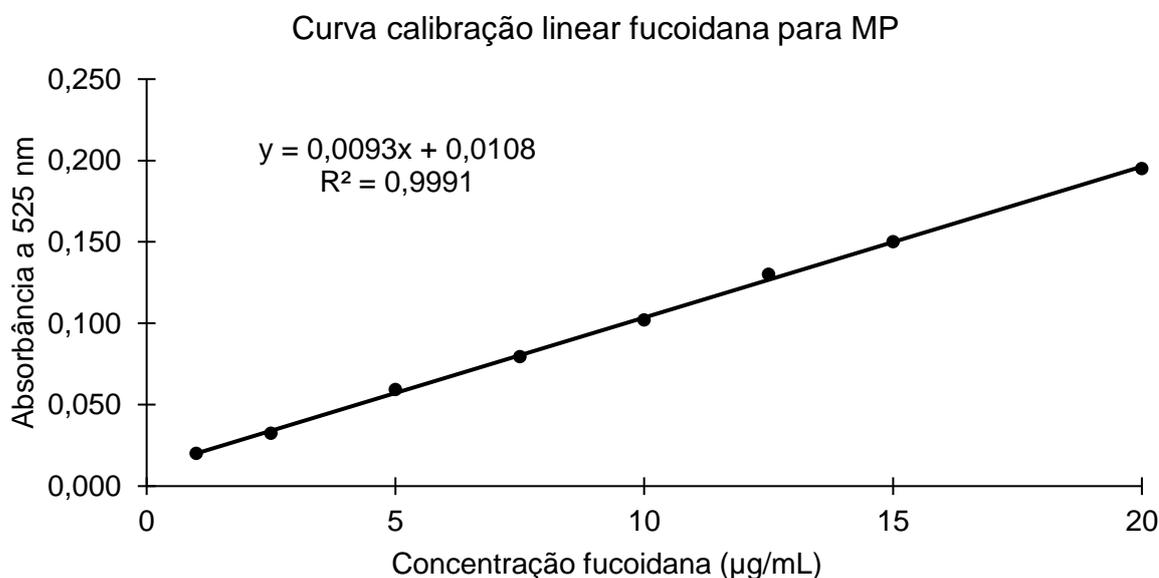
– Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD): calculados considerando a média do valor do coeficiente angular “a” das equações de calibração e a média do valor do intercepto “b” das equações de calibração ( $n = 3$ ), onde:

- $LQ_{AAS}$ : 1,387  $\mu\text{g/mL}$
- $LD_{AAS}$ : 0,523  $\mu\text{g mL}$
- $LQ_{AS}$ : 0,159  $\mu\text{g/mL}$
- $LD_{AS}$ : 0,045  $\mu\text{g/mL}$

### 8.1.2 Validação do método para quantificação da fucoïdana nas micropartículas

A validação levou em conta linearidade, seletividade, precisão repetibilidade e precisão intermediária.

– Linearidade: três curvas de calibração foram construídas utilizando os pontos 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 20 µg/mL, obtidos a partir de diluições de uma solução mãe da fucoïdana em frasco âmbar contendo 50 mL de água ultrapura. A equação de calibração obtida pela média dos pontos foi utilizada para determinação da concentração de fucoïdana por grama de pó (**Figura 66**).



**Figura 66** – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação da fucoïdana para micropartículas (MP) (n = 3).

– Seletividade: determinada pela avaliação da absorbância do reagente DMMB com todos os constituintes, sem a fucoïdana. A absorbância observada foi igual a zero para a triplicata.

– Precisão repetibilidade: Seis réplicas de 10 µg/mL individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, mesmo analista e instrumentação em um único ensaio (**Tabela 19**).

**Tabela 19** – Concentrações fucoïdana obtida utilizando parâmetros iguais em um único ensaio.

Concentração fucoïdana (µg/mL)					
10,13	9,81	9,91	10,02	9,91	9,81
Média	9,93	DP	0,13	DPR	1,27

**Abreviaturas:** DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

– Precisão intermediária: Seis réplicas de 10 µg/mL individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, diferente analista e em dias diferentes (**Tabela 20**).

**Tabela 20** – Concentrações fucoidana obtida utilizando parâmetros iguais com diferente analista e dias diferentes.

Concentração fucoidana (µg/mL)					
9,91	10,02	9,91	10,24	9,59	10,13
Média	9,97	DP	0,22	DPR	2,24

**Abreviaturas:** DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

## 8.2 PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

### 8.2.1 Validação do método analítico para quantificação do ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido salicílico (AS) nas micropartículas (MP) submetidas ao ensaio de liberação *in vitro*

O método analítico HPLC-UV foi validado considerando os seguintes parâmetros para o fármaco AAS e seu principal constituinte após hidrólise (AS) nos meios Ringer; Fluido Pulmonar Simulado (FPS); Fluido Lisossomal Artificial (FLA); Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Fluido Intestinal Simulado (FIS).

– Linearidade: três curvas de calibração foram construídas a partir de uma solução mãe do AAS (pontos 0,5, 1, 5, 10, 20, 30 e 40) e AS (pontos 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL) em balão volumétrico de 25mL contendo acetonitrila: água + propilenoglicol 2% (50: 50 – v/ v) seguido de sonicação por 60 minutos com subseqüentes diluições em balão de 5mL contendo o meio de escolha. A equação de calibração obtida pela média dos pontos foi utilizada para cálculo da porcentagem de AAS liberado e hidrolisado (AS) (**Tabela 21 e 22**).

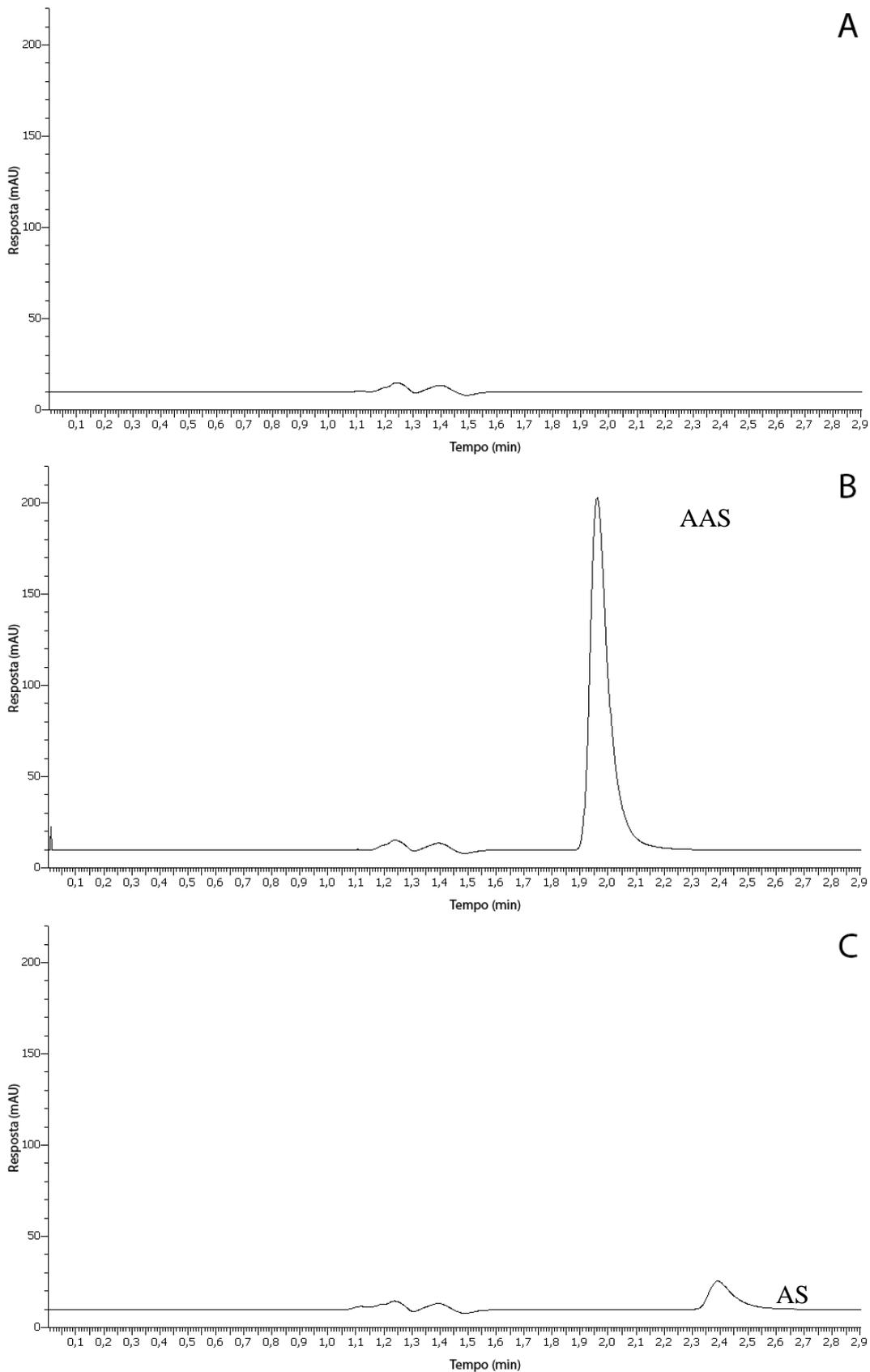
**Tabela 21** – Equação da reta e  $r^2$  obtidas para quantificação do fármaco AAS (ácido acetilsalicílico) liberado em diferentes meios (n = 3).

Ácido acetilsalicílico (AAS)		
Meio	Equação da reta	$r^2$
Ringer	$y = 19088x - 6676,9$	0,9993
Fluido pulmonar simulado	$y = 16542x - 6447,9$	0,9987
Fluido lisossomal artificial	$y = 14633x + 1686,3$	0,9995
Fluido gástrico simulado	$y = 15728x - 799,6$	0,9995
Fluido intestinal simulado	$y = 15882x - 4381,6$	0,999

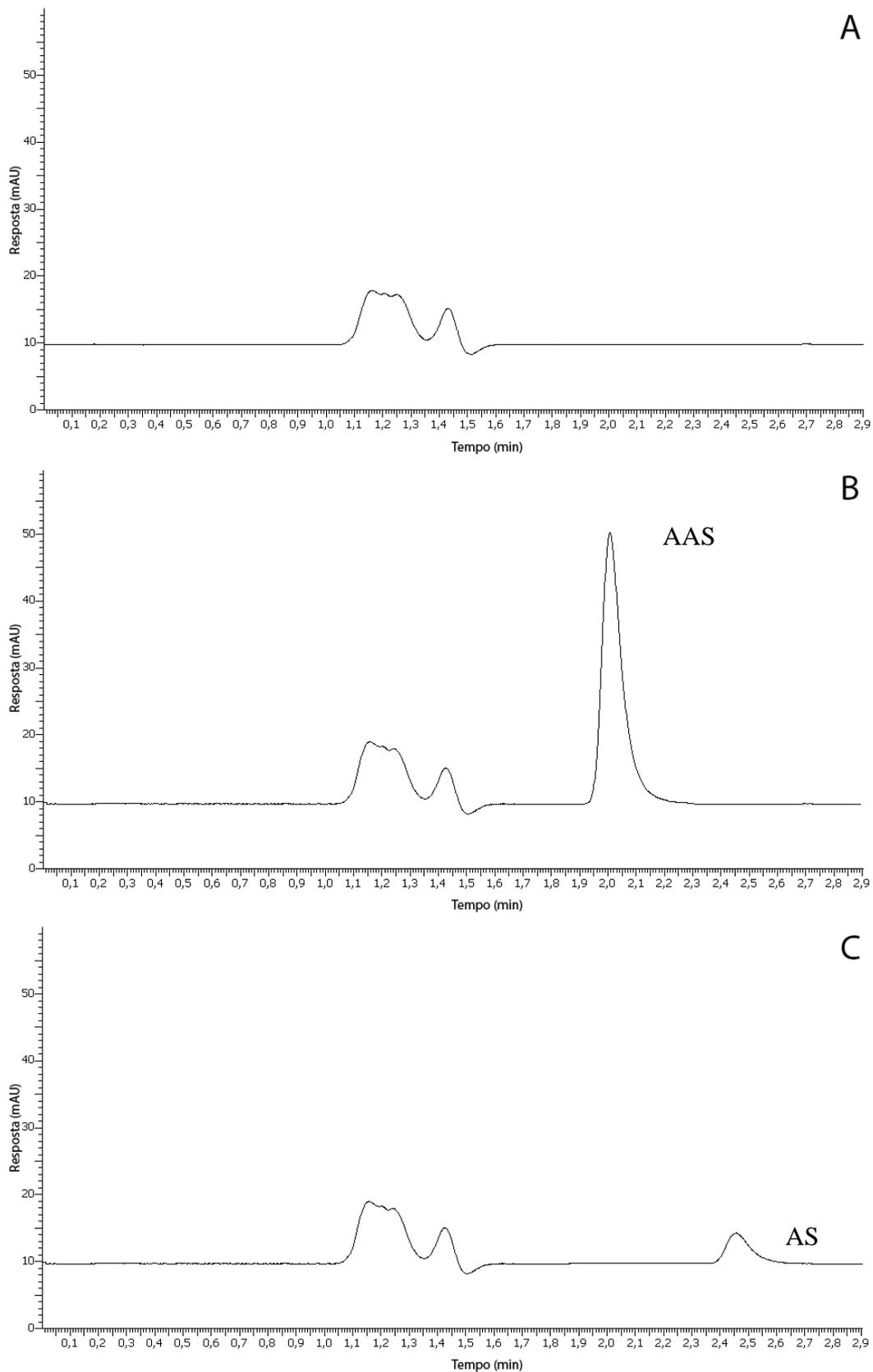
**Tabela 22** – Equação da reta e  $r^2$  obtidas para quantificação do AS (ácido salicílico) liberado em diferentes meios (n = 3).

Ácido salicílico (AS)		
Meio	Equação da reta	$r^2$
Ringer	$y = 41549x - 291,98$	0,9998
Fluido pulmonar simulado	$y = 32800x + 2465,6$	0,9997
Fluido lisossomal artificial	$y = 40715x - 1859,3$	0,9995
Fluido gástrico simulado	$y = 33811x - 2538,9$	0,9987
Fluido intestinal simulado	$y = 32688x + 525$	1

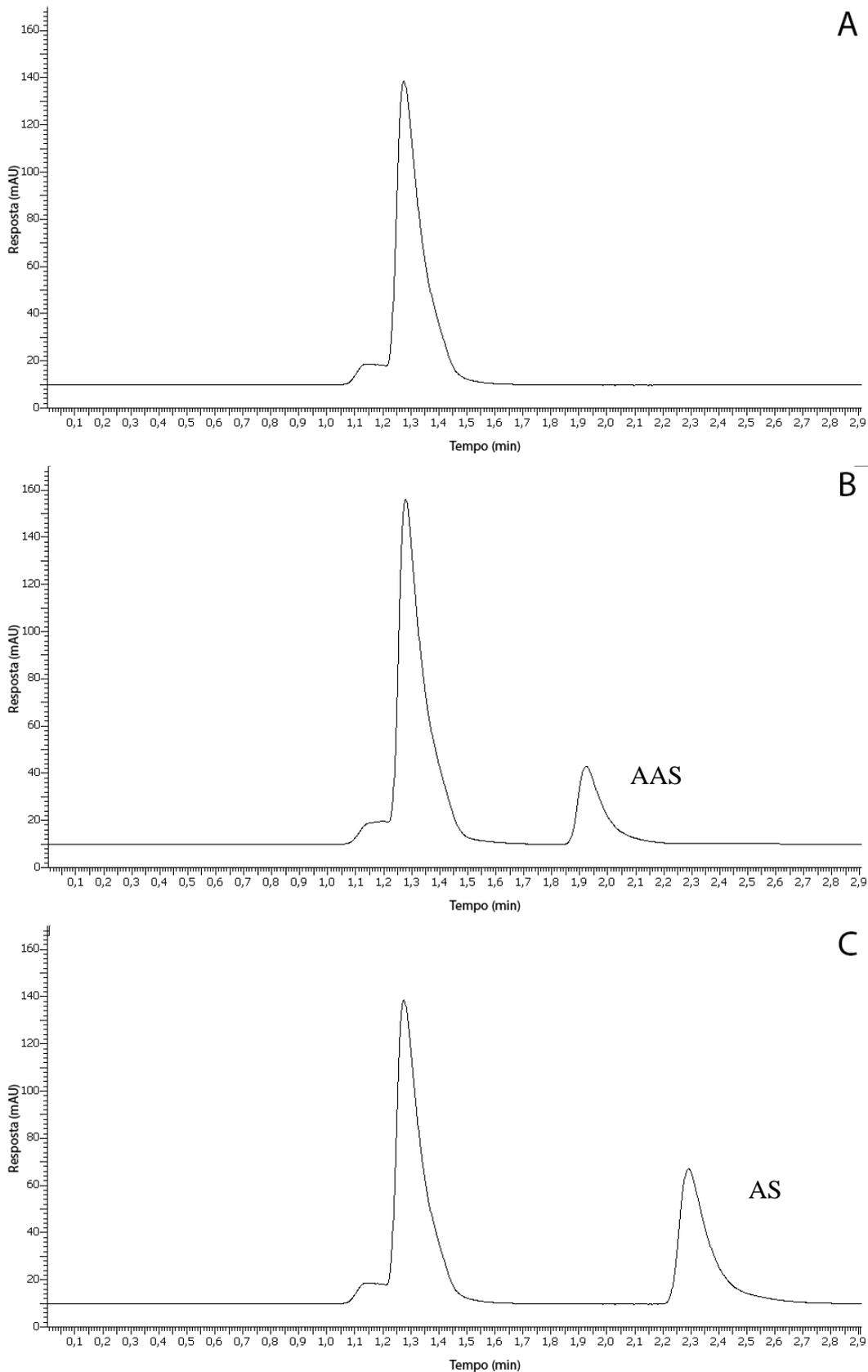
– Seletividade: determinada pela avaliação do tempo de retenção do AAS ou AS puro em relação à formulação com todos os constituintes nos meios utilizados, onde não foi observado interferência (Ringer - **Figura 67**; Fluido pulmonar simulado – **Figura 68**; Fluido lisossomal artificial - **Figura 69**; Fluido gástrico simulado - **Figura 70** e Fluido intestinal simulado - **Figura 71**).



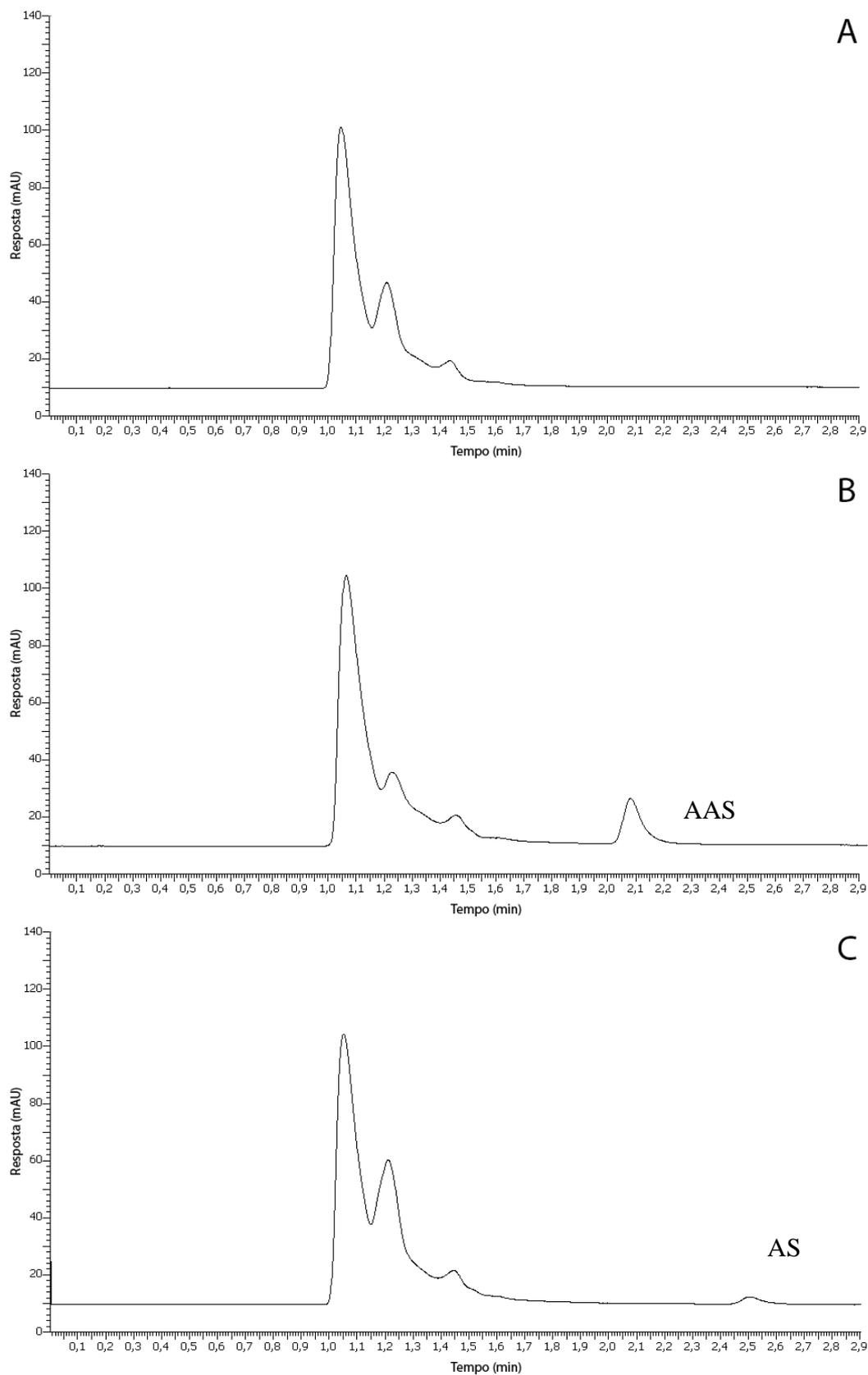
**Figura 67** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Ringer.



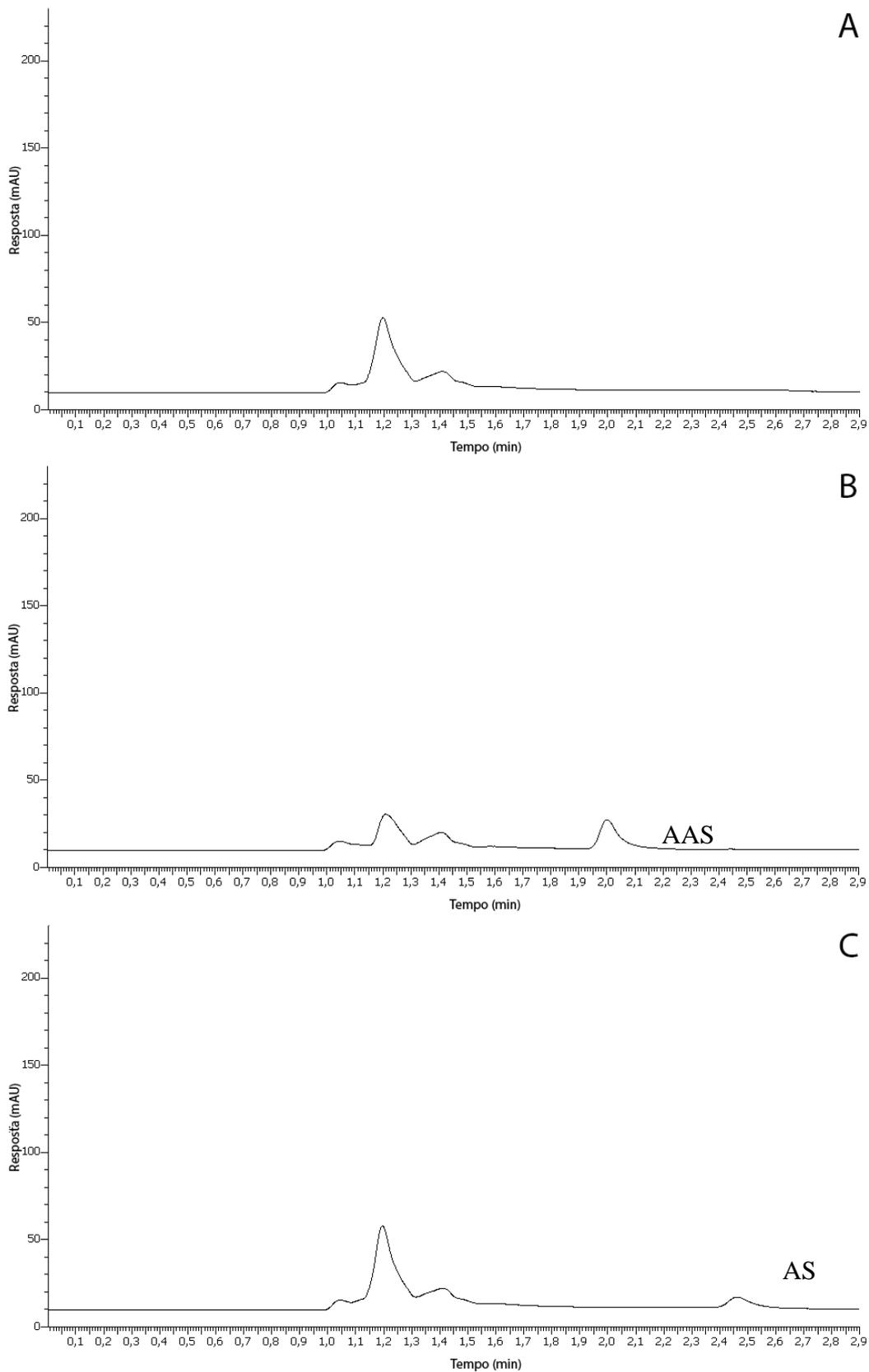
**Figura 68** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido pulmonar simulado (FPS).



**Figura 69** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido lisosomal artificial (ALF).



**Figura 70** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto inicial (0,5 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido gástrico simulado (FGS).



**Figura 71** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto inicial (0,5 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) e do ácido salicílico (C) em Fluido intestinal simulado (FIS).

– Precisão repetibilidade: Seis réplicas de 10 µg/mL e 2,5 µg/mL (AAS e AS, respectivamente) individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, mesmo analista e instrumentação em uma única corrida analítica (**Tabela 23 e 24**).

