

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

Desenvolvimento, caracterização e avaliação toxicológica de aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas por *spray-drying* utilizando diferentes adjuvantes de secagem planejados para administração pulmonar de fármacos

MARGANI TAISE FIN

PORTO ALEGRE, 2018



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

Desenvolvimento, caracterização e avaliação toxicológica de aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas por *spray-drying* utilizando diferentes adjuvantes de secagem planejados para administração pulmonar de fármacos

Dissertação apresentada por **Margani Taise Fin**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Stanisçuaski Guterres

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia

Porto Alegre, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de Março de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Profª Drª Letícia Marques Colomé  
Universidade Federal do Pampa

Profª Drª Mariele Feiffer Charão  
Universidade FEEVALE

Profª Drª Valquíria Linck Bassani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fin, Margani Taise  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação  
toxicológica de aglomerados de nanocápsulas  
poliméricas secas por spray-drying utilizando  
diferentes adjuvantes de secagem planejados para  
administração pulmonar de fármacos / Margani Taise  
Fin. -- 2018.

98 f.

Orientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

Coorientadora: Solange Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2018.

1. Nanocápsulas. 2. Spray-drying. 3. Liberação  
pulmonar. 4. Pós inalatórios. 5. Nanotoxicologia. I.  
Guterres, Silvia Stanisçuaski, orient. II. Garcia,  
Solange Cristina, coorient. III. Título.

*Agradecimentos ao CNPq/Brasil que financiou a bolsa de estudos, à CAPES/Brasil e FAPERGS (Pronex) pelo suporte financeiro necessário ao desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios de Cosmetologia e Toxicologia da UFRGS, que disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.*



À minha família: minha mãe Libera e meu  
pai Dirceu, minhas irmãs Franci e Laura, e  
ao meu companheiro Augusto.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Ser maior, nosso guia e mentor, anjo protetor.

Aos meus pais, Libera e Dirceu, que nunca deixaram de me incentivar quaisquer fossem as dificuldades encontradas, sempre com aquela palavra de apoio. A vocês minha eterna gratidão, pelo exemplo de garra e determinação, pela linda família que somos.

Ao meu companheiro Augusto, que soube respeitar e aceitar minha ausência nas tantas idas e vindas para o laboratório, semanas fora do nosso lar, mas que sempre esteve lá para me apoiar e incentivar.

Às minhas irmãs Franci e Laura, que apesar da distância, alguns tantos quilômetros que nos separam, sempre estiveram por perto mandando energias positivas e compartilhando seu amor.

Aos meus avós Máximo, Maria e Balduino (*in memoriam*) por todos os ensinamentos que me repassaram em vida. E à querida “nona Fin” (nona Elza), pelo exemplo de garra e luta pela vida, que apesar da distância sempre esteve torcendo e orando por mim.

À minha família de coração que o Rio Grande do Sul me deu, especialmente à Rejane, que me recebeu em sua casa, abriu-me as portas e acolheu-me como sua “filha do coração”.

Aos mestres que durante minha vida pessoal, profissional e acadêmica tive o prazer de conviver e aprender com eles.

À professora Silvia que aceitou o desafio de me orientar em um dos momentos mais difíceis para nossa ciência, numa época de muitos cortes de verbas. Sua luta para conseguir verbas para nosso laboratório e principalmente seus ensinamentos, repassados e compartilhados, tornaram este trabalho uma realidade.

À professora Solange, que aceitou esta coorientação e conduziu da melhor maneira possível os desafios enfrentados para alcançarmos nossos objetivos.

Aos colegas do laboratório 405 que sempre estiveram presentes para ajudar, colaborar e sanar aquelas dúvidas repentinas.

Às queridas Leidy e Simara, pela nossa amizade. Que consigamos manter os laços aqui criados até onde nossos destinos nos levarem, sejam eles próximos ou a milhares de quilômetros de distância.

Aos queridos colegas do laboratório de toxicologia, Gabi, Ingrid, Otávio e Wesley, sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível, de todo o coração meu obrigada a vocês.

“O verdadeiro homem mede sua força quando se defronta com o obstáculo”  
(*O Pequeno Príncipe* – Antoine de Saint-Exupéry).



## RESUMO

O trato respiratório é considerado uma via não invasiva para a administração de fármacos, seja para alcançar um efeito local ou sistêmico. Adicionalmente os fármacos administrados por esta via não sofrem com o metabolismo de primeira passagem. A via oferece elevada área de superfície com um rápido início de ação dos fármacos por ela administrados. Devido às inúmeras vantagens relacionadas a esta via de administração, muitos esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de nanocarreadores para a administração de fármacos pela via pulmonar. Entretanto, algumas características são necessárias para uma adequada administração de fármacos por esta via, como o uso de matérias biocompatíveis e biodegradáveis, e adequada estabilidade físico-química. Adicionalmente, é necessário que a formulação não induza nenhum tipo de resposta antiinflamatória no tecido, e principalmente apresente diâmetro entre 1 a 5  $\mu\text{m}$ . O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar diferentes aglomerados de nanocápsulas secas por *spray-drying* para liberação pulmonar, bem como sua avaliação toxicológica. Foram desenvolvidos 4 diferentes aglomerados de nanocápsulas utilizando diferentes adjuvantes, LNC-Leu 1 %, LNC-Lac 1 %, LNC-Man 1 % e LNC-Aer 1 %, produzidos com leucina, lactose, manitol e aerosil, respectivamente. Todas as formulações apresentaram tamanho de partícula entre 1 a 5  $\mu\text{m}$ , exceto a formulação contendo manitol que apresentou diâmetro superior, de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ . A análise de desaglomeração por via úmida indicou que apenas a formulação LNC-Leu 1% foi capaz de demonstrar a recuperação das nanopartículas após a redispersão dos pós em meio aquoso. O rendimento para as formulações variou entre 50 a 70% dependendo do adjuvante utilizado no processo de secagem e a umidade relativa para todas as formulações foi menor que 5 %. Os estudos prosseguiram com a formulação LNC-Leu 1 %, que foi submetida a teste em impactador em Cascata de Andersen, cujo FPF obtido foi maior que 60%. As análises de toxicidade realizadas em *C. elegans* demonstraram que as nanocápsulas foram internalizadas e distribuídas pelos tecidos sem causar alteração no desenvolvimento ou morte significativa nos nematoides.

**Palavras-chave:** nanocápsulas, *spray-drying*, pós inalatórios, liberação pulmonar, nanotoxicologia.



## ABSTRACT

The respiratory tract is considered a non-invasive route for the administration of drugs, whose effect can be either local or systemic. Additionally, the drugs administered by this route do not suffer from the first-pass metabolism. The route provides a high surface area with a rapid onset of the drugs administered by it. Due to the innumerable advantages related to this route of administration, numerous efforts have been directed to the development of nanocarriers for the administration of drugs by the pulmonary route. However, some characteristics are necessary for a suitable drug in this way, such as the use of biodegradable and biocompatible materials presenting adequate physical-chemical stability. Additionally, the formulation mustn't induce any type of anti-inflammatory response in the tissue and mainly has a diameter between 1 to 5  $\mu\text{m}$ . The objective of this work was to develop and characterize different agglomerates of dried nanocapsules by *spray-drying* for pulmonary release, as well as their toxicological evaluation. Four different agglomerates of nanocapsules were prepared using different adjuvants, LNC-Leu 1 %, LNC-Lac 1 %, LNC-Man 1 %, and LNC-Aer 1 %, leucine, lactose, mannitol, and aerosil, respectively. All formulations had a particle size between 1 and 5  $\mu\text{m}$ , except for the mannitol containing formulation which had a diameter close to 8  $\mu\text{m}$ . The wet deagglomeration analysis indicated that only the LNC-Leu 1 % formulation was able to demonstrate the recovery of the nanoparticles after the redispersion of the powders in an aqueous medium. The yield for the formulations ranged from 50 to 70% depending on the adjuvant used in the drying process and the relative humidity for all formulations was less than 5 %. The studies continued with the LNC-Leu 1 % formulation, which was tested in an Andersen Cascade impactor, whose FPF obtained was greater than 60 %. Toxicity analyzes performed on *C. elegans* demonstrated that the nanocapsules were internalized and distributed through the tissues without causing developmental change or significant death in the nematodes.

**Keywords:** nanocapsules, *spray-drying*, inhalation powders, pulmonary release, nanotoxicology.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Impactador em Cascata de Andersen .	53
Figura 2 - Gráfico radar de distribuição de tamanho por difração de laser (via úmida) LNC <sub>BC</sub> . (n=3).	60
Figura 3 - Gráfico radar de distribuição de tamanho por difração de laser (via úmida) LNC <sub>Mel</sub> . (n=3)	60
Figura 4 - Gráfico radar de distribuição média de tamanho por difração de laser (via úmida) LNC <sub>BC</sub> X LNC <sub>Mel</sub> . (n=3).	61
Figura 5 - Gráfico radar de distribuição média de tamanho por difração de laser (via seca) dos aglomerados, LNC-Leu 1%, LNC-Lac 1%, LNC-Man 1% e LNC-Aer 1%, produzidos com Leucina, Lactose, Manitol e Aerosil, respectivamente. (n=3)	64
Figura 6 - Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) da formulação LNC-Lac 1%, na magnificação de 20k, 10k e 5k.	65
Figura 7 - Perfil de desaglomeração após 30 minutos obtido por difração de laser (via úmida) da LNC-Lac 1%. (n=3)	66
Figura 8 - Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) da formulação LNC-Leu 1%, na magnificação de 20k, 10k e 5k.	67
Figura 9 - Perfil de desaglomeração após 30 minutos obtido por difração de laser (via úmida) da LNC-Leu 1%. (n=3)	68
Figura 10 - Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) da formulação LNC-Man 1%, na magnificação de 20k, 10k e 5k.	69
Figura 11 - Perfil de desaglomeração após 30 minutos obtido por difração de laser (via úmida) da formulação LNC-Man 1%. (n=3).	69
Figura 12 - Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) da formulação LNC-Aer 1%, na magnificação de 20k, 10k e 5k.	70
Figura 13 - Perfil de desaglomeração após 30 minutos obtido por difração de laser (via úmida) da formulação LNC-Aer 1%. (n=3)	71
Figura 14 - Gráfico radar de distribuição média de tamanho por difração de laser (via seca) da formulação LNC-Leu 1% versus LNC-Mel-Leu 1%. (n=3).	74
Figura 15 - Perfil de desaglomeração após 30 minutos obtido por difração de laser (via úmida) da formulação LNC-Mel-Leu 1%.	75
Figura 16 - Perfil de distribuição da formulação LNC-Mel-Leu 1% em impactador em Cascata de Andersen.	76