**Tabela 23** – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica.

	Concentração AAS (µg/mL)					
	Ringer	9,97	9,86	9,93	10,01	10,02
	Média	9,96	DP	0,06	DPR	0,59
Fluido pulmonar simulado	9,98	9,90	9,95	10,00	10,10	9,98
	Média	9,99	DP	0,07	DPR	0,66
Fluido lisossomal artificial	9,89	9,99	10,20	9,86	9,97	10,20
	Média	10,02	DP	0,15	DPR	1,49
Fluido gástrico simulado	9,99	9,85	9,86	9,85	10,00	9,87
	Média	9,90	DP	0,07	DPR	0,72
Fluido intestinal simulado	10,01	9,89	9,99	9,84	9,87	9,76
	Média	9,89	DP	0,09	DPR	0,95

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

**Tabela 24** – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica.

	Concentração AS (µg/mL)					
	Ringer	2,50	2,46	2,45	2,56	2,47
	Média	2,47	DP	0,07	DPR	2,66
Fluido pulmonar simulado	2,45	2,52	2,49	2,46	2,51	2,50
	Média	2,49	DP	0,03	DPR	1,12
Fluido lisossomal artificial	2,48	2,50	2,46	2,55	2,52	2,46
	Média	2,50	DP	0,04	DPR	1,43
Fluido gástrico simulado	2,52	2,51	2,46	2,48	2,48	2,48
	Média	2,49	DP	0,02	DPR	0,88
Fluido intestinal simulado	2,49	2,49	2,48	2,46	2,52	2,49
	Média	2,49	DP	0,02	DPR	0,78

**Abreviaturas:** AS = ácido salicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

– Precisão intermediária: Seis réplicas de 10 µg/mL e 2,5 µg/mL (AAS e AS, respectivamente) individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, diferente analista e em dias diferentes (**Tabela 25 e 26**).

**Tabela 25** – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas.

	Concentração AAS (µg/mL)					
	Ringer	9,89	9,99	10,00	9,98	9,99

	Média	9,86	DP	0,08	DPR	0,81
Fluido pulmonar simulado	9,89	9,91	10,20	10,10	9,95	9,87
	Média	9,99	DP	0,13	DPR	1,33
Fluido lisossomal artificial	9,99	9,97	9,98	10,00	9,86	9,75
	Média	9,93	DP	0,10	DPR	1,01
Fluido gástrico simulado	10,20	10,00	9,87	9,56	9,62	9,89
	Média	9,86	DP	0,24	DPR	2,42
Fluido intestinal simulado	9,76	10,20	9,84	9,99	10,10	9,95
	Média	9,97	DP	0,16	DPR	1,63

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

**Tabela 26** – Concentrações de ácido salicílico (AS) obtidas.

Concentração AS (µg/mL)						
Ringer	2,49	2,50	2,51	2,54	2,44	2,46
	Média	2,49	DP	0,04	DPR	1,44
Fluido pulmonar simulado	2,46	2,46	2,53	2,47	2,59	2,46
	Média	2,50	DP	0,05	DPR	2,16
Fluido lisossomal artificial	2,50	2,50	2,46	2,52	2,39	2,48
	Média	2,48	DP	0,05	DPR	1,87
Fluido gástrico simulado	2,51	2,46	2,48	2,53	2,44	2,48
	Média	2,48	DP	0,03	DPR	1,32
Fluido intestinal simulado	2,52	2,51	2,45	2,42	2,53	2,50
	Média	2,49	DP	0,04	DPR	1,75

**Abreviaturas:** AS = ácido salicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

– Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD): calculados considerando a média do valor do coeficiente angular “a” das equações de calibração e a média do valor do intercepto “b” das equações de calibração (n = 3) (**Tabela 27**):

**Tabela 27** – Limite de quantificação e detecção obtidos em diferentes meios.

Meio	Ácido acetilsalicílico (AAS)		Ácido salicílico (AS)	
	LQ µg/mL	LD µg/mL	LQ µg/mL	LD µg/mL
Ringer	1,446	0,434	0,130	0,039
Fluido pulmonar simulado	1,382	0,415	0,814	0,244
Fluido lisossomal artificial	1,833	0,850	1,265	0,380
Fluido gástrico simulado	0,609	0,183	1,516	0,455
Fluido intestinal simulado	1,600	0,480	0,266	0,080

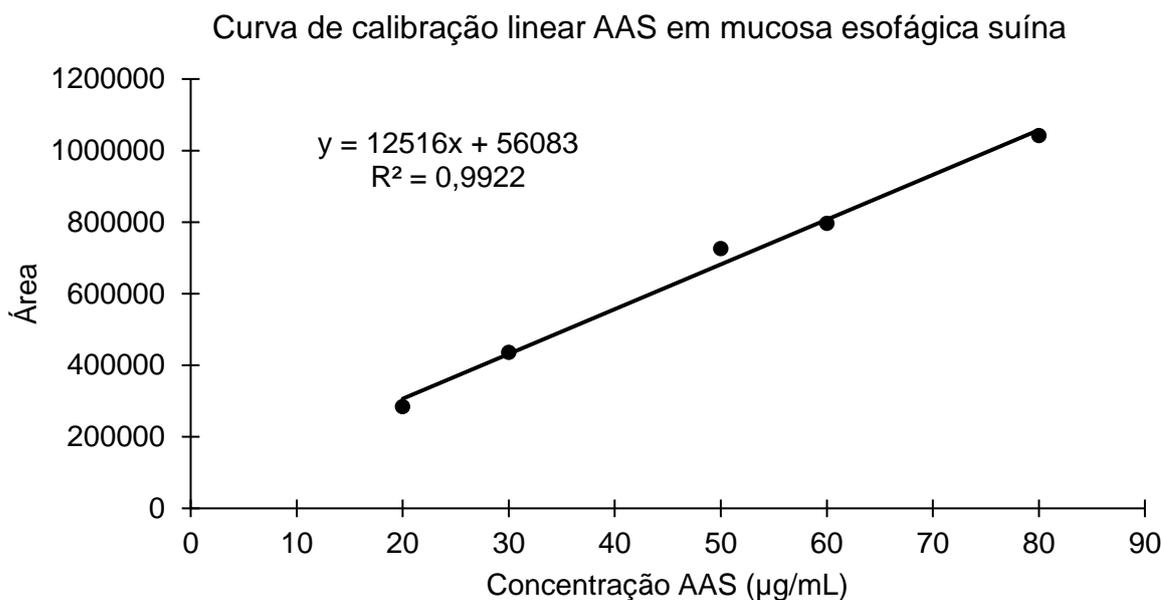
**Abreviaturas:** LQ = Limite de quantificação e LD = Limite de detecção.

### 8.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS *IN VITRO*

#### 8.3.1 Validação do método analítico para quantificação do ácido acetilsalicílico (AAS) nas micropartículas (MP) submetidas ao perfil de lavabilidade em mucosa esofágica de suíno e no ensaio de permeação

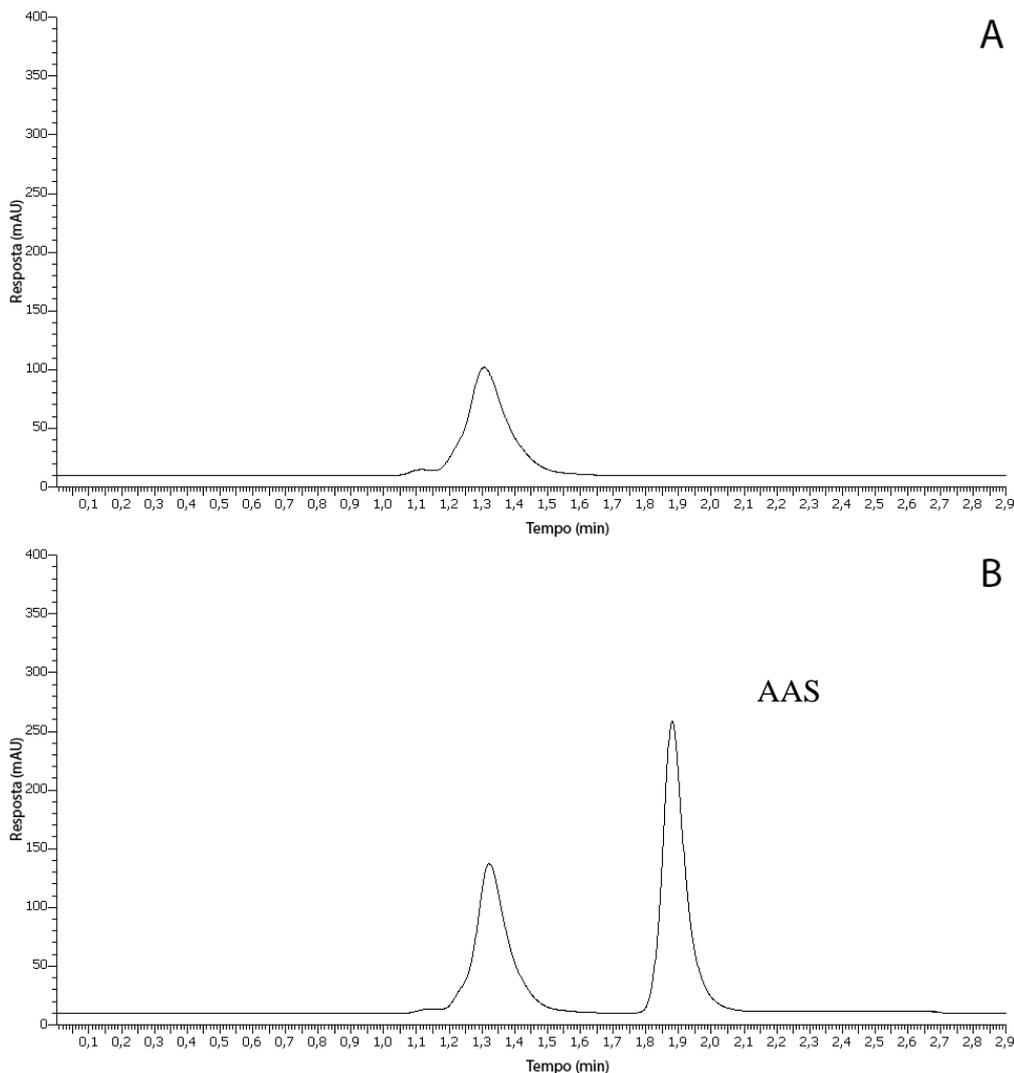
A extração seguiu o método previamente descrito para a formulação MP/F4M em meio FPS. Para a quantificação do que ficou retido na mucosa, o método analítico por HPLC-UV foi validado considerando os seguintes parâmetros para o fármaco AAS:

– Linearidade: uma curva de calibração foi construída a partir de diluições de uma solução mãe do AAS (pontos 20, 30, 50, 60 e 80 µg/mL). Uma alíquota da solução mãe referente a diluição requerida foi pipetada sobre a mucosa picada, em tubo falcon e mantida em repouso durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado 3 mL do meio extrator (FPS). As amostras foram submetidas a agitação por vortex (2 minutos), seguida de sonicação por ultrassom (40 minutos; 40°C) (**Figura 72**).



**Figura 72** – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantificação do fármaco AAS (ácido acetilsalicílico) na mucosa esofágica de suíno (n = 3).

– Seletividade: determinada pela avaliação do tempo de retenção do AAS em relação à formulação com todos os constituintes em pele de esôfago suíno, onde não foi observado interferência (**Figura 73**).



**Figura 73** – Cromatograma da formulação branca (A) na mesma concentração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração do ácido acetilsalicílico (B) em meio extrator FPS.

– Precisão repetibilidade: Seis réplicas de 30 µg/mL do AAS individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, mesmo analista e instrumentação em uma única corrida analítica (**Tabela 28**).

**Tabela 28** – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas utilizando parâmetros iguais em uma corrida analítica.

Concentração AAS (µg/mL)					
29,5	29,1	30,2	28,9	29,3	28,9
Média	29,32	DP	0,49	DPR	1,68

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

– Precisão intermediária: Seis réplicas de 30 µg/mL do AAS individualmente preparadas foram analisadas sob mesmas condições de operação, diferente analista e corrida analítica em dias diferentes (**Tabela 29**).

**Tabela 29** – Concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) obtidas.

Concentração AAS (µg/mL)					
29,4	30,5	28,5	28,6	29,0	31,2
Média	29,53	DP	1,09	DPR	3,69

**Abreviaturas:** AAS = ácido acetilsalicílico; DP = Desvio padrão; DPR = Desvio padrão relativo.

– Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD): calculados considerando a média do valor do coeficiente angular “a” das equações de calibração e a média do valor do intercepto “b” das equações de calibração (n = 3), onde:

- LQ<sub>AAS</sub>: 3,044 µg/mL
- LD<sub>AAS</sub>: 0,913 µg/mL

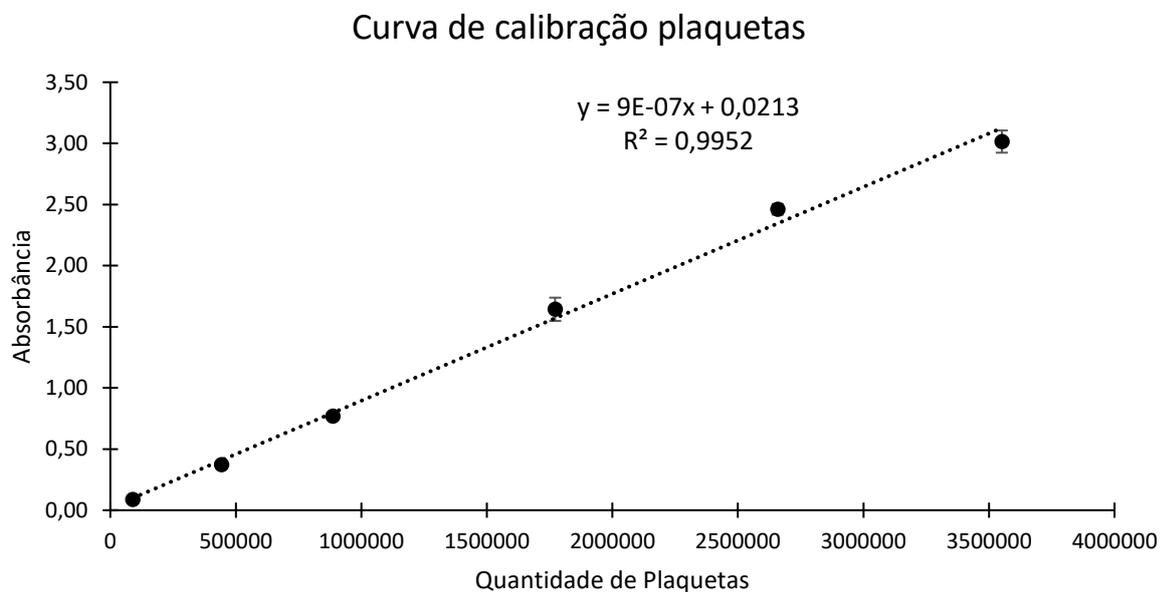
#### 8.4 ENSAIOS ANTIHEMOSTÁTICOS IN VITRO

##### 8.4.1 Curva de calibração de plaquetas para ensaio de adesão plaquetária *in vitro*

A curva de calibração foi obtida através de PRP obtido de três doadores diferentes (n = 3), lendo em câmara de Neubauer e utilizando seis concentrações de plaquetas a partir de uma solução mãe (SM = proporção 1 de PRP para 5 de Tyrode de ressuspensão) para construção do gráfico, conforme discriminado abaixo:

- i. Ponto 1: (88600 ou  $8,8 \times 10^4$  células/µL) – 2 µL SM + 98 µL de Tyrode de ressuspensão.
- ii. Ponto 2: (443000 ou  $4,4 \times 10^5$  células/µL) – 10 µL SM + 90 µL de Tyrode de ressuspensão.
- iii. Ponto 3: (886000 ou  $8,7 \times 10^5$  células/µL) – 20 µL SM + 80 µL de Tyrode de ressuspensão.
- iv. Ponto 4: (1772000 ou  $1,8 \times 10^6$  células/µL) – 40 µL SM + 60 µL de Tyrode de ressuspensão.
- v. Ponto 5: (2658000 ou  $2,7 \times 10^6$  células/µL) – 60 µL SM + 40 µL de Tyrode de ressuspensão.
- vi. Ponto 6: (3554000 ou  $3,6 \times 10^6$  células/µL) – 80 µL SM + 20 µL de Tyrode de ressuspensão.

Ao final, foi adicionado 100 µL do Tampão Citrato com p-nitropefil e Triton X-100, incubando por uma hora em condições ambiente. Em seguida, a reação foi parada com 50 µL de NaOH 2M e a absorbância lida com auxílio de espectrofotômetro a 405 nm (**Figura 74**).



**Figura 74** – Curva de calibração linear e equação da reta obtidas para quantidade de plaquetas no poço versus absorbância a 405 nm (n = 3).



## 9 APÊNDICE

---



## 9 APÊNDICE

### 9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Títulos do Projeto: Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo AAS associado a fucoidana por *spray-drying* para administração pulmonar

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Plínio Cunha Sathler

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabTIF – UFRJ)

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ RG ou CPF: \_\_\_\_\_

Email: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Teria interesse em participar do nosso banco de dados? ( ) SIM ( ) NÃO

O Sr<sup>(a)</sup> está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoidana produzidas por *spray-drying* para administração pulmonar”, conduzida pelo Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabHex – UFRJ).

Este estudo tem como alvo testar e entender a atividade de formulações de micropartículas no sistema hemostático (coagulação sanguínea e agregação plaquetária), com o objetivo de identificar características moleculares importantes para um potencial medicamento para tratamento de quadros trombóticos primários e secundários.

O seu sangue será colhido seguindo estritamente as normas de biossegurança (agulhas, luvas e materiais descartáveis) em tubos de coleta contendo um anticoagulante para armazenamento sem que haja formação de um coágulo. Este procedimento de coleta de sangue pode causar um ligeiro desconforto. O tubo contendo o seu sangue será destinado exclusivamente para ensaios realizados pelo nosso laboratório onde testaremos formulações de micropartículas para verificar como eles atuam no sistema hemostático.

Após essas informações o(a) senhor(a) concorda voluntariamente em participar do projeto, ciente que poderá retirar a sua autorização a qualquer momento, sem prejuízo algum para minha, ou sua relação com o LabHex-UFRJ ou mesmo para a pesquisa em si. Será mantido caráter confidencial dos seus dados pessoais e que, se os resultados dos testes gerarem informações importantes para todos que atuam com estes estudos, estas informações estarão autorizadas a ser apresentadas em congressos nacionais e internacionais e em publicações especializadas.

Eu, \_\_\_\_\_, RG ou CPF \_\_\_\_\_ declaro ter sido informado sobre os detalhes desta pesquisa, seus riscos e benefícios e concordo em participar voluntariamente do projeto de pesquisa acima descrito, doando ao LabHex, minha amostra de sangue.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_



## 10. ANEXOS

---



## 10 ANEXOS

### 10.1 PARECER COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL APROVADO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 28 de janeiro de 2019

Prezado Professor Plínio Cunha Sathler

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: “Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo ácido acetilsalicílico associado à fucoidana produzidas por spray-drying para administração pulmonar.”, protocolo nº 002/19, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 23/01/2019.

<b>Finalidade</b>	<b>( ) Ensino (X) Pesquisa Científica</b>
<b>Vigência do Projeto</b>	<b>Até 28/02/2020</b>
<b>Espécie/linhagem</b>	<b><i>Rattus norvegicus</i>/ Wistar</b>
<b>Nº de animais</b>	<b>45 animais</b>
<b>Peso/idade</b>	<b>200-250g/ 6-9 semanas</b>
<b>Sexo</b>	<b>Machos e Fêmeas</b>
<b>Origem</b>	<b>Biotério da Faculdade de Farmácia - CCS Bloco B - subsolo - UFRJ</b>

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

CEUA - UFRJ: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar - sala 19 - Cidade Universitária - CEP 21941-590 - Rio de Janeiro - Brasil  
Tel: (21) 39386490 - <https://www.ccs.ufrj.br/conteudos/ceua>

## 10.2 MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE PÓS E APARATO DISSOLUTOR

Solicitação de depósito de patente sob número BR1020180090933 pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1/12

### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

#### **MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE PÓS E APARATO DISSOLUTOR**

##### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve um método de dissolução de pós e um aparato de dissolução capaz de conduzir o presente método. O método envolve a formação de um pó coeso que dispensa a utilização de capsulas de gelatina dura ou outros meios de confinamento ou a utilização de aditivos no meio de dissolução. A presente invenção se situa nos campos do desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos.

##### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** O controle de qualidade durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos é de suma importância para garantir sua segurança e eficácia (Ansel et al. 2000; Kesic, 2009), cujas determinações são reguladas pela Agência Nacional de Medicamentos (ANVISA) que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos de uso humano (RDC nº 17/2010, ANVISA). A fase biofarmacotécnica tem por objetivo determinar o perfil de liberação do fármaco a partir do medicamento, podendo estimar posteriormente sua absorção in vivo (Aguiar et al. 2005), visto que a absorção é fator dependente da quantidade de fármaco solúvel (Araújo et al. 2010). Desse modo, a realização de ensaios de dissolução em diferentes condições fisiológicas simuladas é de grande relevância para garantir os efeitos terapêuticos desejados, e assim, a qualidade biofarmacêutica.

**[0003]** Adicionalmente, nos deparamos com a problemática que versa sobre a produção de sistemas carreadores de micro- e nanopartículas na forma de formas farmacêuticas pulverulentas. Muitos dos métodos e equipamentos disponíveis para estudos de caracterização não são compatíveis com esta tecnologia no sentido de quão realista são quanto a limites de detecção e quantidade de insumo necessário, visto que em sua maioria, tais sistemas

carreadores são desenvolvidos com concentrações de fármaco significativamente baixas, e muitas vezes, em pequenas quantidades devido limitações da produção em escala de bancada e o alto custo associado.

**[0004]** Um exemplo disso são os dissolutores, visto que sua aquisição pode ser de aproximadamente 12 mil dólares, dependendo do fabricante, além dos custos para aquisição dos diferentes tipos de acessórios para implementação no aparato, podendo superar o valor de 15 mil dólares. Por se tratar de equipamentos de ponta com alta qualificação, o alto custo para obtenção e manutenção os torna inacessíveis principalmente para laboratórios de pesquisa de pequeno porte ou vinculados a universidades. Sabe-se que o teste de dissolução consiste em uma ferramenta de suma importância para o controle de qualidade de produtos em desenvolvimento, contudo este é apenas um dos inúmeros testes a serem realizados, e trabalhos desta natureza requerem diferentes análises para sua eficiente caracterização. Além de disso, há o custo associado a compra de fármacos e excipientes de grau farmacêutico com alta pureza, e o tempo demandado para a obtenção de sistemas tecnológicos. Estes dados reforçam a problemática da utilização de aparatos convencionais que necessitam de grande quantidade de amostra, que se mostra inviável, dificultando o progresso da pesquisa.

**[0005]** Um dos grandes problemas detectados no estado da técnica se referem ao ensaio de dissolução de formulas farmacêuticas que no estado de pó flutuam e/ou floculam durante o ensaio, interferindo nos resultados obtidos, uma alternativa para desviar deste problema é a introdução do fármaco em pó no interior de um meio de confinamento, como por exemplo, gelatina dura, porém os meios de confinamento podem interagir com o fármaco, dependendo de sua natureza, causando alteração nos resultados dos ensaios.

**[0006]** Formas farmacêuticas sólidas requerem atenção especial, pois sua biodisponibilidade pode ser afetada significativamente por diversos fatores, como a solubilidade do fármaco, excipientes das formulação e técnicas de produção empregadas (Serajuddin, 1999; Khadka et al. 2014; McClements &

Xiao, 2014; Kuentz, Holm & Elder, 2015). Entretanto, os métodos farmacopeicos aceitos oficialmente apresentam algumas limitações na execução do ensaio para pós secos, e o principal refere-se a problemas de interação cruzada, formando ligações covalentes entre o fármaco e/ ou excipientes da formulação com os componentes de fabricação das cápsulas de gelatina dura, as quais são comumente utilizadas como reservatórios.

**[0007]** A literatura apresenta uma gama de estudos que relatam tal incompatibilidade para diversos fármacos desde os anos 70, como cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina (Khalil et al., 1974; York, 1977; Mohamad et al., 1986; Georgarakis et al., 1988), a qual continua até os dias atuais sem uma solução eficiente. Duconseille e colaboradores (2014) em extensa revisão, cita que aldeídos, iminas, cetonas, sacarídeos (como glucose), corantes (FD&C Red No. 3 ou 40 e Blue No. 1), carbonato de cálcio, peróxido de hidrogênio, ácido sulfônico, carbodiimidas, benzeno e estabilizadores presentes em fármacos e formulações farmacêuticas ocasionam a interação cruzada. Além disso, Singh e colaboradores (2002) relata que a interação cruzada da cápsula de gelatina dura forma uma película fina, dura e insolúvel em água, atuando como uma barreira e restringindo a liberação da forma farmacêutica contida. Outros exemplos de fármacos com interação cruzada com cápsulas de gelatina dura são descritos na revisão de Singh et al. (2002), como amoxicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína, gemfibrozil, fármacos hidrofóbicos, etodolaco, acetaminofeno e fármacos pouco solúveis em água.

**[0008]** Digenis e colaboradores (1994) mencionam que alguns fármacos podem formar ligação químicas inespecíficas com cápsulas de gelatina dura, levando a uma dissolução incompleta dos componentes da forma farmacêutica sólida e liberação insuficiente do fármaco, e no caso de ensaios de bancada, um resultado falso. Adicionalmente, Ofner e colaboradores (2001) comenta sobre a exposição de cápsulas de gelatina dura com formaldeído (presente em algumas formas farmacêuticas sólidas) e também sobre condições de stress (alta temperatura e umidade), relatando que também é possível haver interação

cruzada entre os próprios elementos da cápsula de gelatina dura, corroborando com a problemática acima citada. Além dos estudos mencionados, muitos outros casos são relatados na literatura, os quais tornam evidente a relevância da problemática detectada e a urgente necessidade de desenvolver uma metodologia capaz de superar esta imitação e viabilizar a execução do ensaio de solubilidade que se faz indispensável neste processo.