Figura 17 - Microscopia dos vermes expostos a LNC-NR-Leu 1%. .....	77
Figura 18 - Medida da área corporal do <i>C. elegans</i> após 3 horas de exposição à diferentes concentrações de LNC-Leu 1%. ( $p>0,05$ ).....	78
Figura 19 - Medida da área corporal do <i>C. elegans</i> após 3 horas de exposição às diferentes concentrações de LNC-Leu 1%. ( $p>0,05$ ).....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização físico-química das suspensões de LNC. (n=3) .....	61
Tabela 2 - Valores de tamanho da partícula, rendimento do processo e umidade relativa do pó. (n=3).....	62
Tabela 3 - Análise de densidade, compactação, fluxo dos pós e diâmetro aerodinâmico das diferentes formulações. (n=3) .....	72
Tabela 4 - Análise de densidade, compactação, fluxo dos pós e diâmetro aerodinâmico da formulação LNC-Leu 1% acrescida de um melhorador de fluxo. (n=3) .....	72
Tabela 5 - Valores de tamanho da partícula por difração a laser. (n=3).....	73



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 OBJETIVO GERAL .....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	31
3.1 PULMÃO: ANATOMIA E FISILOGIA HUMANA .....	33
3.1.1 Pulmão: uma via alternativa à administração de fármacos.....	34
3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR .....	35
3.2.1 Técnicas para obtenção de sistemas nanoparticulados inaláveis .....	38
3.2.2 Dispositivos de inalação para sistemas de nanopartículas inaláveis .....	39
3.2.3 Nanopartículas inaláveis: aplicabilidade e toxicidade .....	40
3.3 ADJUVANTES DE SECAGEM: LACTOSE, LEUCINA, MANITOL E AEROSIL .	43
3.4 MELATONINA .....	44
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
4.1 MATERIAIS E REAGENTES .....	47
4.1.1 Preparo e caracterização das nanocápsulas e seus aglomerados .....	47
4.1.2 Análises toxicológicas.....	47
4.2 MÉTODOS.....	47
4.2.1 Produção das nanocápsulas de núcleo lipídico .....	47
4.2.2 Caracterização físico-química da dispersão coloidal de nanocápsulas poliméricas.....	48
4.2.2.1 <i>Análise macroscópica</i> .....	48
4.2.2.2 <i>pH</i> .....	48
4.2.2.3 <i>Tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão</i> .....	48
4.2.3 Produção dos aglomerados das nanocápsulas poliméricas secas por <i>spray-drying</i> .....	49
4.2.4 Caracterização dos aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas .....	50
4.2.4.1 <i>Análise morfológica</i> .....	50
4.2.4.2 <i>Análise de rendimento de processo</i> .....	50
4.2.4.3 <i>Análise de umidade dos pós</i> .....	50
4.2.4.4 <i>Perfis de distribuição de tamanho dos aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas</i> .....	51

4.2.4.5 Perfis de desaglomeração dos aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas.....	51
4.2.4.6 Densidade aparente e compactada, índice de Carr, fator de Hausner, ângulo de repouso, diâmetro aerodinâmico teórico e massa média do diâmetro aerodinâmico (MMAD) .....	51
4.2.4.7 Quantificação da melatonina .....	52
4.2.4.8 Performance <i>in vitro</i> dos pós.....	53
4.2.5 Avaliação toxicológica <i>in vivo</i> dos aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas utilizando o nematoide <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	54
4.2.5.1 Sincronização dos vermes .....	54
4.2.5.2 Preparo das placas para o tratamento .....	55
4.2.5.3 Absorção oral .....	55
4.2.5.4 Sobrevivência e desenvolvimento dos vermes.....	56
4.2.5.5 Análise estatística .....	56
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (LNC) .....	59
5.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS AGLOMERADOS DE NANOPARTÍCULAS SECAS POR <i>SPRAY-DRYING</i> .....	62
5.2.1 Performance <i>in vitro</i> do aglomerado seco de nanocápsulas LNC-Leu 1%.....	75
5.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO AGLOMERADO DE NANOCÁPSULAS LNC-LEU 1 % SECA POR SPRAY DRYER EM <i>C. ELEGANS</i> .....	76
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
ANEXO A - Covalidação de metodologia analítica para quantificação de melatonina	93

# 1 INTRODUÇÃO



O trato respiratório se destaca em relação às demais vias de administração, pois é considerada uma via não invasiva que permite tanto um efeito local quanto sistêmico de fármacos e possui elevada área de superfície (SUNG; PULLIAM; EDWARDS, 2007; YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008; MANSOUR; RHEE; WU, 2009; BECK-BROICHSITTER; MERKEL; KISSEL, 2012). Os fármacos administrados não sofrem metabolismo de primeira passagem e apresentam rápido início da ação terapêutica (MANSOUR; RHEE; WU, 2009). Considerando as inúmeras vantagens citadas, a via pulmonar tem despertado o interesse dos pesquisadores para a administração de fármacos e proteínas carregados por sistemas nanoestruturados.

O pulmão é o órgão alvo desta via, sendo dividido em duas regiões, as vias aéreas superiores (traqueia, brônquios e bronquíolos) e a zona respiratória (alvéolos) (YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008; BECK-BROICHSITTER; MERKEL; KISSEL, 2012). Possui uma área superficial recoberta por uma fina camada de epitélio, com ampla vascularização e baixa atividade enzimática (GARCIA, 2014), o que lhe confere características ótimas como via de administração alternativa.

As características anatômicas e fisiológicas do pulmão lhe conferem vantagens como via de administração de fármacos uma vez que: permite a distribuição uniforme de fármacos pelos alvéolos; aumento da solubilidade de fármacos através de nanocarreadores quando comparado a solução de fármaco livre; liberação sustentada; redução da frequência de dose; possibilidade de entrega de macromoléculas; diminuição dos efeitos adversos; melhoria da adesão do paciente ao tratamento; e a possibilidade de internalização de fármaco pelas células (MANSOUR; RHEE; WU, 2009).

Considerando as características fisiológicas do pulmão, micro- e nanopartículas respiráveis (pós inaláveis) vêm sendo desenhadas para permitir a deposição efetiva sobre o tecido, bem como, uma liberação controlada de fármacos a fim de tratar diferentes doenças. Entretanto, para que este objetivo seja alcançado, é necessário levar em consideração que partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$  permanecem em sua maioria nas vias aéreas superiores por impactação inercial, partículas com um tamanho de 1 a 5  $\mu\text{m}$  se depositam por sedimentação gravitacional nas vias central e distal do trato respiratório, e partículas entre 0,1 e 1  $\mu\text{m}$  são preferencialmente exaladas (LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014).

Entre as diferentes técnicas para a obtenção de sistemas nanoestruturados para administração pulmonar podemos citar as técnicas de: secagem por aspersão ou *spray dryer* (TOMODA et al., 2008; CRUZ et al., 2011; DURET et al., 2012; OSMAN et al., 2013; PARIKH & DALWADI, 2014; MURALIDHARAN et al., 2016; PRICE et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2018), liofilização ou *freeze drying* (SHAM et al., 2004), CO<sub>2</sub> supercrítico (TAVARES et al., 2017) e secagem por atomização vibracional (Nanospray-dryer) (FONTANA et al., 2014).

No entanto, para que seja possível a transformação de uma suspensão de nanopartículas em pó, na maioria das vezes faz-se necessário o uso de adjuvantes de secagem, sendo a maior parte deles derivados de açúcares.

Os adjuvantes mais utilizados nos estudos levantados foram: a lactose (SHAM et al., 2004; AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2008; TOMODA et al., 2008; d'ANGELO et al., 2015; PRICE et al., 2017), o manitol (SHAM et al., 2004; DURET et al., 2012; d'ANGELO et al., 2015; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015; AGHDAM et al., 2016; MURALIDHARAN et al., 2016), a trealose (TOMODA et al., 2008) e a leucina (CRUZ et al., 2011; OSMAN et al., 2013; TAVARES et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2018).

A técnica de secagem por aspersão foi empregada em nosso grupo para a secagem de suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas visando a melhoria da estabilidade físico-química das mesmas (GUTERRES et al., 1999, 2000; MÜLLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002). O dióxido de silício coloidal foi o adjuvante escolhido, cuja via de administração proposta foi a via oral. A caracterização físico-química dos pós evidenciou que as nanocápsulas poliméricas são resistentes ao processo de desidratação, sendo detectadas intactas nos pós, como demonstrado por avaliações empregando microscopia eletrônica de varredura. Estas mesmas estruturas que inicialmente foram estudadas para administração por via oral, têm recebido esforços também para o desenvolvimento tecnológico, comprovação da atividade biológica e estudo dos aspectos toxicológicos, para a via pulmonar.