**[0009]** Outro problema inerente às metodologias habitualmente utilizadas refere-se a formas farmacêuticas sólidas que contenham em sua composição excipientes intumescentes (ex. hidroxipropil-metil-celulose e poloxamer), impedindo que a forma farmacêutica fique totalmente submersa no meio de dissolução. Marques (2014) demonstra a utilização de enzimas no meio de dissolução e utilização de cápsulas de HPMC (hidroxipropil-metilcelulose) para minimizar os problemas relacionados a interação da formulação farmacêutica com a cápsula de gelatina dura. Adicionalmente, se o meio de dissolução apresentar surfactantes, pode ser apropriado realizar um pré-tratamento (incubação) das cápsulas de gelatina dura e enzimas, e, após, adição do surfactante. Esse método é descrito pelo FDA (Food and Drug Administration U.S.A, database de métodos de dissolução). Embora sejam abordagens recomendadas pela USP (United States Pharmacopeia), há diversas problemáticas relacionadas com o resultado. Enzimas e/ou pré-tratamento do meio podem modificar o mesmo e originar resultados não reprodutíveis ou incompatíveis com resultados *in vivo*, e a utilização de cápsulas de HPMC para formas farmacêuticas sólidas pode levar à formação de uma barreira de gel resultando no aprisionamento do pó e um perfil de liberação errôneo, principalmente para formulações que já contenham em sua composição HPMC.

**[0010]** Algumas modificações nos métodos e equipamentos utilizados para este ensaio estão sendo avaliadas atualmente, como por exemplo, utilização de outros equipamentos, adição de novas enzimas e criação de novas cápsulas (Dickinson et al. 2012; Garbacz et al. 2008; Bachour, Bou-Chacra & Löbenberg, 2017; Pundir, Badola & Sharma, 2017). Ainda assim,

atualmente não há uma alternativa viável para excluir as cápsulas de gelatina dura ou impedir que a interação cruzada ocorra sem modificações na formulação farmacêutica ou no meio de dissolução.

**[0011]** Devido à inexistência de dados na literatura apresentando resultados ou protocolos eficientes para execução de ensaios de dissolução para forma farmacêutica de pós secos, e considerando os dados abordados anteriormente, é de suma importância a obtenção de um método reprodutível e capaz de superar tais limitações.

**[0012]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0013]** O documento "A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products", dos autores Davies e Feddah, revela a utilização do aparato IV USP (célula de fluxo contínuo) modificado em conjunto com um impactador em cascata de Andersen, selecionando assim as partículas que chegariam no pulmão. Porém a modificação do equipamento dissolutor pode ser de alta complexidade e gerar altos custos.

**[0014]** O documento "An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets", dos autores Jivraj, et al, revela diversos excipientes disponíveis no mercado para compressão direta de pós, como lactose, sorbitol, manitol. Porém a utilização de excipientes causa alteração nos resultados dos testes de dissolução quando o produto final é a forma pulverulenta (pó).

**[0015]** O documento "Cross-linking of hard gelatin carbamazepine capsules: effect of dissolution conditions on in vitro drug release", dos autores Marchais, et al, revela a tentativa de reverter a interação cruzada entre cápsulas de gelatina dura e carbamazepina utilizando como meios de dissolução o fluido gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS), adicionando enzimas no meio de dissolução e observou-se que a utilização das mesmas só é justificada para interação cruzada moderada do fármaco com a

cápsula. Além disso, o surfactante SLS não apresentou resultados satisfatórios. Observa-se então, que dependendo dos componentes da formulação, recomendação internacionais e já testadas (enzimas e surfactantes) podem não ter um resultado satisfatório.

**[0016]** O documento US8584539 utiliza uma modificação do Aparato IV USP, empregando diversos compartimentos para mimetizar modificações no meio gastrointestinal. A presente invenção tem como parâmetro a utilização de pouca quantidade de fármaco e meios, e utiliza métodos padronizados de meios simulados, sem necessidade de um aparato que utilize várias células para conseguir obter resultados.

**[0017]** De forma comparativa, os documentos: DE102011011186, WO2008157584, CN202582943U, EP2325633 e WO200886542 fazem melhorias no Aparato USP II já existente (utilização de pás). Cada modificação (detecção de infravermelho, utilização de sondas, sistemas de contrabalanceamento, coleta automática) faz com que o aparato se torne mais caro e impossibilite a realização do teste de dissolução para pequenas amostras de formas farmacêuticas pulverulentas

**[0018]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

#### **Sumário da Invenção**

**[0019]** Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de um método de dissolução de pós que envolve uma etapa de preparação do pó por meio de prensagem, gerando um pó coeso, não necessitando de utilização de capsula de gelatina dura ou qualquer outro tipo de aditivo, fazendo com que não ocorram alterações da curva de dissolução da amostra. Adicionalmente, a presente invenção descreve o desenvolvimento de um aparato dissolutor que

tem por objetivo resolver a problemática relacionada a realização do ensaio de dissolução para pequenas amostras, resultantes em sua maioria da produção de formas farmacêuticas pulverulentas de micro- e nanopartículas.

**[0020]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um método de dissolução de pós que compreende as etapas de:

- a. obtenção de uma amostra pulverulenta;
- b. preparação de um pó coeso a partir da amostra pulverulenta;
- c. inserção da amostra em um aparato dissolutor; e
- d. realização do ensaio de dissolução.

**[0021]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um aparato dissolutor aplicado ao método de dissolução de pós descrito no presente relatório, e compreende:

- a. uma base fixa dotada de:
  - i. ao menos uma placa de agitação magnética dotada de um agitador magnético; e
  - ii. um banho de aquecimento;
- b. uma estrutura superior móvel dotada de:
  - iii. ao menos uma haste; e
  - iv. ao menos uma cesta associada a uma das extremidades da haste;

em que,

- a estrutura superior é associada à base por meio de ao menos uma guia dotada de um meio de regulagem de altura;
- a cesta é formada por um material dotado de malha;
- a cesta é intercambiável;
- a haste é alinhada a placa de agitação magnética; e
- a temperatura do banho de aquecimento é regulável.

**[0022]** Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados versam sobre um método e um aparato de dissolução

capazes de realizar a dissolução de fármacos sólidos e/ou formulações farmacêuticas pulverulentas (coesas ou não).

**[0023]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

#### **Breve Descrição das Figuras**

**[0024]** São apresentadas as seguintes figuras:

**[0025]** A figura 1 mostra uma imagem do pó coeso obtido no método da presente invenção.

**[0026]** A figura 2 mostra um gráfico dos parâmetros de diâmetro médio (D[4,3]) e distribuição das partículas (span) foram semelhantes aos parâmetros do pó inicial, indicando que o processo de coesão do pó ocorre de modo reversível.

**[0027]** A figura 3 mostra uma análise microscópica, em aumentos de 2000x e 10000x, evidenciando que não ocorreu modificação na morfologia das partículas após a compactação do pó livre em um pó coeso.

**[0028]** A figura 4 mostra um gráfico da porcentagem de fármaco recuperado.

**[0029]** A figura 5 mostra os resultados para os ensaios de dissolução utilizando Ringer e Fluido Pulmonar Simulado (FPS) do pó contido em cápsulas de gelatina dura.

**[0030]** A figura 6 mostra os resultados para os ensaios de dissolução com o pó coeso em cinco meios diferentes (Ringer, Fluido Pulmonar Simulado - FPS, Fluido Alveolar Simulado - FAS, Fluido Gástrico Simulado - FGS e Fluido Intestinal Simulado – FIS), observando-se diferentes perfis de liberação entre os meios testados, com baixo desvio padrão.

**[0031]** A figura 7 mostra uma vista frontal de uma concretização da presente invenção.

**[0032]** A figura 8 mostra uma vista de uma concretização da cesta do aparato da presente invenção, sendo a dita cesta bipartida.

**[0033]** A figura 9 mostra uma vista frontal da estrutura superior do aparato da presente invenção.

**[0034]** A figura 10 mostra uma vista inferior da estrutura superior da figura 9.

**[0035]** A figura 11 mostra uma vista lateral da estrutura superior da figura 9.

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0036]** As descrições que se seguem são apresentadas a título de exemplo e não limitativas ao escopo da invenção e farão compreender de forma mais clara o objeto do presente pedido de patente.

**[0037]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um método de dissolução de pós que compreende as etapas de:

- a. obtenção de uma amostra pulverulenta;
- b. preparação de um pó coeso a partir da amostra;
- c. inserção da amostra em um aparato dissolutor; e
- d. realização do ensaio de dissolução;

Em uma concretização, a preparação do pó coeso é realizada por meio da prensagem da amostra pulverulenta.

**[0038]** A utilização da amostra em forma de pó coeso permite a realização do ensaio de fármacos pouco solúveis, que tendem a flutuar e ou flocular durante o ensaio, descartando a necessidade de introduzir o fármaco em um meio de confinamento que alteraria os resultados obtidos no ensaio, ou seja, o pó coeso dispensa utilização de meios de confinamento (como cápsulas de gelatina dura), utilização de surfactantes ou enzimas, podendo ser utilizado em sua forma sem alteração da formulação, ausência de flutuação devido à coesão das partículas, grande área de contato com o meio dissolutor

**[0039]** A amostra em forma de pó coeso deve ser introduzida em uma cesta, pois desta forma a mesma se mantém submersa durante o ensaio. O aparato utilizado preferencialmente deve compreender uma cesta intercambiável, pois o estado de pó coeso é frágil e deve ser manipulado cuidadosamente para que a formulação não retorne ao estado de pó (não coeso). A utilização de cesta intercambiável descarta a utilização de confinamento da amostra em cápsulas de gelatina dura, tensoativos ou âncoras.

**[0040]** A preparação do pó coeso a partir da amostra pulverulenta é realizada por meio da prensagem da amostra pulverulenta, sendo que os parâmetros de prensagens como número de prensagens, força de prensagem e altura inicial de prensagem variam de acordo com as características da amostra pulverulenta, sendo as características divididas entre os grupos: fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, fármacos solúveis ou muito solúveis em água e a variação mássica da amostra, preferencialmente de 10, 20 e 30 mg.

**[0041]** Em uma concretização, a prensagem da amostra pulverulenta compreende de 2 a 10 prensagens com força variando entre 6300N e 6700N, sendo a primeira prensagem com altura do aparato de prensagem de 100mm e a(s) prensagem(ns) seguinte(s) com altura inicial de 90mm.

**[0042]** Em uma concretização, foi utilizado uma forma farmacêutica contendo adjuvantes como L-Lisina e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), e para a obtenção da amostra em forma de pó coeso a prensagem compreendeu 3 prensagens com força de 6400N, a primeira prensagem com altura do aparato de prensagem de 100mm e as 2 prensagens seguintes com altura inicial de 90mm.

**[0043]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um aparato dissolutor aplicado no método de ensaio de dissolução de pós descrito no presente relatório e compreende:

- a. uma base fixa dotada de:

- v. ao menos uma placa de agitação magnética (1) dotada de um agitador magnético (2); e
- vi. um banho de aquecimento (3);
- b. uma estrutura superior móvel (4) dotada de:
  - vii. ao menos uma haste (5); e
  - viii. ao menos uma cesta (6) associada a uma das extremidades da haste (5);

em que,

- a estrutura superior móvel (4) é associada à base por meio de ao menos uma guia (7) dotada de um meio de regulação de altura (8);
- a cesta (6) é formada por um material dotado de malha;
- a cesta (6) é intercambiável;
- a haste (5) é alinhada a placa de agitação magnética (1); e
- a temperatura do banho de aquecimento (3) é regulável.

**[0044]** A base compreende ao menos uma placa de agitação magnética (1), dotada de um agitador magnético (2) e controle de rotação, e um banho de aquecimento (3). A base forma, em sua parte superior, um volume separado para o banho de aquecimento (3), sendo que, suas superfícies laterais devem ser confeccionadas com material transparente e inerte. A placa de agitação magnética (1) é associada à base, abaixo do banho de aquecimento (3), não ocupando o volume voltado ao banho de aquecimento (3).

**[0045]** O banho de aquecimento (3) compreende controle de temperatura, capaz de manter a temperatura constante dentro de uma faixa de variação. Em uma concretização, a faixa de variação de temperatura é de 0,5°C.

**[0046]** A estrutura superior móvel (4) é associada à base por meio de ao menos uma guia (7) dotada de ajuste de altura (8). A guia (7) permite a movimentação relativa da estrutura superior (4) em relação à base na direção do eixo Y representado nas figuras. Ao menos uma haste (5), de material inerte, é associada à estrutura superior móvel (4), sendo que a haste (5) é

posicionada paralela à guia (7), ainda a haste (5) compreende fixa em sua extremidade, oposta a associada á estrutura (4), uma cesta (6), sendo a dita cesta (6) intercambiável.

**[0047]** Em uma concretização, a guia (7) compreende uma estrutura vazada associada à base e uma haste associada à estrutura superior (4) e posicionada no interior da estrutura vazada.

**[0048]** A cesta (6) é formada por um material dotado de malha, sendo que o tamanho das aberturas da malha (mesh) é selecionado de acordo com o componente da amostra do teste. Ainda, deve ser selecionado um material inerte para a confecção da cesta (6), para que a cesta não interfira no resultado do teste.

**[0049]** Em uma concretização, a cesta (6) compreende formato esférico, compreendendo diâmetro de 18mm para testes com cápsulas número 0 a 1, comprimidos e formas farmacêuticas menores que 18mm e compreendendo diâmetro de 40mm para testes com cápsulas número 2 a 5, comprimidos e formas farmacêuticas maiores que 18mm.

**[0050]** Em uma concretização, para testes de pós ou pequenas formas farmacêuticas onde o tamanho da abertura da cesta (6) possa influenciar no resultado ou fazer com que ocorra flutuação dos componentes a cesta (6) compreende abertura de 0,1mm (150 mesh). Para as demais amostras a cesta (6) compreende abertura de 0,4mm (40 mesh).

**[0051]** Em uma concretização, o aparato compreende a utilização de um recipiente de ensaio (9). Em concretizações preferenciais, os recipientes de ensaio (9) são Becker que variam de 50 a 1000ml.

**[0052]** Em uma concretização, o recipiente de ensaio (9) compreende uma tampa (10).

**[0053]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

1. Método de dissolução de pós **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:
  - a. obtenção de uma amostra pulverulenta;
  - b. preparação de um pó coeso a partir da amostra pulverulenta;
  - c. inserção da amostra em um aparato dissolutor; e
  - d. realização do ensaio de dissolução.
2. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato da preparação do pó coeso ocorrer por meio de prensagem da amostra pulverulenta.
3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2 **caracterizado** pelo fato da prensagem da amostra pulverulenta compreender de 2 a 10 prensagens com força variando entre 6300N e 6700N, sendo a primeira prensagem com altura do aparato de prensagem de 100mm e a(s) prensagem(ns) seguinte(s) com altura inicial de 90mm.
4. Aparato dissolutor **caracterizado** pelo fato de ser aplicado ao método de dissolução de pó seco conforme descrito nas reivindicações de 1 a 3 e compreender:
  - a. uma base fixa dotada de:
    - i. ao menos uma placa de agitação magnética (1) dotada de um agitador magnético (2); e
    - ii. um banho de aquecimento (3);
  - b. uma estrutura superior móvel (4) dotada de:
    - i. ao menos uma haste (5); e
    - ii. ao menos uma cesta (6) associada a uma das extremidades da haste (5);

em que,

- a estrutura superior móvel (4) é associada à base por meio de ao menos uma guia (7) dotada de um meio de regulagem de altura (8);
  - a cesta (6) é formada por um material dotado de malha;
  - a cesta (6) é intercambiável;
  - a haste (5) é alinhada a placa de agitação magnética (1); e
  - a temperatura do banho de aquecimento (3) é regulável.
5. Aparato dissolutor de acordo com a reivindicação 4 **caracterizado** por compreender a utilização de um recipiente de ensaio (9).
6. Aparato dissolutor de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado** pelo recipiente de ensaio (9) compreender uma tampa (10).

**Resumo**

**MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE PÓS E APARATO DISSOLUTOR**

A presente invenção descreve um método de dissolução de pós e um aparato de dissolução capaz de conduzir o presente método. Especificamente, a presente invenção compreende um método que envolve uma etapa de preparação de um pó coeso por meio de etapas de prensagem, onde a utilização do pó coeso no aparato dissolutor exclui a necessidade de uma cápsula gelatinosa dura ou aditivos no meio de dissolução, que ocasionam variações nos resultados de dissolução. A presente invenção se situa nos campos do desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos.

1/5

### FIGURAS



Figura 1

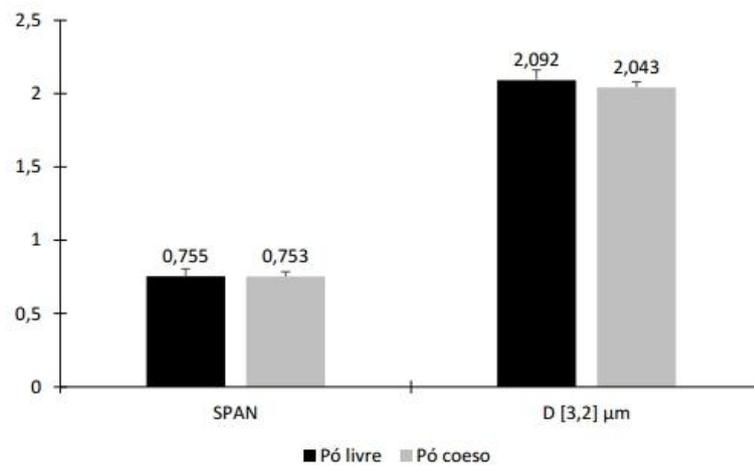


Figura 2

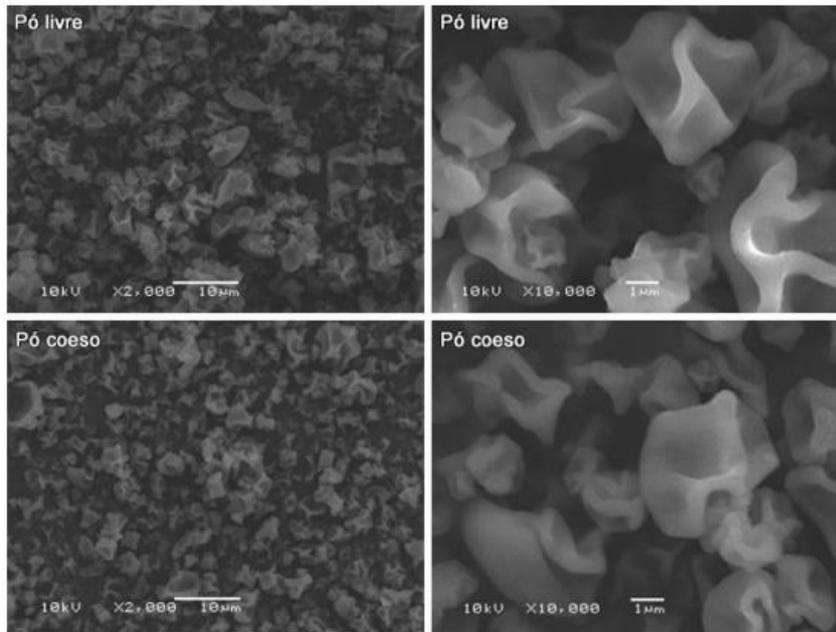


Figura 3

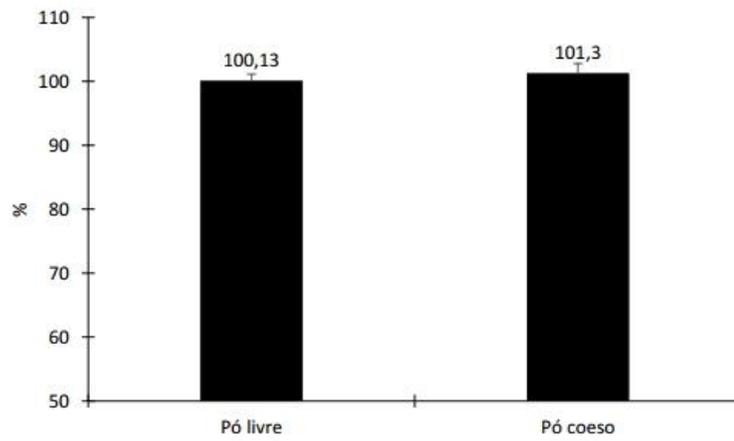


Figura 4

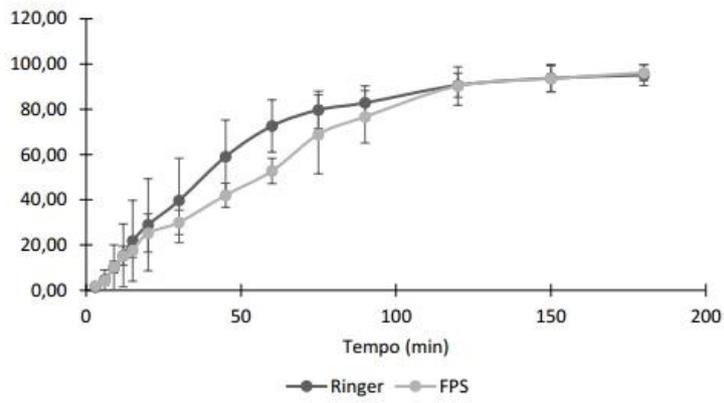


Figura 5

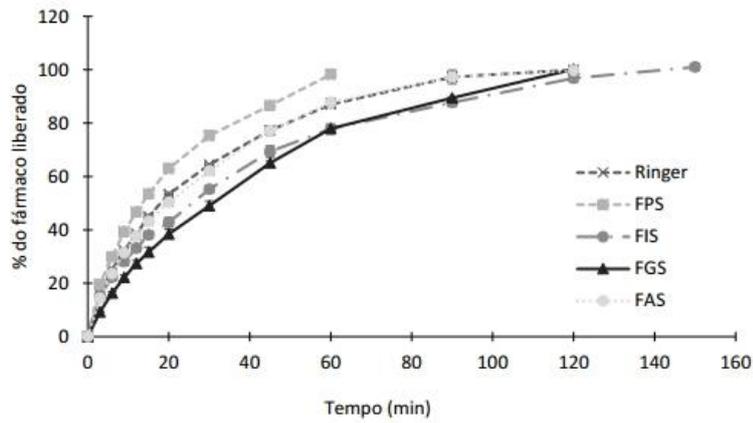


Figura 6

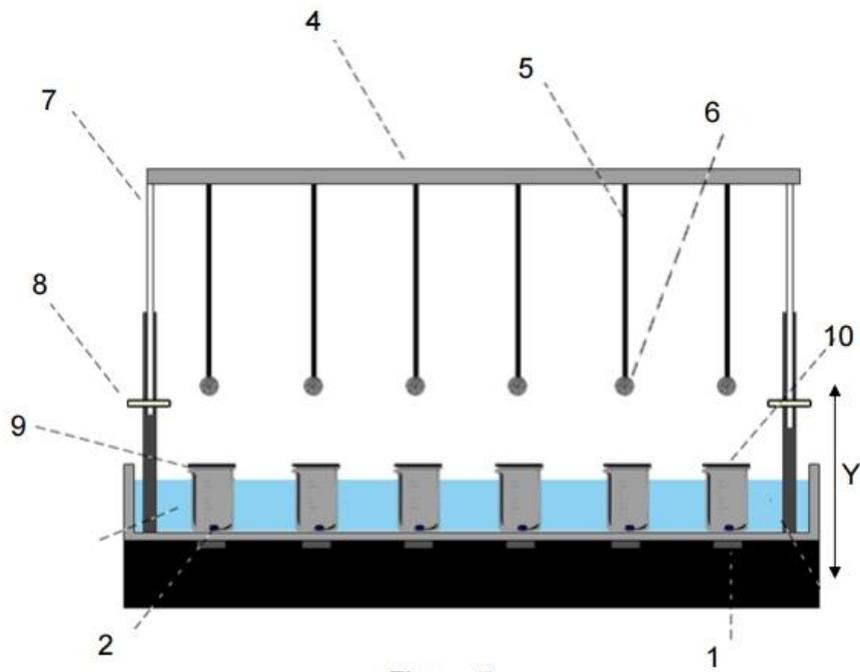


Figura 7

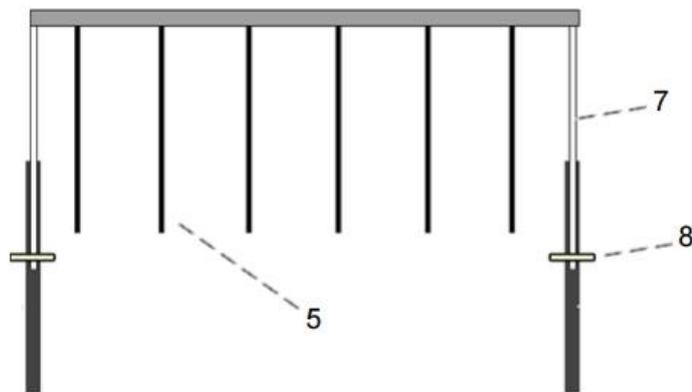
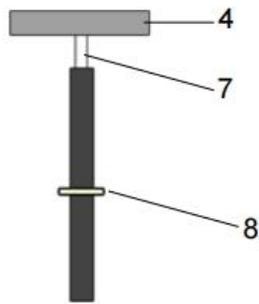
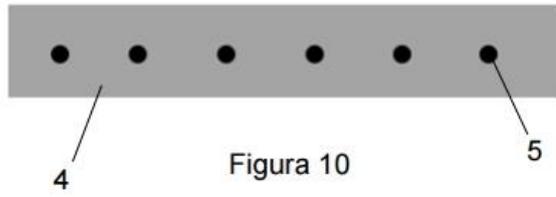


Figura 9



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

Solicitação de depósito de patente sob número BR1020190157356 pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Algumas partes foram omitidas pois aparecem no texto da tese.