Considerando as vantagens da via pulmonar como opção para a entrega de fármacos e macromoléculas, a aplicabilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico secas por *spray-drying* e os poucos estudos de toxicidade de nanocápsulas secas administradas por via pulmonar, buscamos desenvolver diferentes aglomerados de nanocápsulas inaláveis e avaliá-los quanto a sua caracterização físico-química e seu

desempenho aerodinâmico, bem como, aos seus aspectos toxicológicos com vistas a atestar a segurança das formulações.



## **2 OBJETIVOS**



## 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar aglomerados de nanocápsulas poliméricas secas por *spray drying* utilizando diferentes adjuvantes de secagem para liberação pulmonar de fármacos, bem como, avaliar aspectos toxicológicos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado;
- Realizar o processo de secagem das nanocápsulas poliméricas por *spray-drying* utilizando diferentes adjuvantes de secagem;
- Caracterizar físico-quimicamente as dispersões coloidais de nanocápsulas poliméricas e os aglomerados das nanocápsulas poliméricas secas;
- Avaliar a influência dos adjuvantes de secagem sob os perfis de desaglomeração dos pós e perfis de distribuição de diâmetro das partículas e selecionar a(s) formulação(ões) de acordo com as características desejadas;
- Caracterizar o desempenho aerodinâmico da(s) formulação(ões) selecionada(s) utilizando a melatonina como fármaco modelo;
- Avaliar a toxicidade do aglomerado de nanocápsulas poliméricas que apresentar características físico-químicas e aerodinâmicas adequadas para liberação pulmonar de fármacos utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo animal de avaliação toxicológica.



### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



### 3.1 PULMÃO: ANATOMIA E FISIOLOGIA HUMANA

O sistema respiratório pode ser estruturalmente dividido em: superior, que inclui o nariz, a faringe e estruturas associadas; e inferior, formado pela laringe, traqueia, árvore bronquial, alvéolos pulmonares e pulmões. Também pode ser dividido de acordo com a funcionalidade em: porção condutora e porção respiratória. A porção condutora, ou vias aéreas, tem como função filtrar, aquecer e umedecer o ar, além de servir como via de passagem dos gases expirados e inspirados. Esta porção inclui o nariz, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais. Já a porção respiratória é onde ocorrem as trocas gasosas entre o ar e o sangue e é composta pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e suas unidades estruturais, os alvéolos (TORTORA; GRABOWSKI, 2002; VAN DE GRAAFF, 2003).

Além de realizar a troca gasosa (ingestão de  $O_2$  e eliminação de  $CO_2$ ), o sistema respiratório também participa da regulação do pH sanguíneo, contém receptores responsáveis pelo olfato, filtra o ar inspirado, livra o corpo de água e calor (no ar exalado), e possibilita a produção do som ou vocalização quando o ar expirado atravessa as pregas vocais. O processo de trocas gasosas é chamado de respiração e refere-se a três funções: (1) ventilação ou respiração, definida pela entrada do ar nos pulmões (inspiração) e a sua saída (expiração); (2) troca de gases entre o ar e o sangue nos capilares dos pulmões, também chamada de respiração externa; (3) e a troca de gases entre o sangue nos capilares sistêmicos e as células de outros tecidos, ou respiração interna, que permite a utilização do oxigênio pelos tecidos nas reações metabólicas de liberação de energia, denominadas de respiração celular (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

As estruturas do sistema respiratório estão revestidas com diferentes tipos de epitélio. As unidades funcionais dos pulmões, os alvéolos, são minúsculas expansões (0,25-0,50 mm de diâmetro) que apresentam apenas uma camada de células de epitélio escamoso simples. A troca dos gases ocorre por difusão através da membrana respiratória, composta por quatro camadas: (1) a parede alveolar, constituída por uma camada de células alveolares do tipo I e do tipo II, além dos macrófagos alveolares associados; (2) a membrana basal epitelial subjacente; (3) a membrana basal capilar; (4) e as células endoteliais dos capilares. Apesar das

camadas, a membrana respiratória é muito fina (0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), o que permite a difusão rápida dos gases. Além disso, o grande número de alvéolos (aproximadamente 350 milhões por pulmão, considerando uma pessoa adulta) propiciam uma imensa área de superfície, de 60 a 80  $\text{m}^2$ , para a troca de gases (TORTORA; GRABOWSKI, 2002; VAN DE GRAAFF, 2003). O lúmen alveolar possui um diâmetro inferior a 400 nm e fatores como a grande área superficial e o contato íntimo do sangue com o ar nesta região, tornam os alvéolos menos protegidos contra substâncias inaladas, como as nanopartículas, quando comparado às vias aéreas (COURRIER; BUTZZ; VANDAMME, 2002).