1/41

#### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE  
MICROPARTÍCULA E USO DA COMPOSIÇÃO PARA TRATAMENTO DA  
TROMBOSE

#### **Campo da Invenção**

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

#### **Antecedentes da Invenção**

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

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

**[0004]** O tratamento e prevenção de eventos trombóticos geralmente se dá pela administração do ácido acetilsalicílico (AAS), um antiagregante plaquetário clássico, associado ao clopidogrel ou outro agente antiagregante plaquetário (ALTMAN, 2004; ALTMAN; RIVAS & GONZALEZ, 2012, ANGIOLILLO & FERREIRO, 2013; CASADO-ARROYO; SOSTRES & LANAS, 2013 e ITTAMAN; VANWORMER & REZKALLA 2014). Contudo, os problemas inerentes ao uso

crônico do AAS chamam atenção, pois está associado à maior risco de complicações gastrointestinais, como úlceras e sangramentos que levam a desistência do tratamento, conforme relatado anteriormente (ANGIOLILLO, 2013.; CHOI & KIM, 2013.; KUNADIAN, 2013 e EL-HAYEK, 2014).

**[0005]** Diversas formas farmacêuticas do AAS estão disponíveis no mercado, desde os comprimidos convencionais (SALLUM, 2014), e até mesmo formulações revestidas (HAASTRUP, GRØNLYKKE & JARBØL, 2015 e GOLDSTEIN, 2016) e de liberação controlada (BLIDEN, 2016) a fim de superar esses efeitos adversos que muitas vezes ocasionam uma alta taxa de desistência do tratamento, principalmente em pacientes que precisam de terapia contínua.

**[0006]** O ácido acetilsalicílico (AAS), um dos antiagregantes plaquetários mais antigos e, conseqüentemente, um dos poucos com estudos de toxicidade em longo prazo apresenta uma ampla utilização e é listado pela organização mundial de saúde (OMS) como medicamento essencial, devido sua segurança e eficácia.

**[0007]** O risco atrelado ao seu uso relaciona-se diretamente com a administração crônica por via oral, já que pacientes com úlceras, gastrite e outros problemas gastrointestinais necessitam de acompanhamento médico ou utilização de medicamentos mucoprotetores em conjunto.

**[0008]** Sørensen e colaboradores (2000) realizaram um estudo de corte sobre a utilização de AAS com e sem revestimento em baixas doses (100 ou 150 mg). Os resultados expressos demonstraram que o revestimento não foi eficaz quanto à prevenção de mucosites, com incidência de quadros hemorrágicos ligeiramente maiores o que corrobora o estudo realizado por Kelly e colaboradores (1996), que evidenciou um aumento do risco hemorrágico em pacientes que fizeram uso do AAS revestido ou tamponado. Com isso, percebe-se a importância do desenvolvimento de uma formulação capaz de superar esses efeitos adversos.

**[0009]** Esses quadros hemorrágicos são a grande problemática associada ao tratamento/prevenção de eventos trombóticos em pacientes que utilizam AAS,

levando a diversas sociedades regularem sua utilização, versando também sobre o tratamento recomendado.

**[0010]** Por exemplo, para eventos trombóticos primários, a American Heart/Stroke Association e American College of Chest Physicians recomendam doses de AAS apenas se o benefício superar os riscos dos efeitos adversos. Já a European Society of Cardiology recomenda apenas para pacientes com alto risco de apresentarem quadros trombóticos. Já a Canadian Cardiovascular Society não recomenda sua utilização.

**[0011]** Em relação a eventos trombóticos secundários, todos entram no consenso de que é necessária utilização de pequenas doses de AAS de forma regular (crônica). Diversos estudos clínicos, de 1988 a 2010 tentaram determinar a dose ótima para efeito antitrombótico do AAS sem danos no trato gastrointestinal, com variações de 75 a 500 mg/dia. Os resultados para doses menores que 100 mg/dia foram os mais satisfatórios, embora ainda tenha sido relatado desistência do tratamento devido principalmente à quadros hemorrágicos.

**[0012]** Diversas formas farmacêuticas do AAS estão disponíveis no mercado, como os comprimidos convencionais, comprimidos revestidos e formas farmacêuticas de liberação controlada, todas desenvolvidas com o objetivo de ultrapassar os efeitos adversos inerentes ao fármaco que por vezes culminam em alta taxa de desistência do tratamento, principalmente em pacientes que precisam de terapia contínua.

**[0013]** Em 2017, Lefrançais e colaboradores publicaram um artigo inédito evidenciando que os pulmões são os locais mais importantes de biogênese das plaquetas, refutando que a medula óssea era o principal órgão de produção.

**[0014]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0015]** O documento Clinical benefit of continuous nebulised Aztreonam Lysine for Inhalation (AZLI) in adults with cystic fibrosis—a retrospective cohort study, 2017 de Morton et al., revela a utilização de lisina como mediador biocompatível

e biodegradável para interagir com os grupamentos iônicos do AAS e fucoidana. O documento se difere da presente invenção quanto ao uso pretendido e quanto a formulação.

**[0016]** O documento Aspirin desensitization in patients with aspirin-induced and aspirin-tolerant asthma: a double-blind study, 2014 de Swierczyńska-Krępa et al., revela o uso em conjunto de ácido acetilsalicílico e lisina por via pulmonar para diagnóstico de pacientes com hipersensibilidade a AAS (asma induzida). O documento se difere da presente invenção quanto ao uso pretendido e por não apresentar formulação farmacêutica.

**[0017]** O documento Macromolecular prodrugs of aspirin with HPMC: A nano particulate drug design, characterization, and pharmacokinetic studies, 2011 de Hussain et al., relata a síntese de um pró-fármaco macromolecular HPMC-ASP para a melhoria de diversos perfis de biodisponibilidade. O documento se difere da presente invenção quanto formulação farmacêutica e uso pretendido da composição.

**[0018]** O documento A promising oral fucoidan-based antithrombotic nanosystem: development, activity and safety, 2018 de Da Silvia et a., revela a produção de nanopartículas de quitosana e fucoidana observando o seu perfil trombótico isolado. O documento se difere da presente invenção quanto a espécie de origem da fucoidana, quanto a formulação farmacêutica e quanto ao uso pretendido da composição.

**[0019]** O documento WO2016019253A9 revela a utilização de aspirina para tratamentos de quadros tromboembólicos através da via pulmonar, definindo doses, valores e modo de administração. O documento difere-se da presente invenção, pois embora utilize a mesma via (pulmonar), ele correlaciona uma formulação totalmente diferente, com diferentes concentrações de AAS, adjuvantes não citados, promotor de liberação prolongada e outro ativo farmacológico.

**[0020]** O documento US5576024A comenta o uso de aspirina e um promotor de liberação prolongada, entretanto, se difere da presente invenção pelo

**[0113]** ZATTA, K. C. *et al.* An Inhalable Powder Formulation Based on Micro- and Nanoparticles Containing 5-Fluorouracil for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Nanomaterials* 8(2): 75, 2018.

**[0114]** ZELIKIN, A. N.; EHRHARDT, C.; HEALY, A. M. Materials and methods for delivery of biological drugs. *Nat. Chem.* 8(11): 997, 2016.

**[0115]** ZHANG, Y. Apixaban for oral antithrombotic therapy: is a new era coming? *Mol. Cell. Ther.* 2(1): 4, 2014.

**[0116]** ZHAO, X. *et al.* Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb. Res.* 144(: 46–52, 2016.

**[0117]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

#### **Sumário da Invenção**

**[0118]** Dessa forma, diante destas afirmações, visando à administração do medicamento por via pulmonar a fim de diminuir os efeitos adversos e com possível redução de dose, foi desenvolvida uma inovadora formulação farmacêutica de micropartículas de liberação controlada para tratamento crônico ou agudo de quadros trombóticos para administração pulmonar sítio-específico.

**[0119]** As partículas foram desenvolvidas utilizando hidroxipropilmetilcelulose (HPMC F4M) como polímero, um promotor de bioadesão e liberação prolongada, contendo o AAS, como antiagregante plaquetário, associado à fucoidana extraída da espécie *Aschophyllum Nodosum*, tornando a partícula alvo-específico e com atividade nos processos de adesão e agregação plaquetária, pois a mesma possui seletividade para P-selectina (expressa em locais altamente trombogênicos, por exemplo, lesão endotelial e plaquetas ativadas).

**[0120]** A presente invenção apresenta diversas vantagens como: a microestruturação das partículas de AAS baseada nos conceitos de nanotecnologia: resultados relacionados ao aumento do tempo de meia-vida,

capacidade de retenção e permeação mucosal, propriedades bioadesivas e de liberação prolongada, que poderão favorecer a redução e frequência da dose administrada.

**[0121]** Outra vantagem da presente invenção se refere a modificação da via de administração que causa a redução dos efeitos de primeira passagem, maior aceitação de pacientes crônicos, ação no local de biogênese e reservatório de plaquetas. Recentemente foi realizado um estudo (LEFRANÇAIS *et al.* 2017) onde evidenciava os pulmões como os locais mais importantes de biogênese das plaquetas, refutando que a medula óssea era o principal órgão de produção. Com isso, além da via pulmonar ser um local de acesso sistêmico para fármacos, a inibição das plaquetas no pulmão pode ser uma terapia de grande valor.

**[0122]** A associação com um polissacarídeo natural (Fucoidana extraída da espécie *Aschophyllum Nodosum*): esta associação pode ser benéfica no que tange o perfil antitrombótico, devido à atividade da mesma nos processos de adesão e agregação plaquetária.

**[0123]** Considerando esses pontos, é possível perceber que, se trata de uma terapia inovadora para tratamento de quadros trombóticos pela via pulmonar, excluindo assim todos os efeitos indesejados causados pela administração por via oral (quadros hemorrágicos e piora de úlceras), diminuindo a taxa de desistência relacionada com tratamentos mais prolongados.

**[0124]** Ainda, relacionado à via oral, o efeito de primeira passagem no fígado faz com que seja necessária uma dose maior de fármaco administrado, diferente do que ocorre no pulmão, no qual este mecanismo é reduzido.

**[0125]** Relacionado à facilidade de administração, o proposto pode ser utilizado com diversos dispositivos já disponíveis no mercado e de fácil aceitação.

**[0126]** Tratamento de quadros trombóticos arteriais, primários ou secundários, agudo ou crônico (múltiplas administrações) caso o fármaco de escolha for um antiagregante plaquetário como o AAS e, no caso da utilização de anticoagulantes, quadros trombóticos venosos.

**[0127]** O *escale up* industrial pode ser facilmente realizado, sendo passível de

comercialização.

**[0128]** A presente invenção apresenta como conceito inventivo os seguintes objetos:

**[0129]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta a composição farmacêutica que compreende micropartículas que compreendem ácido acetilsalicílico, L-Lisina, hidroxipropilmetilcelulose e fucoidana.

**[0130]** A presente invenção apresenta como segundo objeto o processo de preparação de micropartícula compreendendo as etapas de:

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

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

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

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

e) secagem da mistura por aspersão; e

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

**[0131]** Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso da da composição farmacêutica, para preparar um medicamento para tratar a trombose.

**[0132]** Em um quarto objeto, a invenção é utilizada com outros fármacos antiagregantes plaquetários, em conjunto ou não, tendo como exemplos clopidogrel, cangrelor, ticagrelor, elinogrel, abciximab, eptifibatida, tirofiban, terutroban, picotamida, vorapaxar, atopaxar, dipiridamol e cilostazol.

**[0133]** Em um quinto objeto, a invenção é utilizada com fármacos anticoagulantes, em conjuntos ou não, tendo como exemplos, o apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban, edoxaban, hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban e dabigatran.

**[0134]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

**Descrição Detalhada da Invenção**

**[0161]** A presente invenção provê micropartículas contendo ácido acetilsalicílico, fucoidana, L-lisina e um promotor de liberação controlada para administração em via respiratória, diminuindo os riscos de aparecimento ou agravamento de úlceras, gastrites e outros problemas gastrointestinais.

**[0162]** As micropartículas são, ainda, para uso em eventos trombóticos.

**[0163]** Os materiais não definidos como ativos farmacológicos, ou seja, inertes, não apresentam nenhuma atividade relacionada com o tratamento de quadros trombóticos. Contudo, a L-lisina, além de agir como ligante para a formação da partícula é um aminoácido essencial que está presente na formulação com atividade secundária de aumentar a resistência vascular, regeneração tecidual, aumenta imunidade e potencial atividade anti-mucosite.

**[0164]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta a composição farmacêutica que compreende micropartículas que compreendem ácido acetilsalicílico, L-Lisina, hidroxipropilmetilcelulose e fucoidana.

**[0165]** Em uma concretização a micropartícula compreende um diâmetro de partícula de 1 a 5  $\mu\text{m}$ .

**[0166]** Em uma concretização a composição compreende 18 a 24% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 35 a 42% dos sólidos totais de L-Lisina, 35 a 42% dos sólidos totais de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e 0,5 a 3% dos sólidos totais de fucoidana.

**[0167]** Em uma concretização a presente composição farmacêutica compreende 0,15g ou 19,87% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 0,3g ou 39,74% dos sólidos totais de L-Lisina, 0,3g ou 39,74% dos sólidos totais de HPMC e 0,005g ou 0,66% dos sólidos totais de fucoidana.

**[0168]** Em uma concretização da composição, a fucoidana é proveniente de *Aschophyllum Nodosum*.

**[0169]** Em uma realização da composição, compreende-se por ser na forma pulverulenta.

**[0170]** Em um segundo objeto a presente invenção revela o processo de

### Reivindicações

**As reivindicações aqui apresentadas são uma versão prévia, sendo sujeitas a alterações de acordo com o recebimento das informações adicionais solicitadas.**

1. Composição farmacêutica, **caracterizada** por compreender micropartículas que compreendem ácido acetilsalicílico, L-Lisina, hidroxipropilmetilcelulose e fucoidana.

2. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender, em substituição ao ácido acetilsalicílico, outros fármacos antiagregantes plaquetários, em conjunto ou não, tendo como exemplos clopidogrel, cangrelor, ticagrelor, elinogrel, abciximab, eptifibatida, tirofiban, terutroban, picotamida, vorapaxar, atopaxar, dipiridamol e cilostazol.

3. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender, em substituição ao ácido acetilsalicílico, outros fármacos anticoagulantes, em conjunto ou não, tendo como exemplos o apixaban, rivaroxaban, otamixaban, betrixaban, edoxaban, hirudina, lepirudina, bivalirudina, ximeligatran, argatroban e dabigatran.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pela micropartícula compreender um diâmetro de partícula de 1 a 5 µm.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** por compreender 18 a 24% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 35 a 42% dos sólidos totais de L-Lisina, 35 a 42% dos sólidos totais de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e 0,5 a 3% dos sólidos totais de fucoidana.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3 **caracterizada** por compreender 0,15g ou 19,87% dos sólidos totais de ácido acetilsalicílico, 0,3g ou 39,74% dos sólidos totais de L-Lisina, 0,3g ou 39,74% dos sólidos totais de HPMC e 0,005g ou 0,66% dos sólidos totais de fucoidana.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pela

fucoïdãna ser extraída de *Aschophyllum Nodosum* ou polissacarídeo sulfatado extraído de qualquer alga, apresentando inibiçãõ da P-selectina, sem afetar significativamente na coagulaçãõ sanguínea e agregaçãõ plaquetária

6. Composiçãõ, de acordo com a reivindicaçãõ 1, **caracterizado** por ser na forma pulverulenta.

7. Processo de preparaçãõ de micropartícula, conforme definido em qualquer uma das reivindicaçãões anteriores **caracterizado** por compreender as etapas de:

a) misturar soluçãõ de L-lisina, água ultrapura e propilenoglicol 2%, caso fármaco com hidrólise acentuada sob agitaçãõ magnética moderada ou

a.2) misturar soluçãõ de L-lisina e água ultrapura;

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

c) adiçãõ da soluçãõ obtida na etapa b) na soluçãõ obtida na etapa a) lentamente, sob agitaçãõ magnética;

d) adiçãõ de soluçãõ de fucoïdãna à mistura sob agitaçãõ;

e) secagem da mistura por aspersãõ; e

f) adiçãõ da dispersãõ de hidroxipropilmetilcelulose, previamente preparada, à mistura.

8. Processo, de acordo com a reivindicaçãõ 7, **caracterizado** pela etapa

a) compreender:

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

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

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

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

9. Processo, de acordo com a reivindicaçãõ 7, **caracterizado** pela etapa

b) compreender:

- AAS na faixa de 18 a 24%, mais preferencialmente 19,87%;

- água ultrapura na faixa de 1 a 5 mL, mais preferencialmente 2 mL;

- acetona na faixa de 1 a 5 mL, mais preferencialmente 2 mL;
- a etapa ocorrendo no tempo de 1 minuto OU

Em caso de fármaco muito solúvel em água:

- b.2) – antiagregante plaquetário ou anticoagulante na faixa de 18 a 24%, mais preferencialmente 19,87%;
- água ultrapura na faixa de 2 a 8 mL, mais preferencialmente 4 mL;
- a etapa ocorrendo no tempo de 1 minuto

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela etapa c) compreender agitação por 3 a 10 minutos, mais preferencialmente a 5 minutos.

**[0269]** 10. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela etapa d) compreender agitação por 3 a 10 minutos, mais preferivelmente por 5 minutos e fucoidana na faixa de 0,5 a 3%, mais preferivelmente 0,66%.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela etapa e) compreender:

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

12. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela etapa f) compreender preparação da dispersão de HPMC, em que adiciona-se HPMC em água ultrapura sob agitação magnética moderada, posteriormente mantida refrigerada durante a noite a uma temperatura de 2 a 10 °C, mais preferencialmente a 4°C).

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** por

compreender:

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

- água ultrapura na faixa de 30 a 40 mL, mais preferivelmente 37 mL;

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

14. Uso da composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento para tratar a trombose.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelos eventos trombóticos serem quadros trombóticos arteriais primários ou secundários, agudo ou crônico e quadros trombóticos venosos.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, **caracterizada** por ser para administração nasal.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pela administração da composição em pó utilizar um aparato e/ou dispositivo.

## 10.4 ARTIGO PRONTO PARA SUBMISSÃO

O artigo apresenta algumas referências suprimidas pois são as mesmas utilizadas na presente tese.

**A modified method for dissolution assays using compressed powder microparticles containing Methocel® (HPMC F4M) as excipient for a poorly water-soluble drug**

**ABSTRACT**

Dissolution tests are carried out to predict drug profile of powder formulations in different simulated media. In this context, there are several problems regarding this method, such as gelatin cross-link and pellicle formation, which slows de dissolution and shows the need of novel approaches. In this work, we describe a modified, simple and reproducible method to determine dissolution profiles of powder microparticles containing Methocel® (HPMC F4M) as excipient produced by micro-atomization with Spray-Drying technique (Mini Spray-Dryer B-290 (Buchi®) and compressed using a Texturometer (TA.XT *plus* Texture Analyzer - Stable Micro Systems®) to obtain compressed powders. Although compression methods already exist (i.e. tablets and briquettes, where the final product needs a variety of different excipients or filler-binders, which modifies the formulation composition) our goal was not to modify the density, size, excipients or form compressed powders as final formulations, since the final product desired is the powder itself. For results, compressed microparticle formulations showed similar characteristics, such as diameter, scanning electron microscopy images and drug recovery when compared to the non-compressed dry powder microparticles. For dissolution profile, contrasting with the poor results observed with the gelatin capsules, good reproducibility and repeatability were obtained for the proposed method, which were submitted to the Brazilian Patent and Trademark Office (INPI) under number BR1020180090933. In conclusion, the compressed powder microparticles containing Methocel® (HPMC F4M) as excipient showed to be simple, low cost, and reproducible allowing us to observe dissolution profiles of the formulations in four different media when compared to powders in gelatin capsules.

**ABBREVIATIONS**

Methocel® (HPMC F4M) – HPMC

Compressed powder microparticles using HPMC F4M as excipient – MP/F4M C

D[3,2] – surface area mean diameter

Microparticles powders using HPMC F4M as excipient – MP/F4M

MSC – model selection criterion

Scanning electron microscope – SEM

Simulated Gastric Fluid – SGF

Simulated Intestinal Fluid – SIF

Simulated Lung Fluid – SLF

Span – particle dispersion

HPLC – high pressure liquid chromatography

## INTRODUCTION

Dissolution via USP apparatus has a major role to predict drug release profiles <sup>1-5</sup>. This assay combined with other equipment, like high pressure liquid chromatography (HPLC), is used to observe several aspects of pharmaceutical products, such as pH influence and drug concentration <sup>6-10</sup>.

In this context, USP monographs show methodologies and modifications for dissolution apparatus, using baskets, flow-through cell, paddle and paddle over disk <sup>11</sup>.

Currently, new design of these apparatus for better dissolution of pharmaceutical products, via multicompartiment models or different types of stress (hydrodynamic or mechanical) are being used <sup>12,13</sup>, but they all fall in the same problems observed for USP apparatus: drug cross-linking with gelatin capsules leading to high standard deviations<sup>14-16</sup>.

Digenis et al. (1994) observed that the bioavailability of a drug inside capsules is different when using a fresh or longstanding ones, indicating that formulations in drug-delivery systems needs attention, with the same described by Lu & Shah (2017) <sup>14,17</sup>.

Furthermore, USP-PF-40 define drug cross-linking with gelatin capsules as: *“formation of strong chemical linkages beyond simple hydrogen and ionic bonding*

*between gelatin chains*" and this can occur because excipients or drugs used, leading to incomplete dissolution of components, insufficient drug release and *in vivo* problems <sup>17</sup>.

Still, there are several modifications in the medium that allows to lower these problems reported in literature, i.e adding enzymes (pepsin, pancreatin, papain, bromelain), pre-treat the medium and HPMC shells (cross-link not reported) instead of gelatin capsules<sup>17</sup>.

Marques (2014) agreed with these findings, whereas recommend using enzymes and develop new dissolution methods to overcome these problems. Moreover, literature describes that long-term storage in gelatin capsules can influence the dissolution profile <sup>18</sup>.

Several articles are using hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) as excipient to drug-delivery systems, since it is a hydrophilic carrier, can control the drug release and are biodegradable/biocompatible <sup>16,19-22</sup>.

Concerning poorly water-soluble drugs and HPMC in drug-delivery systems, Ishikawa et al. (2000) showed sustained-release for tablets containing nifedipine and Gowthamarajan & Singh (2010) were the first to introduce nanotechnology to modify drug solubility since can reduce particle size, permits addition of surfactants and noncrystalline materials. For example, they showed that spray-drying technique can be used, leading to 50 % improvement on salicylic acid solubility. Nevertheless, Al-Tabakha (2010) provided very interesting results regarding HPMC capsules, but drug-delivery systems that uses HPMC in the preparation can have modified release profiles by adding more HPMC into the formulation <sup>23-25</sup>.

Compressed microparticles powders can be transformed into tablets, altering the formulation constitution adding excipients and lubricants <sup>26-28</sup> or into briquettes <sup>29,30</sup> that use filler-binders and can modify the physical properties if not under tight control parameters. As our goal was not to change powder formulation, these techniques were not suitable for our study.

Finally, there are no studies showing results or protocols to observe dissolution profiles of powders containing HPMC and poorly water-soluble drug (acetylsalicylic acid) which can cross-link with gelatin capsules. Furthermore, in this work we aim to do a simple compression to evaluate powder dissolution.

This method aims to provide solutions to these problems using a simple and reproducible process to determine dissolution profiles of microparticles powders produced by micro-atomization with Spray-Drying technique containing acetylsalicylic acid using HPMC as excipient that cannot use gelatin capsules.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **MATERIAL**

Methocel® F4M was purchased from ColorCon® (ID number: 2948 and VBN: 2F27012N13) and maintained accordingly with the product brochure. Acetylsalicylic acid (ASA) was purchased from Sigma-Aldrich® (A5376). Pepsin and Pancreatin were purchased from Sigma-Aldrich® and all other chemicals, including gelatin capsules were obtained from local vendors with certificate of analysis.

### **COMPOUNDS EVALUATED AND SPRAY-DRYING TECHNIQUE**

Firstly, a dispersion of HPMC (0,3 g - A) was prepared in ultrapure water under magnetic stirring at 37 °C for 60 minutes and maintained overnight at 4 °C. In addition, a solution (B) was prepared mixing L-lysine (0,3 g) and ASA (0,3 g) in ultrapure water at room temperature for 60 minutes. Then, solution A was spilled in solution B, denominating MP/F4M.

Finally, powder microparticles formulation MP/F4M (HPMC concentration: 39.74%) was obtained via spray-drying using a Mini-Spray Dryer B-290 (Buchi®) with parameters described in **Table 1**.

Parameter	Values
Inlet Temperature	120°C ± 10°C
Outlet Temperature	65°C ± 10°C

Aspirator	100%
Feed rate (Pump)	15mL/min

**Table 1:** Spray-drying parameters of Mini-Spray Dryer B-290 (Buchi®)

Then, MP/F4M was collected from the equipment and stored in a closed recipient to prevent water intake by HPMC and kept in a desiccator with silica.

#### **COMPRESSION METHOD**

MP/F4M was compressed using a Texturometer (TA. XT *plus* Texture Analyzer - Stable Micro Systems®). We create compressed MP/F4M using 6400 N (newtons) since more force produced compressed powders that break upon hand contact and less force not formed compressed powder, disintegrating upon hand contact. Using 6400 N, the compressed powder was able to be held, weighted and stored prior to dissolution assays.

#### **PARTICULE SIZE ANALYZES USING LASER DIFFRACTION**

Mastersizer 2000® from Malvern Instruments® with the Scirocco 2000M attachment was used to observe powders particle size. Three batches of powders and compressed powders were analyzed. The data acquired was Span (particle distribution and D [3,2] (surface area mean diameter).

#### **SCANNING ELECTRON MICROSCOPE**

To evaluate if compressed MP/F4M maintained the microstructure and the non-compressed powder similarity, we used scanning electron microscopy (SEM) in different magnifications at 10kV. The equipment used was SEM JSM 6060 in Federal University of Rio Grande do Sul, Electron Microscopic Center (CME-UFRGS).

#### **DRUG RECOVERY**

Since compression could influence acetylsalicylic acid recovery, we compared the powder and compressed powder using HPLC. Initially, we solubilized 2 mg in 10 mL of 50:50 acetonitrile/water. After 120 minutes of sonication, the samples were filtered (0.45 µm, Millipore, USA) and analyzed using HPLC with parameters validated in our lab.

## DISSOLUTION MEDIUM AND METHOD

For dissolution assays, we used four different media (Ringer, Simulated Lung Fluid – SLF, Simulated Gastric Fluid – SGF and Simulated Intestinal Fluid – SIF) (Table 2-5):

Ringer Solution	Quantity
Sodium Chloride	8,59 g/L
Calcium Chloride	0,19 g/L
Potassium Chloride	0,30 g/L
pH	7.4

**Table 2:** Preparation of Ringer Solution, Ultrapure Water <sup>31</sup>.

SLF	Quantity
Magnesium chloride hexahydrate	0,102 g/L
Sodium chloride	5,2727 g/L
Potassium chloride	0.298 g/L
Disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	0.142 g/L
Sodium sulfate (anhydrous)	0.142 g/L
Sodium bicarbonate	2,604 g/L
Sodium acetate trihydrate	0.826 g/L
Sodium citrate dihydrate	0.098 g/L
Calcium chloride dihydrate	0.368 g/L
pH	7,4

**Table 3:** Preparation of modified SLF, pH 7,4, Ultrapure water. Slowly add the ingredients or the medium will precipitate <sup>32</sup>.

SGF	Quantity
Sodium Chloride	2,0 g/L
Pepsin (P7000 – Sigma-Audrich®)	3,2 g/L
Chloridric acid	7 mL/L
pH	1,2

**Table 4:** Preparation of modified SGF, pH 1,2, Ultrapure water <sup>32</sup>.

SIF	Quantity
Potassium phosphate monobasic	6,8 g/L
Sodium Hydroxide (0,2M)	77 mL/L
Pancreatin	10 g/L
pH	6,8

**Table 5:** Preparation of modified SIF, pH 6,8, Ultrapure water. Add Potassium phosphate and 250mL of water. Solubilize. Add 77mL Sodium Hydroxide and more 500mL of water. Solubilize and then add Pancreatin, adjusting the final volume to 1000mL <sup>32</sup>.

Initially, dissolution assays were performed in a USP Basket apparatus using 90 RPM and  $37^{\circ} \pm 0.5$  Celsius constant for 180 minutes or until 100% of the drug was released, collecting 2mL samples in pre-determined times (3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 minutes). The volume was maintained constant adding 2mL after

every sampling. Without the knowledge that our model drug inside gelatin capsule could cross-link or modify the dissolution process, we performed dissolution assays in Ringer and SLF before modifications.

All samples were filtered using a Millipore 0.4µm filter attached to a 5 mL syringe and drug concentration was determined via HPLC with parameters validated in our lab.

The dissolution medium was used in the same day to prevent precipitation or enzyme degradation and a standard curve were obtained for all these media (Ringer: R<sup>2</sup> 0,999; SLF: R<sup>2</sup> 0,998; SGF: R<sup>2</sup> 0,999 and SIF: R<sup>2</sup> 0,999). All dissolution assays respect the sink conditions previously determined.

#### **STATISTICAL ANALYSIS AND MATHEMATICAL MODELLING**

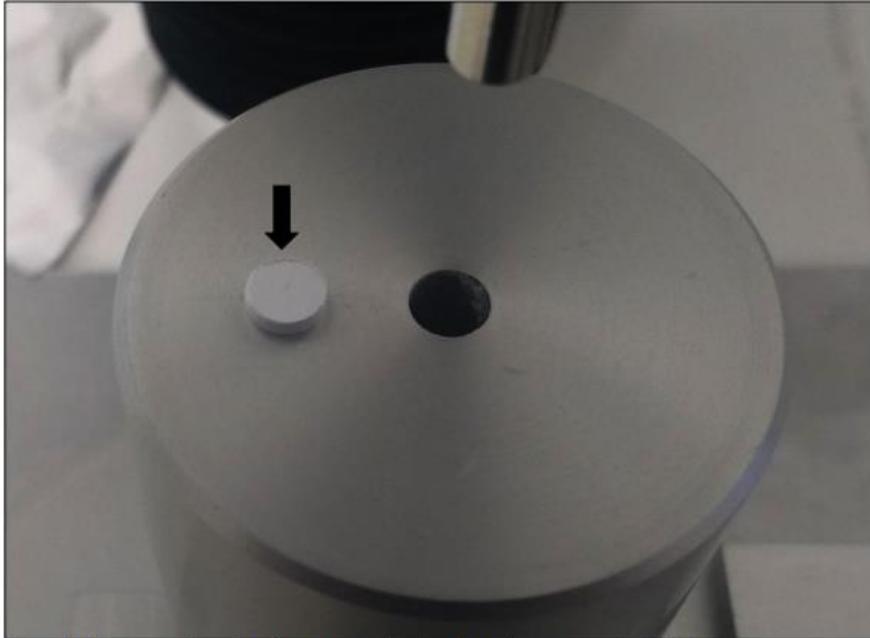
The statistical analysis was performed with ANOVA followed by Tukey test, with significant value of  $p \leq 0.05$  in the SPSS 14.0<sup>®</sup> for Windows. All results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation when applicable.

For dissolution assays, we used as base of calculation an article of Siepman and Peppas (2012) that describes HPMC mathematical modelling. The exponent n (power law) was determined and a modified Higuchi equation was used. The mathematical modelling was performed in Scientist 2.0<sup>®</sup> program (Micromath Scientific Software<sup>®</sup>)

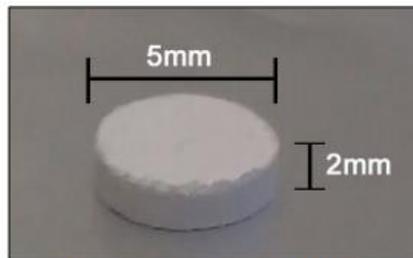
#### **RESULTS**

##### **COMPRESSION OF MP/F4M**

As can be seen in the **Figure 1** and **2**, we obtained a compressed powder with cylindrical shape (2 mm  $\pm$  0.2 weight and 5 mm  $\pm$  0.3 diameter) that was possible to handle and weight. **Figure 1** demonstrates the compressed powder right after compression with edges that are not compressed. These edges are removed carefully blowing the compressed powder and **Figure 2** illustrate the final compressed powder.



**Figure 1:** Compressed powder after compression, showing not compressed material



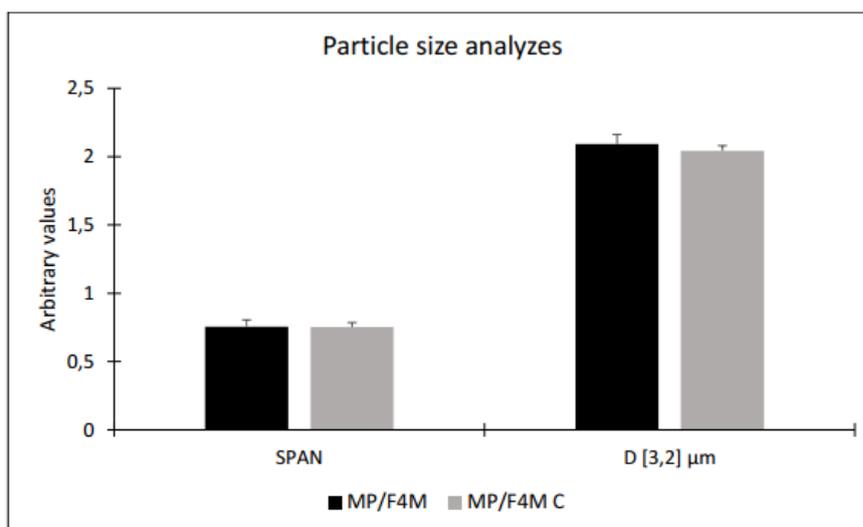
**Figure 2:** Compressed powder. Weight ( $2\text{mm} \pm 0.2$ ) and diameter ( $5\text{mm} \pm 0.3$ )

Then, the compressed powder was weighted and we obtained  $20\text{ mg} \pm 2\text{ mg}$  for ten repetitions using three different powder batches (MP/F4M  $C_A$ ,  $C_B$  and  $C_C$ ). This amount was the same inside gelatin capsules used before.

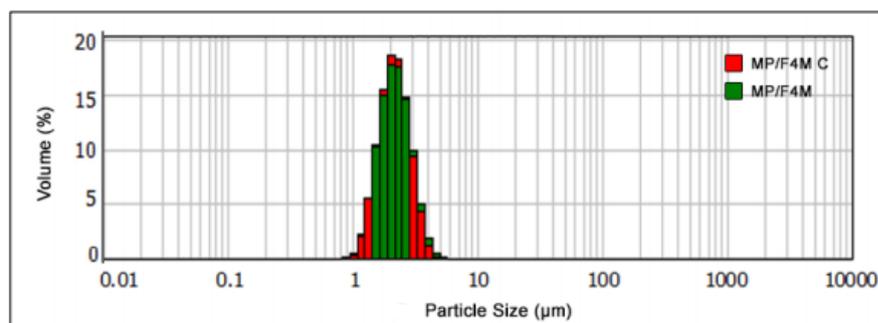
#### **PARTICULE SIZE ANALYZES WITH LASER DIFFRACTION**

No statistical differences in particle size range were observed ( $p < 0,05$ ) for compressed (MP/F4M C) and non-compressed formulation (MP/F4M). **Figure 3** shows medium value and standard deviation of D [3,2] (MP/F4M:  $2.092\ \mu\text{m} \pm 0,05$ ; MP/F4M C:

2,043  $\mu\text{m} \pm 0,03$ ) and span (polydispersity index – PDI - MP/F4M: 0,755  $\mu\text{m} \pm 0,07$ ; MP/F4M C: 0,753  $\mu\text{m} \pm 0,04$ ) for three different batches. **Figure 4** shows the distribution of the samples. MP/F4M is the powder and MP/F4M C is compressed powder.



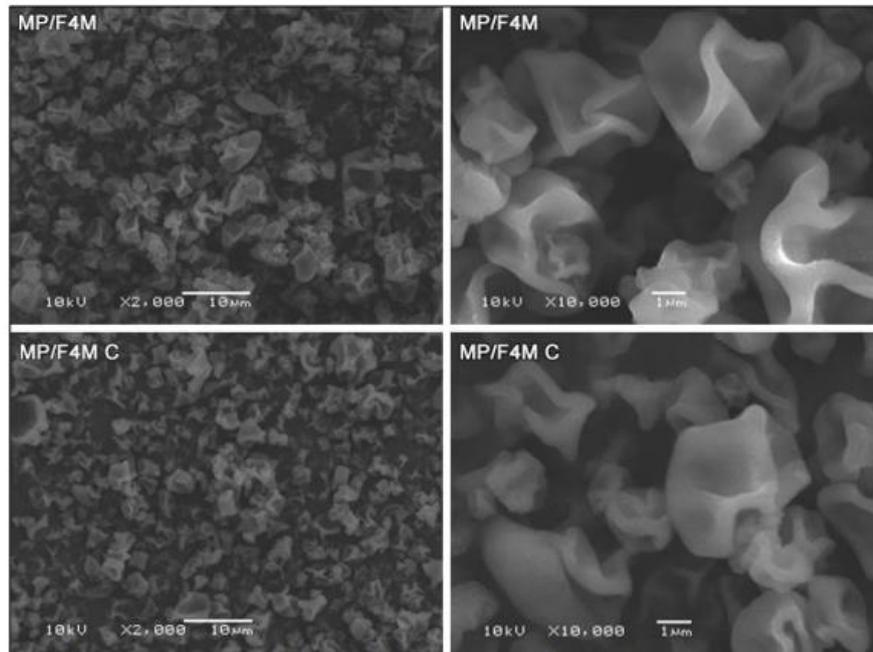
**Figure 3:** Span (the size range distribution) and D [3,2] (surface area mean diameter) in micrometers. MP/F4M: powder and MP/F4M C: compressed powder



**Figure 4:** D [3,2] (Surface area mean diameter) distribution. MP/F4M: powder and MP/F4M C: compressed powder

#### SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

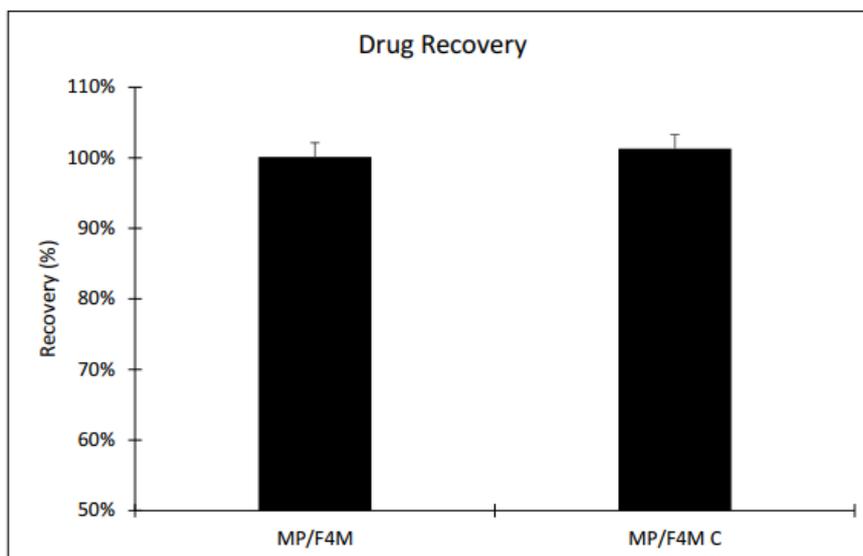
The SEM images at magnifications of 2.000x and 10.000x, all figures showed irregular surface with concavities, leading to conclude that particle shape was maintained for MP/F4M C when compared to MP/F4M (**Figure 5**).



**Figure 5:** MEV of MP/F4M and MP/F4M C. MP/F4M: powder and MP/F4M C: compressed powder

#### **DRUG RECOVERY**

The recovery of ASA in MP/F4M was evaluated and compared to MP/F4M C. The maximum recover was approximately 90% for both formulations (MP/F4M =  $90,13\% \pm 0,02$  and MP/F4M C =  $91,3\% \pm 0,2$ ).



**Figure 6:** Drug recovery of MP/F4M and MP/F4M C. MP/F4M: powder and MP/F4M C: compressed powder

#### DISSOLUTION ASSAYS

The dissolution of MP/F4M was not possible because the powder presented fluctuation of fine particles upon addition to the media. Then, 20 mg of MP/F4M was added into gelatin capsules and we observed the dissolution profile in Ringer and SLF. For these media, we detected high standard deviations and high concentration of free drug in different times for same medium (for example: 45, 90 and 120 maximum peaks for the triplicate – Figure not show). **Figure 7** shows the profile in Ringer medium (smaller and higher standard deviation respectively: 4,35 and 20,33) and **Figure 8** show the profile in SLF (smaller and higher standard deviation respectively: 1,74 and 17,4).

Interestingly, when using MP/F4M C, the results were very similar in triplicate for three different batches. No repeat was required because all showed low standard deviations (**Figure 9**) (smaller and higher standard deviation respectively: 0,18 and 2,09). Comparing **Figure 7-9** we can observe different liberation profiles.

For a better understanding, the standard deviation from different media are showed in **Table 6**.

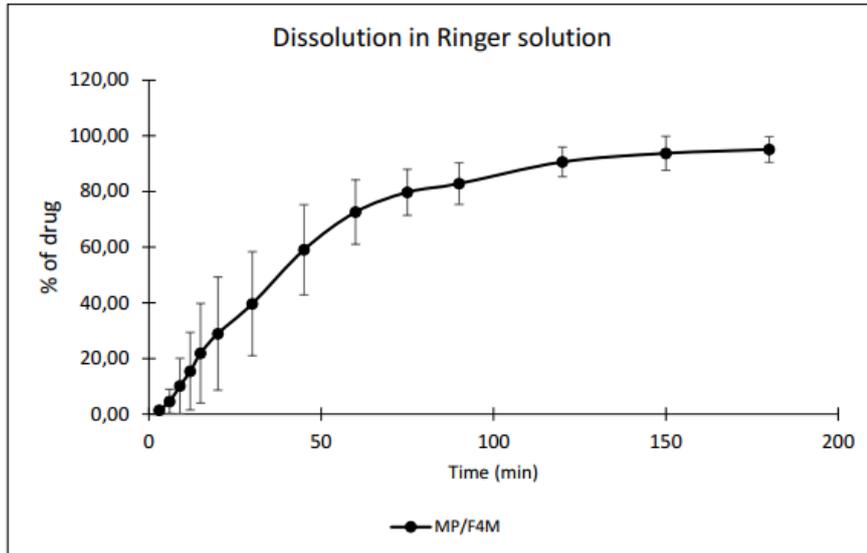


Figure 7: Dissolution of MP/F4M in Ringer solution using gelatin capsule. MP/F4M: powder.

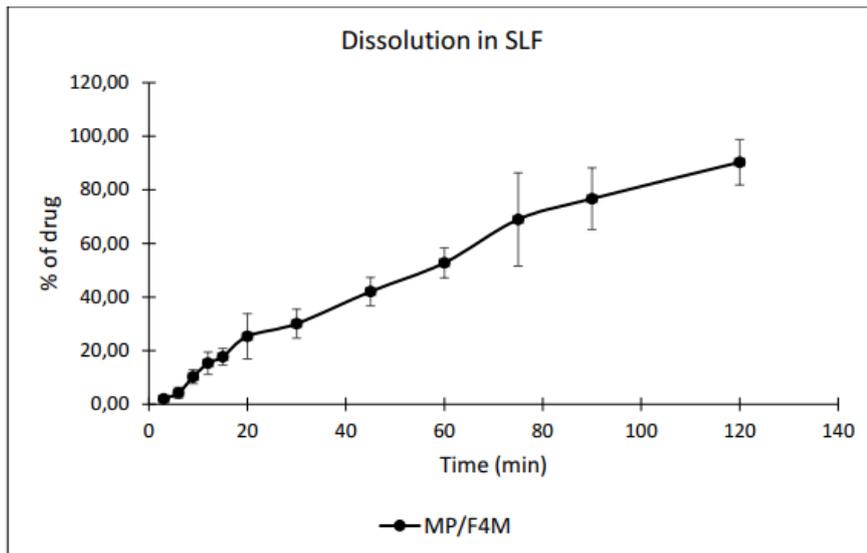
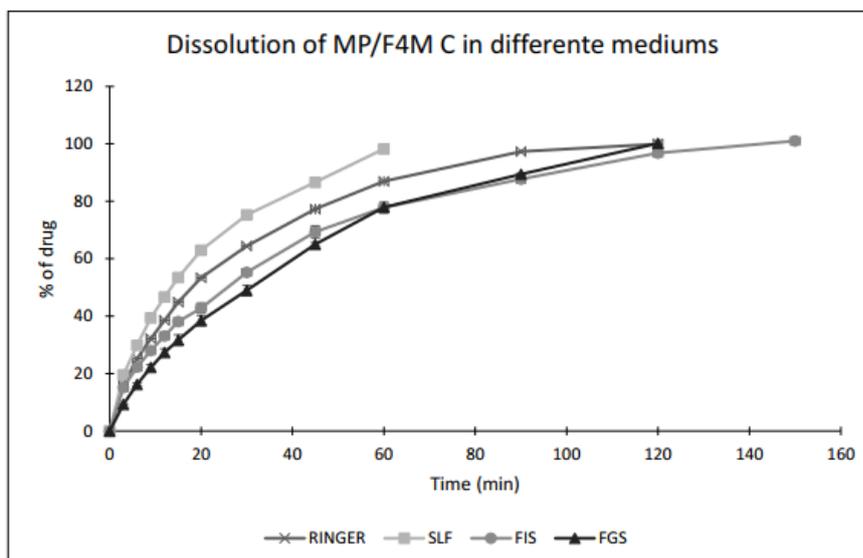


Figure 8: Dissolution of MP/F4M in SLF using gelatin capsule. MP/F4M: powder and SLF: Simulated Lung Fluid



**Figure 9:** Dissolution of MP/F4M C in different media using the modified method. MP/F4M C: compressed powder. SLF: Simulated Lung Fluid; SIF: Simulated Intestinal Fluid and SGF: Simulated Gastric Fluid.

Time (min)	Formulation					
	MP/F4M C				MP/F4M	
	RINGER	SLF	FIS	FGS	RINGER	SLF
3	0,25	0,36	0,44	0,28	1,00	0,74
6	0,67	1,05	0,20	0,52	2,03*	4,35*
9	0,93	0,25	0,60	0,93	2,59*	9,95*
12	0,57	0,53	0,78	1,23	4,17*	13,93*
15	1,07	0,87	0,96	1,84	3,14*	17,89*
20	1,18	0,46	1,72	1,78	8,44*	20,33*
30	0,27	1,02	0,57	1,76	5,40*	18,69*
45	1,83	0,98	2,09*	0,71	5,31*	16,22*
60	1,72	1,41	1,88	0,96	5,59*	11,57*
90	0,64	0,18	1,12	0,36	11,55*	7,48*
120	1,09	-----	1,06	1,07	8,46*	5,33*
150	-----	-----	0,40	-----	5,69*	6,13*
180	-----	-----	-----	-----	3,51*	4,63*

**Table 6:** Standard deviation for MP/F4M and MP/F4M C in different media. The asterisk (\*) marks results above 2. MP/F4M C: compressed powder. SLF as Simulated Lung Fluid; SIF: Simulated Intestinal Fluid and SGF: Simulated Gastric Fluid. "-----" indicates that 100% of the drug was released before that period.

## MATHEMATICAL MODELLING

As the shape of MP/F4M C was a cylinder-like and accordingly to Siepmann & Peppas (2012) that showed modifications in power law to adapt in different polymeric delivery systems, we used the power law (n) of a cylinder (**Table 7**). Furthermore, first and second order models were used to evaluate the R-squared ( $R^2$ ), velocity (k), correlation coefficient (r) model selection criterion (MSC). For second order models, additional parameters were added: value of the first dissolution phase (A) and the velocity ( $k\alpha$ ) as same for the second phase (B and velocity  $k\beta$  respectively) (**Table 8**).

The mathematical modelling was done for three different batches of MP/F4M C, since for MP/F4M values were nonstandard because the high standard deviation observed for dissolution assays.

Second order models presented high MSC (model-selection criteria) and correlation coefficient for Ringer, SLF, SIF and SGF (4,916 and 0,998; 5,015 and 0,998; 4,751 and 0,998; 5,645 and 0,999 respectively) concluding that the model used was correct applied. For dissolution profile, only SGF presented first dissolution phase different than the other media.

	MP/F4M C			
	Ringer	SLF	SIF	SGF
Power law (n)	$0,57 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,00$	$0,67 \pm 0,02$

**Table 7:** Power law (n) for dissolution media. SLF: Simulated Lung Fluid; SIF: Simulated Intestinal Fluid and SGF: Simulated Gastric Fluid.

	First order			
	Ringer	SLF	SIF	SGF
$R^2$	$0,864 \pm 0,008$	$0,913 \pm 0,003$	$0,883 \pm 0,009$	$0,936 \pm 0,005$
r	$0,909 \pm 0,009$	$0,936 \pm 0,005$	$0,932 \pm 0,009$	$0,962 \pm 0,003$
k	$0,002 \pm 0,000$	$0,003 \pm 0,000$	$0,002 \pm 0,000$	$0,002 \pm 0,000$
MSC	$0,453 \pm 0,076$	$0,815 \pm 0,041$	$0,680 \pm 0,095$	$1,483 \pm 0,099$

	Second order			
	Ringer	SLF	SIF	SGF
$R^2$	$0,999 \pm 0,000$	$0,999 \pm 0,000$	$0,999 \pm 0,000$	$0,999 \pm 0,000$
r	$0,998 \pm 0,000$	$0,998 \pm 0,001$	$0,998 \pm 0,001$	$0,999 \pm 0,000$
MSC	$4,916 \pm 0,144$	$5,015 \pm 0,440$	$4,751 \pm 0,094$	$5,645 \pm 0,258$

A	10,975 ± 0,767	9,451 ± 1,494	11,652 ± 1,311	87,289 ± 3,317
k $\alpha$	0,050 ± 0,004	0,083 ± 0,007	0,0423 ± 0,004	0,0004 ± 0,0002
B	89,417 ± 0,792	90,274 ± 1,483	87,559 ± 1,303	12,370 ± 3,220
k $\beta$	0,0003 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001	0,0004 ± 0,0002	0,031 ± 0,009

**Table 8:** First order and second order equations (mono and biexponential), whereas R<sup>2</sup> is R-squared, r: correlation; k: velocity; MSC: model selection criterion; A: first dissolution phase; k $\alpha$ : velocity of A; B: second dissolution phase; k $\beta$ : velocity of B. SLF: Simulated Lung Fluid; SIF: Simulated Intestinal Fluid and SGF: Simulated Gastric Fluid.

## DISCUSSION

Dissolution assays are a challenge that requires attention because the nature of the drug delivery system or formulation<sup>1,2,13–15,21,22,24,27</sup>. Since different drugs are used, several bias and diverse techniques are needed to properly evaluate the results<sup>7,22,32</sup>. Currently, the attempts to standardize these results are limited to protocols used in each laboratory.

Moreover, drug cross-link with gelatin capsule exhibit limitations of USP methods, showing discrepancies between results and the necessity to modify the medium and formulation<sup>6,10,14,15,10,24</sup>. Furthermore, powders with HPMC as excipient can be more challenging because if cross-link with gelatin capsule is observed, there are no substitute for HPMC capsules<sup>23</sup>.

In this work, we proposed a modified method to evaluate powder dissolution of poorly water-soluble drugs using HPMC as excipient by simple and direct powder compression using a known force, producing a compressed powder that can be easily held and without physical or chemical modifications because the final desired product is the powder itself.

We used compression to decrease powder volume only, without any modifications in the structure as observed in size range distribution, particle size, MEV images and drug recovery compared to MP/F4M. The compression method used a low force to produce a powder aggregate, unlike articles that uses compression to compact powder into tablets<sup>33–36</sup>.

HPMC is well known to enhance the drug release and enhance solubility<sup>23,25</sup>. Interestingly, few authors use HPMC and poorly water-soluble drugs together in powder drug delivery systems<sup>19,23,37</sup>. Ishikawa (2000) using direct compression to form tablets, showed that HPMC enhanced the bioavailability and sustained the release of nifedipine.

Mitchell et al. (1993) observed the HPMC concentration on drug release and reported that this parameter can influence the dissolution profile. Hughey et al. (2012) found similar results using itraconazole as model drug and different concentrations of HPMC.

Moreover, Brough et al. (2016) reported comparable outcomes using polyvinyl alcohol. For drug concentration, they showed rapid drug release, corroborating with our findings, whereas the low content of drug in our powder (<10 mg) was 100% dissolved within 150 minutes<sup>38-40</sup>.