### **3.1.1 Pulmão: uma via alternativa à administração de fármacos**

O trato respiratório se destaca em relação às demais vias de administração, pois é considerada uma via não invasiva que permite tanto um efeito local quanto sistêmico de fármacos (SUNG; PULLIAM; EDWARDS, 2007; YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008; MANSOUR; RHEE; WU, 2009; BECK-BROICHSITTER; MERKEL; KISSEL, 2012), estes não sofrem metabolismo de primeira passagem e apresentam rápido início da ação terapêutica, por conta da elevada área de superfície proveniente dos alvéolos pulmonares (MANSOUR; RHEE; WU, 2009). Desta forma, considerando as inúmeras vantagens citadas, a administração pulmonar tem despertado o interesse dos cientistas como via para a administração de fármacos e proteínas carregados por sistemas nanoestruturados.

Adicionalmente, o trato respiratório possui uma área de superfície recoberta por uma fina camada de epitélio, com ampla vascularização e baixa atividade enzimática (GARCIA, 2014), o que lhe confere características ótimas como via de administração alternativa.

As vantagens de utilizar esta via são decorrentes das características anatômicas e fisiológicas do pulmão, sendo elas: a possibilidade de distribuição uniforme de fármacos pelos alvéolos; solubilidade aumentada do fármaco nanoencapsulado quando comparado a solução de fármaco livre; a liberação sustentada; a redução da frequência de dose; a possibilidade de entrega de macromoléculas; a diminuição dos efeitos adversos; a melhoria à adesão do paciente e a possibilidade de internalização de fármaco pelas células (MANSOUR; RHEE; WU, 2009).

Considerando os aspectos fisiológicos do pulmão, as nanopartículas inaláveis vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de realizar uma deposição efetiva de fármacos e uma liberação modificada para o tratamento de diferentes patologias. Entretanto, é necessário que estes pós inaláveis, como também são conhecidas, apresentem um tamanho de partícula entre 1 a 5  $\mu\text{m}$  o que permite uma sedimentação gravitacional nas vias central e distal do trato respiratório. Partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$  permanecem em sua maioria nas vias aéreas superiores através da impactação inercial, enquanto que partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  são facilmente exaladas (LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014).

### 3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR

Nas últimas décadas, nanopartículas vêm sendo desenvolvidas e estudadas com a finalidade de reduzir efeitos toxicológicos de substâncias (PRICE et al., 2017), controle de liberação (JÄGER et al., 2009; LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014; PATRA et al., 2014; MENON et. al., 2017), proteção à fotodegradação, metabolização e estabilidade de fármacos (POHLMANN, et al., 2000), e mais recentemente sua aplicação na teranóstica (PATRA et al., 2014).

Dentre as estruturas que vem sendo estudadas estão, as nanopartículas poliméricas (MANSOUR; RHEE; WU, 2009; LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014), nanoemulsões (MANSOUR; RHEE; WU, 2009), lipossomas (MANSOUR; RHEE; WU, 2009; LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014), nanopartículas lipídicas sólidas (MANSOUR; RHEE; WU, 2009; LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014), ciclodextrinas (SALZANO et al., 2017) e os dendrímeros (MANSOUR; RHEE; WU, 2009; LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014), cuja a aplicabilidade envolve diferentes vias de administração, como a via oral, parenteral, vaginal, ocular, nasal e pulmonar.

Considerando especificamente a via pulmonar como objeto de estudo e as necessidades para o desenvolvimento de sistemas, identificamos diversos estudos realizados com o objetivo de produzir sistemas nanoestruturados na forma de pó inalável, tanto para a obtenção de uma ação local como sistêmica. Dentre as patologias que mais vem sendo estudadas e sua aplicabilidade, podemos citar seu uso na terapia do câncer (MENON et. al., 2017; PRICE et al., 2017; ABDELAZIZ et

al., 2018), tratamento de doenças negligenciadas como a tuberculose (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015; RAWAL et al., 2017; SALZANO et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2018), fibrose cística (d'ANGELO et al., 2015; PORSIO et al., 2017; TORGE et al., 2017), doenças pulmonares inflamatórias (MURALIDHARAN et al., 2016; RIGO et al., 2017; d' ALMEIDA et al., 2018), infecções por fungos (AGHDAM et al., 2016) e bactérias (OSMAN et. al., 2013), e até para a administração de vacinas como sistema de liberação pulmonar (TAVARES et al., 2017).

Dentre as técnicas mais utilizadas para sua obtenção encontra-se a técnica de *spray-drying*, também conhecida por secagem por aspensão (SHAM et al., 2004; TOMODA et al, 2008; CRUZ et al., 2011; DURET et al., 2012; OSMAN et al., 2013; FONTANA et al., 2014; PARIKH & DALWADI, 2014; MURALIDHARAN et al., 2016; PRICE et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2018) e os adjuvantes mais utilizados são: a lactose (SHAM et al., 2004; AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2008; TOMODA et al, 2008; d'ANGELO et al., 2015; PRICE et al., 2017), o manitol (SHAM et al., 2004; DURET et al., 2012; d'ANGELO et al., 2015; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015; AGHDAM et al., 2016; MURALIDHARAN et al., 2016), a trealose (TOMODA et al, 2008) e a leucina (CRUZ et al., 2011; OSMAN et al., 2013; TAVARES et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2018).

As nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), objeto do nosso estudo neste trabalho, consistem em um sistema aquoso nanoestruturado composto de um núcleo com características de organogel envolto por uma parede polimérica, estabilizada pela presença de surfactantes preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011).

Em nosso grupo de pesquisa, os primeiros estudos empregando a técnica de secagem por aspensão foram realizados com o intuito de promover a secagem de suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas visando ao aumento da estabilidade físico-química das formulações (GUTERRES et al., 1999, 2000; MÜLLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002). O adjuvante de secagem empregado nestes estudos foi o dióxido de silício coloidal e a caracterização físico-química dos pós evidenciou que as nanocápsulas poliméricas são resistentes ao processo de desidratação, sendo detectadas intactas nos pós, como demonstrado por avaliações empregando microscopia eletrônica de varredura. As nanocápsulas secas foram propostas para a administração oral.

Recentemente o nosso grupo de pesquisa direcionou esforços para desenvolver pós inaláveis de nanocápsulas de núcleo lipídico para o tratamento de diferentes doenças. Os resultados *in vivo* demonstraram que a budesonida nanoencapsulada e veiculada na forma de *dry powders inhalers* em comparação ao fármaco livre foi capaz de melhorar parâmetros como resistência das vias aéreas e elastância pulmonar, além de impedir a inflamação eosinofílica, a superprodução de muco e fibrose peribrônquica. Estes efeitos foram atribuídos à maior inibição de eotaxina-1 e das citocinas pró-inflamatórias (ORTIZ et al., submetido para publicação no *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*).

Torge e colaboradores (2017) estudaram o uso das LNCs carregadas de ciprofloxacino para o tratamento de fibrose cística, patologia esta que acomete o pulmão. Seu objetivo foi realizar o controle de liberação através do uso da nanotecnologia e aumentar a capacidade de permeação na mucosa pulmonar. Os autores realizaram o teste de permeação em muco pulmonar através da avaliação da difusão das nanocápsulas em modelo adaptado com membrana Transwell® e muco de cavalo, obtido por lavagem broncoalveolar e distribuído sobre a membrana. O estudo permitiu concluir que este sistema foi capaz de alcançar uma liberação sustentada do ciprofloxacino além de aumentar em 50% a capacidade de permeação da mucosa quando comparado com o ciprofloxacino livre em suspensão.

D'Almeira e colaboradores (2018) investigaram a atividade biológica da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo  $\alpha$ -bisabolol para o tratamento de inflamação pulmonar induzida por lipopolisacarídeos em ratos. A forma de administração foi por meio da gavagem (via oral) com a finalidade de investigar a atividade anti-inflamatória do  $\alpha$ -bisabolol. Os autores concluíram que as  $\alpha$ -bis-LNCs foram capazes de atingir um efeito anti-inflamatório no modelo de inflamação aguda do pulmão, uma vez que foi capaz de reduzir a inflamação causada pela liposacaridose induzida, bem como demonstrou níveis elevados de  $\alpha$ -bisabolol nos tecidos pulmonares.

Considerando as inúmeras vantagens e aspectos positivos que as nanocápsulas de núcleo lipídico têm apresentado no tratamento de doenças pulmonares seja na sua forma de suspensão ou pó, objetivamos investigá-las frente a diferentes tipos de adjuvantes, previamente selecionados, a fim de obter formulações mais estáveis, que permitissem fácil aplicação e com características aerodinâmicas adequadas.

### 3.2.1 Técnicas para obtenção de sistemas nanoparticulados inaláveis

As técnicas de produção mais conhecidas para a obtenção de nanopartículas inaláveis na forma de pó inaláveis são, *spray drying*, *spray freeze drying*, *nanospray drying*, CO<sub>2</sub> fluido supercrítico, liofilização, ou uma combinação de técnicas, como a homogeneização seguida de *spray drying* (ABDELAZIZ et al., 2018).

A técnica de *spray drying* é conhecida por ser simples, uma vez que promove a secagem de dispersões de nanopartículas através da sua atomização, onde gotas de tamanhos uniformes, em contato com elevadas temperaturas promovem a secagem quase que instantânea da dispersão, e ao final do processo se obtém um pó com tamanho micrométrico, muitas vezes fazendo uso de um adjuvante no processo de secagem (TOMODA et al., 2008; MANSOUR; RHEE; WU, 2009; YU et al., 2016; ABDELAZIZ et al., 2018).