For dissolution assays, compressed MP/F4M showed small standard deviations when compared to high deviations obtained in MP/F4M inside gelatin capsules, inferring that the proposed method has a good reproducibility and repeatability.

Ford (2014) describes HPMC as non-ionic cellulose, water soluble, enzyme resistant, chemically stable over pH range 3.0-11.0 and salt concentration dependent.<sup>41</sup>. Peppas and Siepmann (2012) published an article about drug release models for delivery systems using HPMC. The power law described for cylinders indicated that the drug release mechanism in all media here presented were anomalous transport. This support with HPMC properties, that have an initial burst of drug because initial hydration in the media and after that, drug release is controlled by diffusion through the gel and gel gradual erosion<sup>20</sup>.

Taking both articles together (Peppas & Siepmann 2012 and Ford 2014), we observed that for Ringer solution and SIF, the pH could be controlling the dissolution rate, whereas at lower pH, lower the dissolution rate and second order dissolution with anomalous transport evidenced in Table 7 and 8. Moreover, for SLF, we observed a

rapid dissolution rate that can be explained by the salt constituents of the fluid, supporting Ford (2014) statements.

Interestingly, using SGF, which presents pH 1.2, burst of HPMC matrix were responsible for approximately 87% of drug released, contrary to Ringer solution, SLF and SIF that showed approximately low burst release (10%) and a diffusion mediated dissolution mechanism. This outcome detects that HPMC matrix at pH values lower than 3 present different dissolution rates as described by Ford (2014).

### CONCLUSION

Our results showed that this modified method can be used to powder formulations that presents poorly water-soluble drugs and HPMC as excipient which can cross-link with gelatin capsules, showing good reproducibility and repeatability for different media presented by a low standard deviation.

### REFERENCES

1. Berthelsen, R. *et al.* Dissolution model development: Formulation effects and filter complications. *Dissolution Technol.* **23**, 6–12 (2016).
2. Gite, S., Chogale, M. & Patravale, V. Development and validation of a discriminating dissolution method for atorvastatin delayed-release nanoparticles using a flow-through cell: A comparative study using USP apparatus 4 and 1. *Dissolution Technol.* **14**, (2016).
3. Lu, Z. & Fassihi, R. Mechanistic Approach to Understanding the Influence of USP Apparatus I and II on Dissolution Kinetics of Tablets with Different Operating Release Mechanisms. *AAPS PharmSciTech* **18**, 462–472 (2017).
4. Mwila, C., Khamanga, S. M. & Walker, R. B. Development and Assessment of a USP Apparatus 3 Dissolution Test Method for Sustained-Release Nevirapine Matrix Tablets. *Dissolution Technol.* **23**, 22–30 (2016).

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<1092> The dissolution procedure: Development and Validation, United States Pharmacopeia and National Formulary USP 34–NF 29; **The United States Pharmacopeial Convention**, 2011.

<711> Dissolution. United States Pharmacopeia and National Formulary USP 29–NF 24; **The United States Pharmacopeial Convention**, 2006.

ABRAMCZUK, B.; VILLELA, E. A luta contra o AVC no Brasil. **ComCiência**, v. 109, 2009.

ABU, Ryogo *et al.* In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 305–312, 2013.

ACEVEDO, Russell A. *et al.* CLINICAL AND FINANCIAL IMPACT OF RESPIRATORY THERAPIST ASSUMING MDI AND DPI ADMINISTRATION FROM NURSING IN LUNG PARTNERS PATIENTS. **Respiratory Care**, v. 61, n. 10, 2016.

ADAMI, Renata *et al.* Lincomycin hydrochloride loaded albumin microspheres for controlled drug release, produced by supercritical assisted atomization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 203–210, 2017.

ADAMI, Renata; SCOGNAMIGLIO, Mariarosa; REVERCHON, Ernesto. Production of Nanostructured Microspheres Biopolymer-Active Principle-Magnetic Nanoparticles by Supercritical Assisted Atomization. In: **Advances in Bionanomaterials**: Springer, 2018. p. 11–22.

AGGARWAL, Ashutosh; KUMARI, Raman; GROVER, Sandeep. Treatment Satisfaction With Metered Dose and Dry Powder Inhalers in Patients With Bronchial Asthma. **Chest**, v. 150, n. 4, p. 13A, 2016.

AGNIHOTRI, Sunil A.; MALLIKARJUNA, Nadagouda N.; AMINABHAVI, Tejraj M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004.

AGRAWAL, Udit *et al.* Is nanotechnology a boon for oral drug delivery? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1530–1546, 2014.

AHLUWALIA, Kaza; BHANWRA, Sangeeta. Antiplatelet therapy: present status and its future directions. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 260, 2014.

AJUN, Wan *et al.* Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 4, p. 566–574, 2009.

AKWAA, Frank; SPYROPOULOS, Alex C. Treatment of Bleeding Complications When Using Oral Anticoagulants for Prevention of Strokes. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 3, p. 288–298, 2013.

ALE, Marcel Tutor; MIKKELSEN, Jørn D.; MEYER, Anne S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 2106–2130, 2011. a.

ALE, Marcel Tutor; MIKKELSEN, Jørn D.; MEYER, Anne S. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 2106–2130, 2011. b.

AL-GOUSOUS, J.; LANGGUTH, P. A time-scaled convolution approach to construct IVIVC for enteric-coated acetylsalicylic acid tablets. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 2, p. 67–69, 2018.

ALSOMALI, Hana J. *et al.* Evaluating the effectiveness of written dry powder inhaler instructions and health literacy in subjects diagnosed with COPD. **Respiratory care**, v. 62, n. 2, p. 172–178, 2017.

AL-TABAKHA, Moawia M. HPMC capsules: current status and future prospects. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 428–442, 2010.

ALTMAN, Raul *et al.* The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? **Thrombosis Journal**, v. 2, n. 1, p. 1, 2004.

ALTMAN, Raul. New oral anticoagulants: are coagulation units still required? **Thrombosis Journal**, v. 12, n. 1, p. 3, 2014.

ALTMAN, Raul; RIVAS, Ana J.; GONZALEZ, Claudio D. Bleeding tendency in dual antiplatelet therapy with aspirin/clopidogrel: rescue of the template bleeding time in a single-center prospective study. **Thrombosis Journal**, v. 10, n. 1, p. 3, 2012.

ALVAREZ DORTA DIMITRI *et al.* Physicochemical Tuning of Potent Escherichia coli Anti-Adhesives by Microencapsulation and Methylene Homologation. **ChemMedChem**, v. 12, n. 12, p. 986–998, 2017.

AMELIAN, Aleksandra *et al.* Characterization and taste masking evaluation of microparticles with cetirizine dihydrochloride and methacrylate-based copolymer obtained by spray drying. **Acta Pharmaceutica**, v. 67, n. 1, p. 113–124, 2017.

ANGIOLILLO, Dominick J. *et al.* Impact of concomitant low-dose aspirin on the safety and tolerability of naproxen and esomeprazole magnesium delayed-release tablets in patients requiring chronic nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy: an analysis from 5 Phase III studies. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, p. 1–13, 2013.

ANGIOLILLO, Dominick J.; FERREIRO, José Luis. Antiplatelet and anticoagulant therapy for atherothrombotic disease: the role of current and emerging agents. **American journal of cardiovascular drugs: drugs, devices, and other interventions**, v. 13, n. 4, p. 233–250, 2013.

ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária, RDC 166 de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>, acesso em <10 de agosto de 2019

ARANAZ, Inmaculada *et al.* Chitosan Spray-Dried Microparticles for Controlled Delivery of Venlafaxine Hydrochloride. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1980, 2017.

ASHIDA, Shin-ichiro; SAKUMA, Kyoko; ABIKO, Yasushi. Antithrombotic effects of ticlopidine, acetylsalicylic acid and dipyridamole in vascular shunt model in rats. **Thrombosis research**, v. 17, n. 5, p. 663–671, 1980.

AUSTIN, Steven K. Haemostasis. **Medicine**, v. 41, n. 4, p. 208–211, 2013.

AWTRY, Eric H.; LOSCALZO, Joseph. Aspirin. **Circulation**, v. 101, n. 10, p. 1206–1218, 2000.

AW-YONG, Poi Yi *et al.* Nanoparticles as Carriers of Phytochemicals: Recent Applications Against Lung Cancer. , 2018.

AZOULAY, L. *et al.* The concurrent use of antithrombotic therapies and the risk of bleeding in patients with atrial fibrillation: **Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, n. 3, p. 431–439, 2013.

BACCHUS, Farzana R.; CROWTHER, Mark. Thrombosis. In: **Essential Cardiology**. : Springer, 2013. p. 67–77.

BACHELET, Laure *et al.* Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 2, p. 141–146, 2009.

BADENS, Elisabeth *et al.* Current situation and perspectives in drug formulation by using supercritical fluid technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2017.

BAIS, Nidhi *et al.* Prophylaxis and Prevention of Heart Attack by Pulmonary Delivery of Aspirin by Dry Powder Inhaler. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 7, n. 5, 2016.

BAKER, D. C.; BRASSARD, J. Review of Continuing Education Course on Hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 1, p. 281–288, 2011.

BAKRY, A. M. *et al.* Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2015.

BALDUCCI, Anna Giulia *et al.* Pure insulin highly respirable powders for inhalation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 110–117, 2014.

BARBAUX, Sandrine *et al.* The adhesion mediated by the P-selectin P–selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) couple is stronger for shorter PSGL-1 variants. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 4, p. 727–734, 2010.

BARBOSA, Isabelle *et al.* Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. **Glycobiology**, v. 13, n. 9, p. 647–653, 2003.

BARON, Todd H.; KAMATH, Patrick S.; MCBANE, Robert D. New anticoagulant and antiplatelet agents: a primer for the gastroenterologist. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 2, p. 187–195, 2014.

BARUA, Nilotpal; DAS, Mitali. EVALUATION OF ULCEROPROTECTIVE ACTIVITY OF MUSA SAPIENTUM VAR. PARADISIACA METHANOLIC FRUIT EXTRACT AGAINST ASPIRIN INDUCED GASTRIC ULCERS IN ALBINO RATS. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 5, 2013. Disponível em: <<http://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/586>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

BASSAND, Jean-Pierre. Current antithrombotic agents for acute coronary syndromes: Focus on bleeding risk. **International Journal of Cardiology**, v. 163, n. 1, p. 5–18, 2013.

BAUER, M. *et al.* Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 7, p. 986–998, 2012.

BAYNES, J. W.; MAREK, H. D. **Medical Biochemistry**. 2. ed. : Elsevier Mosby, 2005.

BECK-BROICHSITTER, Moritz *et al.* Formulation and process considerations for the design of sildenafil-loaded polymeric microparticles by vibrational spray-drying. **Pharmaceutical development and technology**, v. 22, n. 6, p. 691–698, 2017.

BELLAVITE, Petal *et al.* A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. **Analytical biochemistry**, v. 216, n. 2, p. 444–450, 1994.

BEN AMARA, Chedia *et al.* Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. **Food Chemistry**, Special Issue: 9th International Conference on Water in Food. , v. 236, Special Issue: 9th International Conference on Water in Food, p. 32–40, 2017.

BENJAMIN, Emelia J. *et al.* Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146–e603, 2017.

BERNARD, J.; LIONEL, H. Antithrombotic Agents: Platelet Inhibitors, Acute Anticoagulants, Fibrinolytics, and Chronic Anticoagulants. **Drugs for the Heart: Expert Consult-Online and Print**, 2013.. Acesso em: 7 jun. 2019.

BHUIYAN, MA Rahman *et al.* Chitosan coated cotton fiber: physical and antimicrobial properties for apparel use. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 2, p. 334–342, 2017.

BICA, Katharina *et al.* In search of pure liquid salt forms of aspirin: ionic liquid approaches with acetylsalicylic acid and salicylic acid. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 8, p. 2011–2017, 2010.

BILAN, Maria I. *et al.* Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 2, p. 238–245, 2006.

BIRD, J. Eileen *et al.* Bleeding response induced by anti-thrombotic doses of a phosphoinositide 3-kinase (PI3K)- $\beta$  inhibitor in mice. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 6, p. 560–564, 2011.

BLIDEN, Kevin P. *et al.* Drug delivery and therapeutic impact of extended-release acetylsalicylic acid. **Future cardiology**, v. 12, n. 1, p. 45–58, 2016.

BODAS, Manish *et al.* Inhibition of histone-deacetylase activity rescues inflammatory cystic fibrosis lung disease by modulating innate and adaptive immune responses. **Respiratory research**, v. 19, n. 1, p. 2, 2018.

BOISSON-VIDAL, Catherine *et al.* Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure. **Drug development research**, v. 51, n. 4, p. 216–224, 2000.

BONHOMME, Fanny; FONTANA, Pierre. Laboratory Testing of Hemostasis. In: **Perioperative Hemostasis**. : Springer, 2015. p. 13–24.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **J Physiol**, v. 168, n. 1, p. 178–195, 1963.

BORSIG, Lubor *et al.* Sulfated hexasaccharides attenuate metastasis by inhibition of P-selectin and heparanase. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 5, p. 445–452, 2011.

BREUER, Oded *et al.* Implementation of a Policy Change: Replacement of Nebulizers by Spacers for the Treatment of Asthma in Children. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 17, n. 7, p. 421–424, 2015.

BRITO, Fernanda CF *et al.* Novel thienylacylhydrazone derivatives inhibit platelet aggregation through cyclic nucleotides modulation and thromboxane A<sub>2</sub> synthesis inhibition. **European journal of pharmacology**, v. 638, n. 1, p. 5–12, 2010.

BRYAN SMITH, J. *et al.* Prostaglandin D<sub>2</sub> inhibits the aggregation of human platelets. **Thrombosis Research**, v. 5, n. 3, p. 291–299, 1974.

BUGA-CORBU, I.; ARION, C. Up to date concepts about Von Willebrand disease and the diagnose of this hemostatic disorder. **Journal of medicine and life**, v. 7, n. 3, p. 327, 2014.

BURKI, K., ARPAGAUS, C.; BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a Nano Spray Dryer, **International Journal of Pharmaceutics**, 408(1-2): 248-56, 2011.

CAL, Krzysztof; SOLLOHUB, Krzysztof. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 575–586, 2010.

CALVO, Patricia *et al.* Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 10, p. 1273–1280, 2011.

CAMPARDELLI, R.; REVERCHON, E. Instantaneous coprecipitation of polymer/drug microparticles using the supercritical assisted injection in a liquid antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 120, p. 151–160, 2017.

CARTAGENA, Andrés Felipe *et al.* New denture adhesive containing miconazole nitrate polymeric microparticles: Antifungal, adhesive force and toxicity properties. **Dental Materials**, v. 33, n. 2, p. e53–e61, 2017.

CASADO-ARROYO, Rubén; SOSTRES, Carlos; LANAS, Angel. Optimizing the Use of Aspirin for Cardiovascular Prevention. **Drugs**, v. 73, n. 8, p. 803–814, 2013.

CHAI, Fujuan *et al.* Doxorubicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 1791, 2017.

CHANG, Kiara Chu-Mei *et al.* Impact of the National Health Service Health Check on cardiovascular disease risk: a difference-in-differences matching analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 188, n. 10, p. E228–E238, 2016.

CHAOUAT, C. *et al.* Green microparticles based on a chitosan/lactobionic acid/linoleic acid association. Characterisation and evaluation as a new carrier system for cosmetics. **Journal of microencapsulation**, v. 34, n. 2, p. 162–170, 2017.

CHAPMAN, Kent; YUEN, Sam. Therapy for thrombotic thrombocytopenia purpura: past, present, and future. In: SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS 2014, **Anais**. Thieme Medical Publishers, 2014. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0033-1363165>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

CHAU, Sek Hung *et al.* Cost Effectiveness of Gastroprotection with Proton Pump Inhibitors in Older Low-Dose Acetylsalicylic Acid Users in the Netherlands. **Drugs & aging**, v. 34, n. 5, p. 375–386, 2017.

CHEN, Chih-Kuang *et al.* Synthesis of pH-responsive chitosan nanocapsules for the controlled delivery of doxorubicin. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 30, n. 14, p. 4111–4119, 2014.

CHEN, Naihan *et al.* Co-Delivery of Disease Associated Peptide and Rapamycin via Acetalated Dextran Microparticles for Treatment of Multiple Sclerosis. **Advanced Biosystems**, v. 1, n. 3, 2017.

CHEN, Naihan *et al.* Tunable degradation of acetalated dextran microparticles enables controlled vaccine adjuvant and antigen delivery to modulate adaptive immune responses. **Journal of Controlled Release**, v. 273, p. 147–159, 2018.

CHENG, Wenxue *et al.* High sensitivity chlorogenic acid detection based on multiple layer-by-layer self-assembly films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes on a glassy carbon electrode. **RSC Advances**, v. 7, n. 12, p. 6950–6956, 2017.

CHEVOLOT, L. *et al.* Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 319, n. 1–4, p. 154–165, 1999.

CHOI, Jong-Tae; KIM, Kyung-A. Shin and Young-Kwon. Prevalence of Aspirin Resistance and Clinical Characteristics in Patients with Cerebral Infarction. **The Korean Society For Biomedical Laboratory Sciences**, n. 3, p. 233–238, 2013.

CHOWDARY, K. P. R.; RAO, Y. Srinivasa. Design and in vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microcapsules of glipizide for oral controlled release: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 3, p. 87–92, 2003.

CHURCH, F. C. *et al.* Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 6, p. 3618–3623, 1989.

CIMMINO, Giovanni; GOLINO, Paolo. Platelet Biology and Receptor Pathways. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 6, n. 3, p. 299–309, 2013.

CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 4, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842003000400012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842003000400012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 2 abr. 2019.

CLELAND, John GF. For debate: preventing atherosclerotic events with aspirin. **BMJ: British Medical Journal**, v. 324, n. 7329, p. 103, 2002.

COLLADO, A. *et al.* Encapsulation of a bioactive steroid in a polymer matrix (micro-encapsulation of DI-31 in chitosan by spray drying for various purposes). **Materials and Devices**, 2017.

COLOMBO, Claudia; MONHEMIUS, A. John; PLANT, Jane A. Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 722–730, 2008.

CONOLE, Daniel; KEATING, Gillian M. Colistimethate sodium dry powder for inhalation: a review of its use in the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. **Drugs**, v. 74, n. 3, p. 377–387, 2014.

CONTI, S. *et al.* Matrices containing NaCMC and HPMC: 1. Dissolution performance characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, n. 1, p. 136–142, 2007.

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

COPLEY, Mark; SON, Yoen-Ju; MCCONVILLE, Jason. Dissolution testing for inhaled drugs. **Pharm. Tech. Europe**, v. 22, p. 1–5, 2010.

CRICCHIO, Vincenzo *et al.* Novel superparamagnetic microdevices based on magnetized PLGA/PLA microparticles obtained by supercritical fluid emulsion and coating by carboxybetaine-functionalized chitosan allowing the tuneable release of therapeutics. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 106, n. 8, p. 2097–2105, 2017.

CRUZ, J. De La *et al.* Effect of aspirin on prostanoids and nitric oxide production in streptozotocin-diabetic rats with ischemic retinopathy. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 365, n. 2, p. 96–101, 2002.

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

CUMASHI, Albana *et al.* A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541–552, 2007.

CURTIN, Ronan; COX, D.; FITZGERALD, Desmond. Clopidogrel and ticlopidine. **Platelets. New York: Academic Press/Elsevier Science**, p. 787–801, 2002.

DAEAR, Weiam; LAI, Patrick; PRENNER, Elmar. Biophysical Analysis of the Interaction of Polymeric Nanoparticles with Biomimetic Models of the Lung Surfactant. **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical and Molecular Engineering**, v. 5, n. 7, 2018.

DAL NEGRO, Roberto W. Dry powder inhalers and the right things to remember: a concept review. **Multidisciplinary respiratory medicine**, v. 10, n. 1, p. 13, 2015.

DALE, M. M.; RANG, H. P. **Rang & Dale Farmacology**. 7. ed. : Elsevier, 2007.

DAS, Saikat; BANERJEE, Rinti; BELLARE, Jayesh. Aspirin loaded albumin nanoparticles by coacervation: implications in drug delivery. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 18, n. 2, p. 203–212, 2005.

DAS, Shyamal K.; ROY, Chandan. The Protective Role of Aegle Marmelos on Aspirin–Induced Gastro-Duodenal Ulceration in Albino Rat Model: A Possible Involvement of

Antioxidants. **Saudi Journal of Gastroenterology : Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 18, n. 3, p. 188–194, 2012.

DAVIES, Michael J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **Heart**, v. 83, n. 3, p. 361–366, 2000.

DAVIS, Mark. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, 2017.

DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. **Journal of microencapsulation**, v. 16, n. 3, p. 343–355, 1999.

DAYKIN, Heather J. *et al.* Arterial antithrombotic effects of aspirin, heparin, enoxaparin and clopidogrel alone, or in combination, in the rat. **Thrombosis Research**, v. 118, n. 6, p. 755–762, 2006.

DE BERARDIS G *et al.* Association of aspirin use with major bleeding in patients with and without diabetes. **JAMA**, v. 307, n. 21, p. 2286–2294, 2012.

DE MATOS-JR, Fernando Eustáquio *et al.* Effect of feed preparation on the properties and stability of ascorbic acid microparticles produced by spray chilling. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 251–260, 2017.

DELOUGHERY, Thomas G. Antiplatelet Agents. In: DELOUGHERY, Thomas G. (Ed.). **Hemostasis and Thrombosis**. : Springer International Publishing, 2015. p. 133–137.

DEROM, E. *et al.* **P131 Efficacy of tiotropium and olodaterol combination in patients with COPD on  $\beta$ -blockers**. : BMJ Publishing Group Ltd, 2015.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of microencapsulation**, v. 22, n. 2, p. 179–192, 2005. a.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. **Journal of microencapsulation**, v. 22, n. 4, p. 377–395, 2005. b.

DESAI, Kashappa Goud H.; PARK, Hyun Jin. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan–tripolyphosphate microspheres by spray drying. **Drug development research**, v. 64, n. 2, p. 114–128, 2005. c.

DESHMUKH, Rameshwar; MUJUMDAR, Arun; NAIK, Jitendra. Production of aceclofenac-loaded sustained release micro/nanoparticles using pressure homogenization and spray drying. **Drying Technology**, v. 36, n. 4, p. 459–467, 2018.

DEUX, Jean-François *et al.* Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 10, p. 1604–1609, 2002.

DHAND, Chetna *et al.* Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery. **RSC Advances**, v. 4, n. 62, p. 32673–32689, 2014.

DIGENIS, George A.; GOLD, Thomas B.; SHAH, Vinod P. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 7, p. 915–921, 1994.

DILNAWAZ, Fahima; SAHOO, Sanjeeb K. Augmented anticancer efficacy by si-RNA complexed drug loaded mesoporous silica nanoparticles in lung cancer therapy. **ACS Applied Nano Materials**, 2018.

DUBEY, Rama. Microencapsulation Technology and Applications. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 1, p. 82–95, 2009.

DUFRESNE, Alain. Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 29, p. 1–8, 2017.

ELG, Margareta; GUSTAFSSON, David; CARLSSON, Stefan. Antithrombotic Effects and Bleeding Time of Thrombin Inhibitors and Warfarin in the Rat. **Thrombosis Research**, v. 94, n. 3, p. 187–197, 1999.

EL-HAYEK, Georges *et al.* COMPETING RISK OF MAJOR ADVERSE CARDIAC EVENTS AND MAJOR BLEEDING IN THE ERA OF NEW ANTIPLATELET THERAPY:

A META-ANALYSIS OF RANDOMIZED TRIALS. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 12\_S, 2014. Disponível em: <<http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1855147>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

ERIKSSON, Bengt I. *et al.* Daxaban (YM150) versus enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a randomised phase IIb dose confirmation study (ONYX-3). **Thromb Haemost**, v. 111, n. 2, p. 213–225, 2014.

EYRE, Lorna; GAMLIN, Fiona. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 6, p. 244–246, 2010.

FALATI, Shahrokh *et al.* Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1585–1598, 2003.

FANGMANN, Daniela *et al.* Targeted Microbiome Intervention by Microencapsulated Delayed-Release Niacin Beneficially Affects Insulin Sensitivity in Humans. **Diabetes Care**, v. 41, n. 3, p. 398–405, 2018.

FAREED, Jawed; THETHI, Indermohan; HOPPENSTEADT, Debra. Old Versus New Oral Anticoagulants: Focus on Pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 79–99, 2012.

FAROOQ, Umar *et al.* Enhanced gastric retention and drug release via development of novel floating microspheres based on Eudragit E100 and polycaprolactone: synthesis and in vitro evaluation. **Designed Monomers and Polymers**, v. 20, n. 1, p. 419–433, 2017.

FAYON, M. *et al.* ePS06. 5 Post-hoc review of outcomes in patients switching from tobramycin for nebulization solution (TNS) to aztreonam lysine for inhalation (AZLI). **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 15, p. S49, 2016.

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Elena *et al.* Biopolymer-Based Nanoparticles for Cystic Fibrosis Lung Gene Therapy Studies. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 122, 2018.

FITTON, Janet Helen. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1731–1760, 2011.

FITZGERALD, D. J.; FRAGETTA, J.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandin endoperoxides modulate the response to thromboxane synthase inhibition during coronary thrombosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 5, p. 1708–1713, 1988.

FOLEY, Sarah A. *et al.* An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: extraction, characterization, and apoptotic effects in vitro. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 9, p. 1851–1861, 2011.

FORD, James L. Design and evaluation of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets for oral controlled release: A historical perspective. In: **Hydrophilic Matrix Tablets for Oral Controlled Release**. : Springer, 2014. p. 17–51.

FRANK, Luiza A. *et al.* Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 3151, 2014.

FRATTANI, Flvia Serra *et al.* Oral Antithrombotic Effects of Acylhydrazone Derivatives. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 20, n. 3, p. 287–295, 2013.

FRENETTE, P. S. *et al.* Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 16, p. 7450–7454, 1995.

FRENETTE, P. S. *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 8, p. 1413–1422, 2000.

FRINDY, Sana *et al.* Chitosan–graphene oxide films and CO<sub>2</sub>-dried porous aerogel microspheres: Interfacial interplay and stability. **Carbohydrate polymers**, v. 167, p. 297–305, 2017.

FROMEN, Catherine A. *et al.* Controlled analysis of nanoparticle charge on mucosal and systemic antibody responses following pulmonary immunization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 2, p. 488–493, 2015.

GALANAUD, J. P.; LAROCHE, J. P.; RIGHINI, M. The history and historical treatments of deep vein thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 3, p. 402–411, 2013.

GARCIA, David; LIBBY, Edward; CROWTHER, Mark A. The new oral anticoagulants. **Blood**, v. 115, n. 1, p. 15–20, 2010.

GARCÍA RODRÍGUEZ, L. A.; HERNÁNDEZ-DÍAZ, S.; DE ABAJO, F. J. Association between aspirin and upper gastrointestinal complications: systematic review of epidemiologic studies. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 5, p. 563–571, 2001.

GARCIA-CONTRERAS, Lucila *et al.* Pharmacokinetics of Ethionamide Delivered in Spray-Dried Microparticles to the Lungs of Guinea Pigs. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 106, n. 1, p. 331–337, 2017.

GARCIA-FUENTES, Marcos; ALONSO, Maria J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 161, n. 2, p. 496–504, 2012.

GAUTIER, Jean-Charles. **Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols**. 2011 edition ed. New York, NY: Humana Press, 2010.

GEBUIS, Edward PA *et al.* Vitamin K1 supplementation to improve the stability of anticoagulation therapy with vitamin K antagonists: a dose-finding study. **haematologica**, v. 96, n. 4, p. 583–589, 2011.

GHARSALLAOUI, Adem *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GIBBINS, Jonathan M.; MAHAUT-SMITH, Martyn P. (EDS.). Preparation of Washed Platelet Suspensions From Human and Rodent Blood - Springer. In: *Methods In Molecular Biology*<sup>TM</sup> : Humana Press, 2004.

GILL, Simardeep *et al.* Nanoparticles: Characteristics, Mechanisms of Action, and Toxicity in Pulmonary Drug Delivery—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 107–119, 2007.

GIUNCHEDI, P. *et al.* Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres. **Biomaterials**, v. 19, n. 1–3, p. 157–161, 1998.

GIVENS, Brittany E.; GEARY, Sean M.; SALEM, Aliasger K. Nanoparticle-based CpG-oligonucleotide therapy for treating allergic asthma. **Immunotherapy**, n. 0, 2018.

GJOSEVA, Silvana *et al.* Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment. **Carbohydrate polymers**, v. 186, p. 260–272, 2018.

GOLDSTEIN, Jay L. *et al.* Long-Term Safety of a Coordinated Delivery Tablet of Enteric-Coated Aspirin 325 mg and Immediate-Release Omeprazole 40 mg for Secondary Cardiovascular Disease Prevention in Patients at GI Risk. **Cardiovascular therapeutics**, v. 34, n. 2, p. 59–66, 2016.

GONZÁLEZ-CORREA, José Antonio *et al.* Effects of Hydroxytyrosol and Hydroxytyrosol Acetate Administration to Rats on Platelet Function Compared to Acetylsalicylic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7872–7876, 2008.

GOODMAN, L. S. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. : Mcgraw-hill Interamerican, 2006.

GOWTHAMARAJAN, K.; SINGH, Sachin Kumar. Dissolution testing for poorly soluble drugs: a continuing perspective. **Dissolution Technologies**, v. 17, n. 3, p. 24–32, 2010.

GRANT, Andrew C. *et al.* The ELLIPTA® dry powder inhaler: design, functionality, in vitro dosing performance and critical task compliance by patients and caregivers. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 28, n. 6, p. 474–485, 2015.

GRIGORAS, Anca Giorgiana. Polymer-lipid hybrid systems used as carriers for insulin delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 8, p. 2425–2437, 2017.

GROENEWEGEN, K. A. *et al.* Vascular age to determine cardiovascular disease risk: a systematic review of its concepts, definitions, and clinical applications. **European journal of preventive cardiology**, v. 23, n. 3, p. 264–274, 2016.

GUGU, T. H.; CHIME, S. A.; ATTAMA, A. A. Solid lipid microparticles: An approach for improving oral bioavailability of aspirin. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 5, p. 425–432, 2015.

GUI, Lin *et al.* Synthesis, nano-features, ex vivo anti-platelet aggregation and in vivo antithrombotic activities of poly- $\alpha$ ,  $\beta$ -dl-aspartyl-l-arginine. **Medchemcomm**, v. 3, n. 1, p. 102–108, 2012.

HAASTRUP, Peter Fentz; GRØNLYKKE, Thor; JARBØL, Dorte Ejg. Enteric Coating Can Lead to Reduced Antiplatelet Effect of Low-Dose Acetylsalicylic Acid. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 116, n. 3, p. 212–215, 2015.

HAGEDORN, Ina *et al.* Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. **Circulation**, v. 121, n. 13, p. 1510–1517, 2010.

HALES, Dana *et al.* A quality by design (QbD) study on enoxaparin sodium loaded polymeric microspheres for colon-specific delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 249–261, 2017.

HALLÉ, Jean-Pierre *et al.* Method for the quantification of alginate in microcapsules. **Cell transplantation**, v. 2, n. 5, p. 429–436, 1993.

HARDER, Sebastian; GRAFF, Jochen. Novel oral anticoagulants: clinical pharmacology, indications and practical considerations. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 9, p. 1617–1633, 2013.

HARSHA, Sree *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of microspheres prepared by spray drying technique: targeted drug delivery. **Biomedical Research**, v. 28, n. 8, 2017.

HASSAN, Ahmed *et al.* In-vitro/in-vivo comparison of inhaled salbutamol dose delivered by jet nebulizer, vibrating mesh nebulizer and metered dose inhaler with spacer during non-invasive ventilation. **Experimental lung research**, v. 43, n. 1, p. 19–28, 2017.

HAYDEN, Michael *et al.* Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of internal medicine**, v. 136, n. 2, p. 161–172, 2002.

HEDBERG, J. *et al.* Low-dose acetylsalicylic acid and gastrointestinal ulcers or bleeding--a cohort study of the effects of proton pump inhibitor use patterns. **Journal of Internal Medicine**, v. 274, n. 4, p. 371–380, 2013.

HEPTINSTALL, Stan. Antiplatelet Agents: Current and Novel. In: FERRO, Albert; GARCIA, David A. (Eds.). **Antiplatelet and Anticoagulation Therapy**. Current Cardiovascular Therapy : Springer London, 2013. p. 1–44.

HERBERT, J. M. *et al.* The antiaggregating and antithrombotic activity of ticlopidine is potentiated by aspirin in the rat. **Thrombosis and haemostasis**, v. 75, n. 01, p. 094–098, 1996.

HERBERT, Jean-Marc; BERNAT, André; MAFFRAND, Jean-Pierre. Aprotinin reduces clopidogrel-induced prolongation of the bleeding time in the rat. **Thrombosis Research**, v. 71, n. 6, p. 433–441, 1993.

HOFFMAN, Maureane. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, n. 1/2, p. 17–20, 2003.

HOPPENTOCHT, M. *et al.* Technological and practical challenges of dry powder inhalers and formulations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 75, p. 18–31, 2014.

HUANG, Guo-Qing *et al.* Intestine-targeted delivery potency of the O-carboxymethyl chitosan–gum Arabic coacervate: Effects of coacervation acidity and possible mechanism. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 423–429, 2017.

HUANG, Y. C. *et al.* The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method. **Journal of microencapsulation**, v. 20, n. 4, p. 459–472, 2003.

HUANG, Y. C.; CHIANG, C. H.; YEH, M. K. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. **Journal of microencapsulation**, v. 20, n. 2, p. 247–260, 2003.

HUANG, Yi-Cheng *et al.* Preparing, characterizing, and evaluating chitosan/fucoidan nanoparticles as oral delivery carriers. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 5, p. 1–9, 2014.

HUANG, Yi-Cheng; LAM, U. Ian. Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 58, n. 6, p. 779–785, 2011.

HUSSAIN, Mubashir *et al.* Regulation of drug release by tuning surface textures of biodegradable polymer microparticles. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 16, p. 14391–14400, 2017.

HUSSAIN, Muhammad Ajaz *et al.* Macromolecular prodrugs of aspirin with HPMC: A nano particulate drug design, characterization, and pharmacokinetic studies. **Macromolecular Research**, v. 19, n. 12, p. 1296–1302, 2011.

INNERHOFER, Petra; KIENAST, Joachim. Principles of perioperative coagulopathy. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 24, n. 1, p. 1–14, 2010.

ISHIKAWA, Tatsuya *et al.* Effect of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) on the release profiles and bioavailability of a poorly water-soluble drug from tablets prepared

using macrogol and HPMC. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, n. 1, p. 173–178, 2000.

ITTAMAN, S. V.; VANWORMER, J. J.; REZKALLA, S. H. The Role of Aspirin in the Prevention of Cardiovascular Disease. **Clinical Medicine & Research**, v. 12, n. 3–4, p. 147–154, 2014.

IVEY, K. J.; PAONE, D. B.; KRAUSE, W. J. Acute effect of systemic aspirin on gastric mucosa in man. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 25, n. 2, p. 97–99, 1980.

JACKSON, Shaun P. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1423–1436, 2011.

JASPART, Séverine *et al.* Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 1, p. 47–56, 2007.

JEFFREYS, Diarmuid. **Aspirin: The Remarkable Story of a Wonder Drug.**: Bloomsbury Publishing, 2008.

JIAO, Guangling *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–223, 2011.

JIAO, Yuyan *et al.* Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 3, p. 760–768, 2002.

JIMÉNEZ-MARTÍN, Estefanía *et al.* Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of  $\omega$ -3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 1, p. 100–111, 2015.

JOBLING, Louise; EYRE, Lorna. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 2, p. 51–53, 2013.

JONES, R. *et al.* **P130 Effectiveness and safety of initiating treatment with fluticasone/salmeterol via MDI versus DPI in COPD**: BMJ Publishing Group Ltd, 2015.

JUENET, Maya *et al.* Thrombolytic therapy based on fucoidan-functionalized polymer nanoparticles targeting P-selectin. **Biomaterials**, v. 156, p. 204–216, 2018.

JUNKINS, Robert D. *et al.* A robust microparticle platform for a STING-targeted adjuvant that enhances both humoral and cellular immunity during vaccination. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 1–13, 2018.

KAJIMOTO KAZUAKI *et al.* Liposome Microencapsulation for the Surface Modification and Improved Entrapment of Cytochrome c for Targeted Delivery. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 1, p. 101–109, 2018.

KARASZEWSKA AGNIESZKA *et al.* Preparation and properties of textile materials modified with triclosan-loaded polylactide microparticles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 28, n. 9, p. 1185–1193, 2017.

KARAVAS, Evangelos; GEORGARAKIS, Emmanouel; BIKIARIS, Dimitrios. Application of PVP/HPMC miscible blends with enhanced mucoadhesive properties for adjusting drug release in predictable pulsatile chronotherapeutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 115–126, 2006.

KASTRUP, Christian J.; ISMAGILOV, Rustem F. A physical organic mechanistic approach to understanding the complex reaction network of hemostasis (blood clotting). **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 711–715, 2007.

KAUR, Ranjot *et al.* Preparation and characterization of spray-dried inhalable powders containing nanoaggregates for pulmonary delivery of anti-tubercular drugs. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 182–187, 2016.

KELLY, J. P. *et al.* Risk of aspirin-associated major upper-gastrointestinal bleeding with enteric-coated or buffered product. **Lancet (London, England)**, v. 348, n. 9039, p. 1413–1416, 1996.

KENNEDY, B. *et al.* Emerging anticoagulants. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 20, p. 3388–3416, 2012.

KHALAFU, Sharifah Habibah Syed *et al.* Effects of deodorisation methods on volatile compounds, chemical properties and antioxidant activities of fucoidan isolated from brown seaweed (*Sargassum* sp.). **Algal Research**, v. 25, p. 507–515, 2017.

KIM, Eun Suh; LEE, Ji-Soo; LEE, Hyeon Gyu. Nanoencapsulation of Red Ginseng Extracts Using Chitosan with Polyglutamic Acid or Fucoidan for Improving Antithrombotic Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 23, p. 4765–4771, 2016.

KIM, Jayoung *et al.* Biodegradable polymeric microparticles allow sustained durability of a multimodal anti-angiogenic peptide to treat neovascular age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 8, p. 1949–1949, 2017.

KIM, K. Chul; LILLEHOJ, Erik P. MUC1 Mucin. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 39, n. 6, p. 644–647, 2008.

KING, W. The Medical Biochemistry Page, 2012.

KISHIMOTO, Satoko *et al.* Novel Experimental and Clinical Therapeutic Uses of Low-Molecular-Weight Heparin/Protamine Microparticles. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 42–57, 2012.

KO, Jung-A.; OH, Youn-Sung; PARK, Hyun-Jin. Preparation and Characterization of Aminated Gelatin-Fucoidan Microparticles. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 191–195, 2012.

KOBAYASHI, Itsuro; DIDISHEIM, Paul. Systemic Effects of ADP-induced Platelet Aggregation and Their Modification by Aspirin and by Pyridinolcarbamate. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 30, n. 02, p. 178–190, 1973.

KODELA, Ravinder *et al.* NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide- and hydrogen sulfide-releasing hybrid has enhanced chemo-preventive properties

compared to aspirin, is gastrointestinal safe with all the classic therapeutic indications. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 4, p. 564–572, 2015.

KOHLI, Sc. Old and New Players in Oral Antiplatelet Therapy in Treatment of Acute Coronary Syndrome. **Nepal Journal of Medical Sciences**, v. 1, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://www.nepjol.info/index.php/NJMS/article/view/5799>>. Acesso em: 22 fev. 2019.

KOLBER, Michael R.; KOROWNYK, Christina. An aspirin a day? Aspirin use across a spectrum of risk: cardiovascular disease, cancers and bleeds. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 2, p. 153–157, 2014.

KOWALSKI, Marek L. Aspirin-sensitive rhinosinusitis and asthma. In: **Nonallergic Rhinitis**. : CRC Press, 2016. p. 169–198.

KROEGEL, Claus; REISSIG, Angelika. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. **Respiration**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2003.

KUDERER, Nicole M. Venous thromboembolism. **Oxford American Handbook of Oncology**, p. 271, 2015.

KULKARNI, Suhasini *et al.* A revised model of platelet aggregation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 6, p. 783–791, 2000.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran, Patologia – Bases Patológicas das doenças**. 8. ed. : Elsevier, 2010.

KUNADIAN, Vijay *et al.* Aspirin, Platelet P2Y<sub>12</sub> Receptor Inhibitors, and Other Oral Antiplatelets: Comparative Pharmacology and Role in Elective PCI. **Interventional Cardiology Clinics**, v. 2, n. 4, p. 527–535, 2013.

LE HIRESS, Morane *et al.* Design, Synthesis and Biological Activity of New N-(Phenylmethyl)-benzoxazol-2-thiones as Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Antagonists: Efficacies in Experimental Pulmonary Hypertension. **Journal of medicinal chemistry**, 2018.

LEE, Don-Gil *et al.* Fucoidan Prevents the Progression of Osteoarthritis in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 9, p. 1032–1041, 2015.

LEFRANÇAIS, Emma *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. **Nature**, v. 544, n. 7648, p. 105–109, 2017.

LEI, Jinping *et al.* Mechanistic Insights into a Classic Wonder Drug-Aspirin. **Journal of the American Chemical Society**, 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja5112964>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

LÉTIENNE, Robert *et al.* Antithrombotic activity of F 16618, a new PAR1 antagonist evaluated in extracorporeal arterio-venous shunt in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 11, p. 1616–1621, 2010.

LI, Bo *et al.* Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 8, p. 1671–1695, 2008.

LI, Bo *et al.* Development of Polymer Microcapsules Functionalized with Fucoidan to Target P-Selectin Overexpressed in Cardiovascular Diseases. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 4, 2017. a.

LI, Hao-Ying *et al.* Enhanced dispersibility and deposition of spray-dried powders for pulmonary gene therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 11, n. 7, p. 425–432, 2003.

LI, Liang *et al.* Investigation of L-leucine in reducing the moisture-induced deterioration of spray-dried salbutamol sulfate powder for inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 530, n. 1, p. 30–39, 2017. b.

LI, Peng *et al.* Hepatocellular necrosis, fibrosis and microsomal activity determine the hepatic pharmacokinetics of basic drugs in right-heart-failure-induced liver damage. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 6, p. 1658–1669, 2012.

LI, Puwang *et al.* Microencapsulation of coupled folate and chitosan nanoparticles for targeted delivery of combination drugs to colon. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 1, p. 40–45, 2015.

LI, Wei; MCINTYRE, Thomas M.; SILVERSTEIN, Roy L. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: a model of redox pathology. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 50–55, 2013.

LIANG, Zhenglin *et al.* Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. **Drug discovery today**, v. 20, n. 3, p. 380–389, 2015.

LIM, Seng Joe; WAN AIDA, Wan Mustapha. Chapter 3 - Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. In: VENKATESAN, Jayachandran; ANIL, Sukumaran; KIM, Se-Kwon (Eds.). **Seaweed Polysaccharides**.: Elsevier, 2017. p. 27–46.

LIMPONGSA, Ekapol; UMPRAYN, Kraisri. Preparation and Evaluation of Diltiazem Hydrochloride Diffusion-Controlled Transdermal Delivery System. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 2, p. 464–470, 2008.

LIP, Gregory YH *et al.* Oral direct thrombin inhibitor AZD0837 for the prevention of stroke and systemic embolism in patients with non-valvular atrial fibrillation: a phase II study of AZD0837 in patients who are appropriate for but unable or unwilling to take vitamin K antagonist therapy. **Thrombosis research**, v. 127, n. 2, p. 91–99, 2011.

LIU, Hsin-Jiant *et al.* Preparation and Drug Release of Aspirin-Loaded PLGA-PEG-PLGA/Montmorillonite Microparticles. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 1, p. 7–14, 2015.

LIU, Yang *et al.* Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 2, n. 2, p. 30–36, 2012.

LIZIO, Rosario *et al.* Oral endotracheal intubation of rats for intratracheal instillation and aerosol drug delivery. **Laboratory Animals**, v. 35, n. 3, p. 257–260, 2001.

LOCKYER, Simon; KAMBAYASHI, Jun-ichi. Demonstration of Flow and Platelet Dependency in a Ferric Chloride-Induced Model of Thrombosis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 718, 1999.

LOURENÇO, André L. *et al.* Synthesis and mechanistic evaluation of novel N'-benzylidene-carbohydrazide-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine derivatives as non-anionic antiplatelet agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 135, p. 213–229, 2017.

LUNI, Faraz Khan *et al.* Clinical outcomes associated with per-operative discontinuation of aspirin in patients with coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. **Catheterization and Cardiovascular Interventions**, v. 89, n. 7, p. 1168–1175, 2017.

MA, Guanghui. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications. **Journal of Controlled Release**, Drug Delivery Research in Asia and the Pacific Region, v. 193, Drug Delivery Research in Asia and the Pacific Region, p. 324–340, 2014.

MACKMAN, Nigel. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2331–2336, 2012.

MAFFRAND, J. P. *et al.* ADP plays a key role in thrombogenesis in rats. **Thrombosis and haemostasis**, v. 59, n. 02, p. 225–230, 1988.

MANGAL, Sharad *et al.* Physico-Chemical Properties, Aerosolization and Dissolution of Co-Spray Dried Azithromycin Particles with L-Leucine for Inhalation. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 2, p. 28, 2018.

MANNE, Bhanu Kanth *et al.* Fucoidan Is a Novel Platelet Agonist for the C-type Lectin-like Receptor 2 (CLEC-2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 11, p. 7717–7726, 2013. a.

MANNE, Bhanu Kanth *et al.* Fucoidan Is a Novel Platelet Agonist for the C-type Lectin-like Receptor 2 (CLEC-2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 11, p. 7717–7726, 2013. b.

MANNHALTER, C. Biomarkers for arterial and venous thrombotic disorders. **Hamostaseologie**, v. 34, n. 2, p. 115–132, 2014.

MANUEL LLABOT, Juan; MANZO, Ruben Hilario; ALLEMANDI, Alberto. Double-layered mucoadhesive tablets containing nystatin. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 3, p. 47–52, 2002.

MARAIS, M. F.; JOSELEAU, J. P. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 2, p. 155–159, 2001.

MARCHAIS, Hervé *et al.* Cross-linking of hard gelatin carbamazepine capsules: effect of dissolution conditions on in vitro drug release. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 19, n. 2–3, p. 129–132, 2003.

MARINVAL, N. *et al.* Fucoidan/VEGF-based surface modification of decellularized pulmonary heart valve improves the antithrombotic and Re-endothelialization potential of bioprostheses. **Biomaterials**, 2018.

MARQUES, Margareth R. C. Enzymes in the Dissolution Testing of Gelatin Capsules. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 6, p. 1410–1416, 2014.

MARQUES, Margareth RC; LOEBENBERG, Raimar; ALMUKAINZI, May. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. **Dissolut Technol**, v. 18, n. 3, p. 15–28, 2011.

MARTÍN-MERINO, Elisa *et al.* Represcription of low-dose acetylsalicylic acid after discontinuation in patients receiving treatment for secondary cardiovascular disease prevention in the UK. **American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions**, v. 14, n. 4, p. 319–326, 2014.

MASOTTI, Andrea; ORTAGGI, Giancarlo. Chitosan micro-and nanospheres: fabrication and applications for drug and DNA delivery. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 4, p. 463–469, 2009.

MAURER, Lisa M. *et al.* Ligation of the fibrin-binding domain by  $\beta$ -strand addition is sufficient for expansion of soluble fibronectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 16, p. 13303–13312, 2012.

MAVRAKANAS, Thomas; BOUNAMEAUX, Henri. The potential role of new oral anticoagulants in the prevention and treatment of thromboembolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, n. 1, p. 46–58, 2011.

MCEVER, Rodger P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovascular research**, v. 107, n. 3, p. 331–339, 2015.

MCGRATH, Emer R. *et al.* Novel oral anticoagulants: A focused review for stroke physicians. **International Journal of Stroke**, v. 9, n. 1, p. 71–78, 2014.

MEENACH, Samantha A. *et al.* Characterization and aerosol dispersion performance of advanced spray-dried chemotherapeutic PEGylated phospholipid particles for dry powder inhalation delivery in lung cancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 699–711, 2013.

MEHTA, Piyush. Dry powder inhalers: a focus on advancements in novel drug delivery systems. **Journal of drug delivery**, v. 2016, 2016.

MENG, Jianing *et al.* Spray-dried thiolated chitosan-coated sodium alginate multilayer microparticles for vaginal HIV microbicide delivery. **The AAPS journal**, v. 19, n. 3, p. 692–702, 2017.

MINZ, Sunita; PANDEY, Ravi Shankar. Development of Adjuvanted Solid Fat Nanoemulsions for Pulmonary Hepatitis B Vaccination. **Journal of pharmaceutical sciences**, 2018.

MIYAKE, K. *et al.* Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. **International journal of pharmaceuticals**, v. 179, n. 2, p. 237–245, 1999.

MOLINA, Vivian *et al.* Effect of D-003 on Intravascular Platelet Aggregation Induced with Collagen in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 2, p. 232–236, 2005.

MOMOH, Mumuni A. *et al.* Microspheres of insulin-Eudragit complex: Formulation, characterization and in vivo studies. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 29, p. 327–341, 2017.

MOORANIAN, Armin *et al.* Probuocol Release from Novel Multicompartmental Microcapsules for the Oral Targeted Delivery in Type 2 Diabetes. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 1, p. 45–52, 2015.

MORALES, Javier O. *et al.* Novel Nanostructured Polymeric Carriers to Enable Drug Delivery for Cardiovascular Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 29, p. 4276–4284, 2015.

MORALES, Javier O. *et al.* Challenges and future prospects for the delivery of biologics: oral mucosal, pulmonary, and transdermal routes. **The AAPS journal**, v. 19, n. 3, p. 652–668, 2017.

MORALES-BURGOS, Ana M. *et al.* Polysaccharides in Alternative Methods for Insulin Delivery. In: **Biopolymer Grafting**: Elsevier, 2018. p. 175–197.

MORÇÖL, Tülin *et al.* Calcium phosphate particles as pulmonary delivery system for interferon- $\alpha$  in Mice. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 395–412, 2018.

MORTON, R. *et al.* EPS7. 10 Clinical benefit of continuous nebulised Aztreonam Lysine for Inhalation (AZLI) in adults with cystic fibrosis—a retrospective cohort study. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, p. S55, 2017.

MOSESSON, Michael W. Update on antithrombin I (fibrin). **THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-**, v. 98, n. 1, p. 105, 2007.

MOURÃO, Paulo A. S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 9, p. 967–981, 2004.

MURAKAMI, Kaoru *et al.* Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 83–90, 2010.

MURUGAPPAN, Senthil *et al.* Enhanced pulmonary immunization with aerosolized inactivated influenza vaccine containing delta inulin adjuvant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, p. 118–122, 2015.

NAFEE, Noha Adel *et al.* Mucoadhesive Delivery Systems. I. Evaluation of Mucoadhesive Polymers for Buccal Tablet Formulation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 9, p. 985–993, 2004.

NAGARAJAN, Sudha *et al.* **Pulmonary administration of dry powder formulations for treating infertility** 2006.

NAJAFABADI, Abdolhossien Rouholamini *et al.* The effect of vehicle on physical properties and aerosolisation behaviour of disodium cromoglycate microparticles spray dried alone or with L-leucine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 285, n. 1–2, p. 97–108, 2004.

NATTERODT, Jens C. *et al.* Polymer nanocomposites with cellulose nanocrystals featuring adaptive surface groups. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 2, p. 517–525, 2017.

NAZAR, Hamde. New drug delivery formulations via the lungs are worth holding your breath for. **Assessment**, v. 15, p. 43, 2018.

NI, Rui *et al.* Nanocrystals embedded in chitosan-based respirable swellable microparticles as dry powder for sustained pulmonary drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 137–146, 2017.

NIETO-ORELLANA, Alejandro *et al.* Dry-powder formulations of non-covalent protein complexes with linear or miktoarm copolymers for pulmonary delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 540, n. 1, p. 78–88, 2018.

OAKLEY, Carol; LARJAVA, Hannu. Hemostasis, coagulation, and complications. **Endodontic Topics**, v. 24, n. 1, p. 4–25, 2012.

O'DELL, Kate M.; IGAWA, Daniel; HSIN, Jerline. New Oral Anticoagulants for Atrial Fibrillation: A Review of Clinical Trials. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 4, p. 894–901, 2012.

OFNER, Clyde M. *et al.* Crosslinking Studies in Gelatin Capsules Treated with Formaldehyde and in Capsules Exposed to Elevated Temperature and Humidity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 1, p. 79–88, 2001.

OHARA, Toshio *et al.* Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. **International journal of pharmaceutics**, v. 302, n. 1, p. 95–102, 2005.

OLIVEIRA, Paula M. *et al.* Microparticles prepared with 50–190 kDa chitosan as promising non-toxic carriers for pulmonary delivery of isoniazid. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 421–431, 2017.

OTAKE, Hiroko *et al.* Inhalable Spray-Freeze-Dried Powder with L-Leucine that Delivers Particles Independent of Inspiratory Flow Pattern and Inhalation Device. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 4, p. 922–931, 2016.

PAI, Rohan V. *et al.* Development and evaluation of chitosan microparticles based dry powder inhalation formulations of rifampicin and rifabutin. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 29, n. 2, p. 179–195, 2016.

PAMUKCU, Burak; HUBER, Kurt; LIP, Gregory Y. H. Antiplatelet therapy in atherothrombotic cardiovascular diseases for primary and secondary prevention: a focus on old and new antiplatelet agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 6, p. 850–860, 2012.

PARANJPE, Mukta; MÜLLER-GOYMANN, Christel C. Nanoparticle-Mediated Pulmonary Drug Delivery: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 5852–5873, 2014.

PARIKH, Rajesh; PATEL, Leena; DALWADI, Sonali. Microparticles of rifampicin: comparison of pulmonary route with oral route for drug uptake by alveolar macrophages, phagocytosis activity and toxicity study in albino rats. **Drug delivery**, v. 21, n. 6, p. 406–411, 2014.

PARK, Sehyun; HWANG, Sunae; LEE, Jonghwi. pH-responsive hydrogels from moldable composite microparticles prepared by coaxial electro-spray drying. **Chemical Engineering Journal**, v. 169, n. 1, p. 348–357, 2011.

PATEL, Darshan; WICKEMEYER, Johanna; SEKHSARIA, Sudhir. An Alternative Aspirin Desensitization Protocol for Patients with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. **J Allergy Ther**, v. 6, n. 207, p. 2, 2015.

PATRONO, Carlo; ROCCA, Bianca. The future of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. **Annual review of medicine**, v. 61, p. 49–61, 2010.

PEREZ, Luzmercy *et al.* Aspects of asthma self-management: inhaler technique, ability to access (navigate) health care, and inhaled steroid knowledge are correlated. In: **D14. IMPROVING CARE AND REDUCING DISPARITIES IN ASTHMA AND SLEEP**: American Thoracic Society, 2016. p. A6426–A6426.

PERIOLI, Luana *et al.* Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 73–82, 2004.

PFÜTZNER, Andreas; MANN, Alfred E.; STEINER, Solomon S. Technosphere™/Insulin—A New Approach for Effective Delivery of Human Insulin Via the Pulmonary Route. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 4, n. 5, p. 589–594, 2002.

PIEPOLI, Massimo F. *et al.* 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **Atherosclerosis**, v. 252, p. 207–274, 2016.

PIERDONÁ, Taiana Magalhães *et al.* The *Operculina macrocarpa* (L.) urb.(jalapa) tincture modulates human blood platelet aggregation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 151–157, 2014. a.

PIERDONÁ, Taiana Magalhães *et al.* The *Operculina macrocarpa* (L.) urb. (jalapa) tincture modulates human blood platelet aggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 151–157, 2014. b.

PINHEIRO, Ana C. *et al.* Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 1–9, 2015.

PITTAS, Anastassios G.; WESTCOTT, Gregory P.; BALK, Ethan M. Efficacy, safety, and patient acceptability of Technosphere inhaled insulin for people with diabetes: a systematic review and meta-analysis. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 3, n. 11, p. 886–894, 2015.

PLATAKI, Maria *et al.* Poloxamer 188 facilitates the repair of alveolus resident cells in ventilator-injured lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 8, p. 939–947, 2011.

POMIN, Vitor H. Structure-function relationship of anticoagulant and antithrombotic well-defined sulfated polysaccharides from marine invertebrates. **Adv. Food Nutr. Res**, v. 65, p. 195–209, 2012.

POMIN, Vitor H. How to analyze the anticoagulant and antithrombotic mechanisms of action in fucanome and galactanome? **Glycoconjugate Journal**, v. 31, n. 2, p. 89–99, 2014.

POMIN, Vitor Hugo; MOURÃO, Paulo Antônio de Souza. Structure versus anticoagulant and antithrombotic actions of marine sulfated polysaccharides. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 921–928, 2012.

POUYANI, Tara; SEED, Brian. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. **Cell**, v. 83, n. 2, p. 333–343, 1995.

PRADELLA, Paola; TOMASELLA, Federica; MASCARETTI, Luca. Physiology of Hemostasis. In: BERLOT, Giorgio (Ed.). **Hemocoagulative Problems in the Critically Ill Patient**. : Springer Milan, 2012. p. 1–19.

PRAKASH, Prem *et al.* Anti-platelet effects of Curcuma oil in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 2, p. 111–118, 2011.

PRAKASH, Prem; NAYAK, Manasa K.; CHAUHAN, Anil K. P-selectin can promote thrombus propagation independently of both von Willebrand factor and thrombospondin-1 in mice. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 2, p. 388–394, 2017.

PRESS, Valerie G. *et al.* Missed opportunities to transition from nebulizers to inhalers during hospitalization for acute asthma: A multicenter observational study. **Journal of Asthma**, v. 54, n. 9, p. 968–976, 2017.

PRIETO, Monica; RUCKER, Alexandra C.; PAYNE, Asha S. Increasing Metered Dose Inhaler Use For Acute Asthma Exacerbations In The Pediatric Emergency Department: A Quality Improvement Challenge. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, 2018.

PUNEKAR, Y. *et al.* **P132 Health care utilisation and costs among COPD patients newly prescribed maintenance therapy in the United Kingdom (UK)**: BMJ Publishing Group Ltd, 2015.

QURESHI, Zeshan; HOBSON, Alex R. Clopidogrel “Resistance”: Where are We Now? **Cardiovascular Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 3–11, 2013.

RAGHAVENDRAN, Hanumantha Rao Balaji; SRINIVASAN, Periasamy; REKHA, Sathyanath. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 157–163, 2011.

RAJAN, Jessica P. *et al.* Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: a meta-analysis of the literature. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 3, p. 676–681, 2015.

RÉ, Maria-Inês. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 433–446, 2006.

REN, Fuzheng *et al.* Characterization of ibuprofen microparticle and improvement of the dissolution. **Pharmaceutical development and technology**, v. 22, n. 1, p. 63–68, 2017.

REYES, J. J. *et al.* Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. **European journal of nutrition**, v. 52, n. 2, p. 591–599, 2013.

RHODES, Chris *et al.* **Multilayer Biodegradable Microparticles for Sustained Release of Therapeutic Agents**. [s.l: s.n.].

ROBBE, Alexandre *et al.* Intratracheal bleomycin aerosolization: the best route of administration for a scalable and homogeneous pulmonary fibrosis rat model? **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

ROGERS, Heesun J. *et al.* Laboratory Analysis of Coagulation. In: **The Coagulation Consult**. : Springer, 2014. p. 1–37.

ROSSI, S. *et al.* Drug release and washability of mucoadhesive gels based on sodium carboxymethylcellulose and polyacrylic acid. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 1, p. 55–63, 1999.

ROUZET, François *et al.* Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1433–1440, 2011.

ROY, Harekrishna; NAYAK, Bhabani Shankar. Formulation and Design of Microparticles based Drug Delivery System of Selective Anti-Retroviral Drug by Chitosan. **Scholars academy journal of pharmacy**, v. 6, n. 1, p. 34–39, 2017.

RUEHL-FEHLERT, Christine *et al.* Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1: A joint publication of the RITA and NACAD groups. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, n. 2–3, p. 91–106, 2003.

RUGE, Christian A.; KIRCH, Julian; LEHR, Claus-Michael. Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers—therapeutic possibilities and technological challenges. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 1, n. 5, p. 402–413, 2013.

RUIGROK, M. J. R.; FRIJLINK, H. W.; HINRICHS, W. L. J. Pulmonary administration of small interfering RNA: The route to go? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 14–23, 2016.

RUSO, Salvador *et al.* Bacterial vaccines in chronic obstructive pulmonary disease: effects on clinical outcomes and cytokine levels. **Apmis**, v. 123, n. 7, p. 556–561, 2015.

RUTHERFORD, Iain A. Haemostasis and disseminated intravascular coagulation. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 12, n. 3, p. 161–167, 1996.

RUTZ, Josiane K. *et al.* Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.

SAITO, Max Seidy *et al.* Antiplatelet pyrazolopyridines derivatives: pharmacological, biochemical and toxicological characterization. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1591–1601, 2016.

SAKATA, Chinatsu *et al.* Inhibitory effects of ASP6537, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, on thrombosis and neointima formation in rats. **Thrombosis Research**, v. 157, p. 72–78, 2017.

SALLUM, Loriz Francisco *et al.* Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 107–111, 2014.

SANTOS, Laisa A. *et al.* Effect of early treatment with transcutaneous electrical diaphragmatic stimulation (TEDS) on pulmonary inflammation induced by bleomycin. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 17, n. 6, p. 606–613, 2013.

SCAGLIONE, Francesco. New oral anticoagulants: comparative pharmacology with vitamin K antagonists. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 52, n. 2, p. 69–82, 2013.

SCHAFFAZICK, Scheila REZENDE *et al.* Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99–106, 2002.

SEIMON, Tracie; TABAS, Ira. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Suppl, p. S382–S387, 2009.

SEO, Pyoung Ju *et al.* Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats. **Gut and liver**, v. 6, n. 2, p. 210–217, 2012.

SEUTER, Friedel. Inhibition of platelet aggregation by acetylsalicylic acid and other inhibitors. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 5, n. 2, p. 85–95, 1976.

SEZER, A. D.; AKBUĞA, J. Fucosphere--new microsphere carriers for peptide and protein delivery: preparation and in vitro characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 5, p. 513–522, 2006.

SEZER, Ali Demir; AKBUĞA, Jülide. Comparison on <Emphasis Type="BoldItalic">In Vitro</Emphasis> Characterization of Fucospheres and Chitosan Microspheres Encapsulated Plasmid DNA (pGM-CSF): Formulation Design and Release Characteristics. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1193–1199, 2009.

SHAH, Rahman *et al.* Ticagrelor as an alternative in clopidogrel-associated neutropenia. **Platelets**, p. 1–3, 2014.

SHAH, S. U. *et al.* Spray-dried microparticles of glutathione and S-nitrosoglutathione based on Eudragit® FS 30D polymer. In: ANNALES PHARMACEUTIQUES FRANCAISES 2017, **Anais...** : Elsevier, 2017.

SHATOOR, Abdullah S. *et al.* Effect of Hawthorn (Crataegus aronia syn. Azarolus (L)) on Platelet Function in Albino Wistar Rats. **Thrombosis Research**, v. 130, n. 1, p. 75–80, 2012.

SHRIVASTAVA, Siddhartha *et al.* Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles. **ACS nano**, v. 3, n. 6, p. 1357–1364, 2009.

SIEPMANN, J. *et al.* HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 11, p. 1748–1756, 1999.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 163–174, 2012.

SIKKA, Pranav; BINDRA, V. K. Newer antithrombotic drugs. **Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 14, n. 4, p. 188, 2010.

SILVA, Amanda Karine Andriola; LETOURNEUR, Didier; CHAUVIERRE, Cédric. Polysaccharide nanosystems for future progress in cardiovascular pathologies. **Theranostics**, v. 4, n. 6, p. 579–591, 2014.

SILVA, L. C. R. P. Da *et al.* A promising oral fucoidan-based antithrombotic nanosystem: development, activity and safety. **Nanotechnology**, v. 29, n. 16, p. 165102, 2018.

SILVA, Marta C. *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub>-Assisted Spray Drying of Strawberry-Like Gold-Coated Magnetite Nanocomposites in Chitosan Powders for Inhalation. **Materials**, v. 10, n. 1, p. 74, 2017.

SILVESTRI, Elena *et al.* Cardiovascular Issues: Aneurysms and Pseudoaneurysms, Thrombosis, Atherosclerosis, and Cardiac Involvement. In: **Behçet's Syndrome**. : Springer, 2014. p. 125–135.

SINGH, Deepak J. *et al.* Preparation and evaluation of surface modified lactose particles for improved performance of fluticasone propionate dry powder inhaler. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 28, n. 4, p. 254–267, 2015.

SINGH, P. *et al.* Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 87–95, 2017.

SMOLA, Malgorzata; VANDAMME, Thierry; SOKOLOWSKI, Adam. Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2008.

SMYTH, Susan S. *et al.* G-Protein–Coupled Receptors as Signaling Targets for Antiplatelet Therapy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 4, p. 449–457, 2009.

SOLLOHUB, Krzysztof; CAL, Krzysztof. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587–597, 2010.

SONG, Qiling; WANG, Shisheng; ZHAO, Weijie. Total steroidal alkaloids from *Veratrum patulum* L. Inhibit platelet aggregation, thrombi formation and decrease bleeding time in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 183–186, 2012.

SONG, Xiling; CUI, Yong; XIE, Minli. Gelatin capsule shell cross-linking. **Pharmaceutical Technology**, v. 35, n. 5, p. 62–68, 2011.

SØRENSEN, Benny *et al.* The role of fibrinogen: a new paradigm in the treatment of coagulopathic bleeding. **Thrombosis Research**, v. 128 Suppl 1, p. S13-16, 2011.

STECKEL, Hartwig; BRANDES, Heike G. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 187–195, 2004.

STUPNISEK, Mirjana *et al.* Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 5, p. 652–659, 2012.

SUBRAMANIAN, Balajikarthick *et al.* Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 11, p. 1533–1539, 2008.

SUCKER, Christoph; ZOTZ, Rainer B. The Cell-Based Coagulation Model. In: **Perioperative Hemostasis**. : Springer, 2015. p. 3–11.

SULAIMAN, Imran *et al.* The impact of common inhaler errors on drug delivery: investigating critical errors with a dry powder inhaler. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 30, n. 4, p. 247–255, 2017.

SURIN, W. R. *et al.* Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: Effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 3, p. 287–291, 2010.

ŚWIERCZYŃSKA-KRĘPA, Monika *et al.* Aspirin desensitization in patients with aspirin-induced and aspirin-tolerant asthma: a double-blind study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 4, p. 883–890, 2014.

TAKAHASHI, O. Some properties of rat platelet aggregation and effects of butylated hydroxytoluene, warfarin and aspirin. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 29, n. 3, p. 173–183, 1991.

TAKAHASHI, O. Characteristics of rat platelets and relative contributions of platelets and blood coagulation to haemostasis. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 38, n. 2–3, p. 203–218, 2000.

TANAKA, Takao; SATO, Ryuichi; KURIMOTO, Tadashi. Z-335, a new thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, prevents arterial thrombosis induced by ferric chloride in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 401, n. 3, p. 413–418, 2000.

TANETSUGU, Yusuke *et al.* Development of a sustainable release system for a ranibizumab biosimilar using poly (lactic-co-glycolic acid) biodegradable polymer-based microparticles as a platform. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 145–150, 2017.

TANG, Siah Ying *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation. **International journal of pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 299–306, 2012.

TANG, Zhiyu *et al.* Anti-thrombotic activity of PDR, a newly synthesized L-Arg derivative, on three thrombosis models in rats. **Thrombosis Research**, v. 110, n. 2–3, p. 127–133, 2003.

TAO, Jin *et al.* Cellulose/polymer/silica composite cotton fiber based on a hyperbranch-mesostructure system as versatile adsorbent for water treatment. **Carbohydrate polymers**, v. 166, p. 271–280, 2017.

TELLO-MONTOLIU, A. *et al.* New perspectives in antiplatelet therapy. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 3, p. 406–427, 2012.

TESTA, LUCA *et al.* Ximelagatran/melagatran against conventional anticoagulation: a meta-analysis based on 22,639 patients. **International journal of cardiology**, v. 122, n. 2, p. 117–124, 2007.

THAKRAL, Seema; THAKRAL, Naveen K.; MAJUMDAR, Dipak K. Eudragit®: a technology evaluation. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 131–149, 2013.

THELWELL, C. Fibrinolysis standards: A review of the current status. **Biologicals**, v. 38, n. 4, p. 437–448, 2010.

THWALA, Lungile Nomcebo; PRÉAT, Veronique; CSABA, Noémi Stefania. Emerging delivery platforms for mucosal administration of biopharmaceuticals: a critical update on nasal, pulmonary and oral routes. **Expert opinion on drug delivery**, v. 14, n. 1, p. 23–36, 2017.

TIAN, Shuangyan *et al.* controlled drug delivery for glaucoma therapy using montmorillonite/eudragit microspheres as an ion-exchange carrier. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 415, 2018.

TIANI, Kendra A. *et al.* Extending viability of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* by microencapsulation in alginate microgels. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 155–164, 2018.

TOHTI, Ibadet *et al.* Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio–venous shunt thrombosis in vivo. **Thrombosis Research**, v. 118, n. 6, p. 733–739, 2006.

TOMASELLO, Salvatore Davide; ANGIOLILLO, Dominick J.; GOTO, Shinya. Inhibiting PAR-1 in the prevention and treatment of atherothrombotic events. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 19, n. 12, p. 1557–1567, 2010.

TONG, Zhenbo *et al.* Discrete Modelling of Powder Dispersion in Dry Powder Inhalers- A Brief Review. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 27, p. 3966–3973, 2015.

TRAPANI, Adriana *et al.* Systemic heparin delivery by the pulmonary route using chitosan and glycol chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1, p. 115–123, 2013.

TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M. **Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas**. 1 edition ed. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2011.

TRINH, Nga-Thi-Thanh *et al.* Effect of emulsification and spray-drying microencapsulation on the antilisterial activity of transcinnamaldehyde. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 7, p. 719–723, 2015.

TURPIE, Alexander G. G.; ESMON, Charles. Venous and arterial thrombosis-- pathogenesis and the rationale for anticoagulation. **Thrombosis and haemostasis**, v. 105, n. 4, p. 586–596, 2011.

UBAIDULLA, Udhumansha *et al.* Development and characterization of chitosan succinate microspheres for the improved oral bioavailability of insulin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 3010–3023, 2007.

UDANI, Jay; HESSLINK, Robert. The potential use of fucoidans from brown seaweed as a dietary supplement. **J Nutr Food Sci**, v. 2, n. 171, p. 2, 2012.

ULRICHTS, Hans *et al.* Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. **Blood**, v. 118, n. 3, p. 757–765, 2011.

VALENTA, Claudia. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Mucoadhesive Polymers: Strategies, Achievements and Future Challenges. , v. 57, n. 11, Mucoadhesive Polymers: Strategies, Achievements and Future Challenges, p. 1692–1712, 2005.

VAN BEERS, Miranda MC *et al.* Micro-Flow Imaging as a quantitative tool to assess size and agglomeration of PLGA microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 91–104, 2017.

VANDERWAGEN, J. A.; SMITH, C. Inhaler technique in patients attending an urban pulmonology practice. **South African Respiratory Journal**, v. 23, n. 1, p. 5–7, 2017.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis research**, v. 110, n. 5, p. 255–258, 2003.

VARGAFTIG, Bernardo B. Salicylic acid fails to inhibit generation of thromboxane A2 activity in platelets after in vivo administration to the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 101–104, 1978.

VARGAS, Maria *et al.* Characterization of chitosan–oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 536–547, 2009.

VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 403–412, 2008.

VARSHOSAZ, Jaleh *et al.* Enhancement of solubility and antidiabetic effects of Repaglinide using spray drying technique in STZ-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 22, n. 6, p. 754–763, 2017.

VEHRING, Reinhard. Pharmaceutical Particle Engineering <Emphasis Type="BoldItalic">via</Emphasis> Spray Drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, p. 999–1022, 2008.

VERSTEEG, H. H. *et al.* New Fundamentals in Hemostasis. **Cardiovasc Res**, v. 93, p. 327–358, 2013.

VERT, Michel *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.

VIJ, Neeraj *et al.* Neutrophil targeted nano-drug delivery system for chronic obstructive lung diseases. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 8, p. 2415–2427, 2016.

VIJ, Neeraj. Nano-based rescue of dysfunctional autophagy in chronic obstructive lung diseases. **Expert opinion on drug delivery**, v. 14, n. 4, p. 483–489, 2017.

VOYNOW, Judith A. What does mucin have to do with lung disease? **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 3, n. 2, p. 98–103, 2002.

WALLEN, Håkan; JOHNSON, Hans; BELLANDER, Bo-Michael. Antiplatelet drug therapy and reversal of its effects. In: MD, Jovan P. Antovic; MD, Rgareta Blombäck (Eds.). **Essential Guide to Blood Coagulation**. : John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 105–110.

WALTERS, Julia AE *et al.* Pneumococcal vaccines for preventing pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease. **The Cochrane Library**, 2017.

WANG, Han *et al.* Mechanical reinforcement of graphene/poly (vinyl chloride) composites prepared by combining the in-situ suspension polymerization and melt-mixing methods. **Composites Part B: Engineering**, v. 113, p. 278–284, 2017.

WANG, Junru *et al.* Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine. **Thrombosis and haemostasis**, v. 87, n. 01, p. 122–128, 2002.

WANG, Weiwei; KING, Michael R. Multiscale Modeling of Platelet Adhesion and Thrombus Growth. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 11, p. 2345–2354, 2012.

WANG, X. *et al.* **Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor**. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1538-7836.2006.01703.x>>. Acesso em: 1 jul. 2019.

WANG, Xinkang; XU, Lin. An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research. **Thrombosis Research**, v. 115, n. 1, p. 95–100, 2005.

WANG, Zhongzhi *et al.* Protective Effects of Ginger against Aspirin-Induced Gastric Ulcers in Rats. **Yonago Acta medica**, v. 54, n. 1, p. 11–19, 2011.

WARKENTIN, Theodore E. Agents for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 24, n. 4, p. 755–775, 2010.

WATT, Jonathan; DAWSON, Jesse; BRADY, Adrian J. B. Antithrombotic Treatment of Cardiovascular Disease. In: FERRO, Albert; GARCIA, David A. (Eds.). **Antiplatelet and Anticoagulation Therapy**. Current Cardiovascular Therapy : Springer London, 2013. p. 143–173.

WEBER, R.; WEIMAR, C.; DIENER, H. C. Antiplatelet agents in stroke prevention. **Hämostaseologie**, v. 29, p. 326–333, 2009.

WEITZ, Jeffrey I.; EIKELBOOM, John W.; SAMAMA, M. New Antithrombotic Drugs. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis. **CHEST Journal**, v. 141, n. 2\_suppl, p. e120S, 2012.

WHO. World Health Organization. , 2013.

WIJESINGHE, WAJP; JEON, You-Jin. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 13–20, 2012.

WILKINS, E. *et al.* European cardiovascular disease statistics 2017. **European Heart Network: Brussels, Belgium**, 2017.

WOLBERG, Alisa S.; CAMPBELL, Robert A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, n. 1, p. 15–23, 2008.

WONG, Yun-Ling *et al.* Drying a tuberculosis vaccine without freezing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 8, p. 2591–2595, 2007.

XIANG, Lusha *et al.* Insulin resistance and impaired functional vasodilation in obese Zucker rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 4, p. H1658–H1666, 2008.

YADIDI, Kambiz. **Dry powder inhaler and methods of use**, WO2014098945A1, 2014.

YANG, Han-Joo *et al.* Improving the encapsulation efficiency and sustained release behaviour of chitosan/ $\beta$ -lactoglobulin double-coated microparticles by palmitic acid grafting. **Food chemistry**, v. 220, p. 123–128, 2017.

YANG, Jane K.; JIMENEZ, Juan Carlos; JABORI, Sinan. Antiplatelet therapy before, during, and after extremity revascularization. **Journal of vascular surgery**, v. 60, n. 4, p. 1085–1091, 2014.

YAPA, Shalini WS *et al.* Pulmonary and systemic pharmacokinetics of inhaled and intravenous colistin methanesulfonate in cystic fibrosis patients: targeting advantage of inhalational administration. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2570–2579, 2014.

YATAGANBABA, Alptug; OZKAHRAMAN, Bengi; KURTBAS, Irfan. Worldwide trends on encapsulation of phase change materials: A bibliometric analysis (1990–2015). **Applied energy**, v. 185, p. 720–731, 2017.

YILDIZ-PEKOZ, Ayca; OZSOY, Yildiz. Inhaled Heparin: Therapeutic Efficacy and Recent Formulations. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 30, n. 3, p. 143–156, 2017.

YUSUF, Salim; MCKEE, Martin. Documenting the Global Burden of Cardiovascular Disease A Major Achievement but Still a Work in Progress. **Circulation**, v. 129, n. 14, p. 1459–1462, 2014.

ZAPOROZHETS, Tatyana; BESEDNOVA, Natalia. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3126–3135, 2016.

ZATTA, Kelly Cristine *et al.* An Inhalable Powder Formulation Based on Micro- and Nanoparticles Containing 5-Fluorouracil for the Treatment of Metastatic Melanoma. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, p. 75, 2018.

ZELIKIN, Alexander N.; EHRHARDT, Carsten; HEALY, Anne Marie. Materials and methods for delivery of biological drugs. **Nature chemistry**, v. 8, n. 11, p. 997, 2016.

ZERNOV, A. L. *et al.* Low molecular weight poly(3-hydroxybutyrate) microparticles synthesized by piezoelectric spray drying for the sustained release of paclitaxel. **Nanotechnologies in Russia**, v. 12, n. 3–4, p. 218–225, 2017.

ZHANG, Jing-Yao *et al.* Protective role of hydrogen-rich water on aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 6, p. 1614–1622, 2014.

ZHANG, S. *et al.* BF0801, a novel adenine derivative, inhibits platelet activation via phosphodiesterase inhibition and P2Y12 antagonism. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 104, n. 4, p. 845–857, 2010.

ZHANG, Yong. Apixaban for oral antithrombotic therapy: is a new era coming? **Molecular and Cellular Therapies**, v. 2, n. 1, p. 4, 2014.

ZHAO, Xue *et al.* Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from Laminaria Japonica. **Thrombosis research**, v. 144, p. 46–52, 2016.