O *spray freeze drying* consiste na combinação das técnicas de *spray-drying* e *freeze drying*, onde uma dispersão de nanopartículas é seca, quando ocorre a atomização desta solução em uma torre de aço inoxidável que recebe um jato de nitrogênio líquido que imediatamente congela, a sublimação do gelo ocorre em *freeze drying* a baixa temperatura e pressão. Esta técnica permite a obtenção de partículas porosas, de baixa densidade, amplo diâmetro geométrico e pequeno diâmetro aerodinâmico (MANSOUR; RHEE; WU, 2009; YU et al., 2016; ABDELAZIZ et al., 2018).

A técnica de secagem com fluido supercrítico faz uso de um fluido supercrítico, neste caso o CO<sub>2</sub>, que pode ser utilizado tanto como solvente ou anti-solvente no preparo de nanoestruturas. Ele pode ser utilizado diretamente no preparo ou indiretamente pela mistura com o carreador apropriado (MANSOUR; RHEE; WU, 2009; ABDELAZIZ et al., 2018; TAVARES et al., 2017).

A técnica de *nanospray drying* faz uso da atomização vibracional pelo processo piezoelétrico gerador da vibração da malha do spray, um jato laminar de ar seco é usado para transformar as gotículas em pó que serão coletadas em coletor eletrostático. Esta técnica permite a secagem de pequenos volumes de soluções ou suspensões para a obtenção de partículas micrométricas ou submicrométricas, com um alto rendimento do processo (FONTANA et al., 2014; DIMER et al., 2015).

De acordo com Abdelaziz e colaboradores (2018), as vantagens na utilização destas técnicas de produção são a possibilidade de obtenção de um sistema

combinado de nano- e micropartículas, que devido ao tamanho micrométrico (1 a 5 µm) permitem uma deposição pulmonar das partículas mais adequadas e quando estes aglomerados micrométricos se dispersam em nanopartículas, estas conseguem alcançar seu alvo de ação, seja para uma ação local ou sistêmica.

### 3.2.2 Dispositivos de inalação para sistemas de nanopartículas inaláveis

A administração de nanopartículas pela via pulmonar faz uso de três tipos de dispositivos, o inalador de dose-medida pressurizado (*Metered dose inhalers* - MDI), o inalador de pó seco (*Dry Powder Inhalers* - DPI) e a nebulização.

A nebulização é umas das técnicas mais utilizadas e consiste na aerolização ou nebulização de nano- ou nano-micropartículas em suspensão, com o objetivo de fazer com que estas partículas alcancem as vias mais profundas do pulmão (BECK-BROICHSITTER; MERKEL; KISSEL, 2012). No entanto, é menos eficiente em relação às demais estratégias (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015) uma vez que o processo de administração pode ser demorado, formulações líquidas são menos estáveis em relação a formulações em seu estado sólido, requer compressor e tem um custo mais elevado (DURET et al., 2012).

O inalador de dose-medida pressurizado (MDI), como o próprio nome já sugere, faz uso de propelentes para a aerolização das nanopartículas, o que gera um custo mais elevado e tem sua segurança questionada pela utilização de gases propelentes (AGHDAM et al., 2016).

Os *Dry Powder Inhalers* (DPI) têm sido objeto de intensos estudos nos últimos anos, por se tratar de dispositivos para a administração de pós (nanopartículas secas por diferentes estratégias), fáceis e rápidos de administrar, não têm custo elevado, têm uma manutenção baixa e não requer qualquer tipo de propelente ou compressor para a entrega da dosagem até o pulmão, uma vez que o fluxo de ar inspirado realiza esta ação (DURET et al., 2012; AGDHAM et al., 2016; TAVARES et al., 2017). O uso de *dry powders inhalers* permite alcançar altos níveis de fármaco no fluido epitelial pulmonar das vias aéreas e pouco no trato respiratório (PARIKH & DALWADI, 2014).

### 3.2.3 Nanopartículas inaláveis: aplicabilidade e toxicidade

O estudo de secagem de suspensões de nanocápsulas poliméricas iniciou no final da década de 1990 e início dos anos 2000, com Guterres e colaboradores (1999; 2000), Müller e colaboradores (2000) e Pohlmann e colaboradores (2002), empregando a técnica de secagem por aspersão para a desidratação de suspensões aquosas de nanocápsulas. O adjuvante de escolha foi o dióxido de silício coloidal proposto para administração pela via oral. A caracterização físico-química dos pós evidenciou que as nanocápsulas poliméricas são resistentes ao processo de desidratação, sendo detectadas intactas nos pós, como demonstrado por avaliações empregando microscopia eletrônica de varredura (MÜLLER et al., 2000).

Este mesmo estudo foi aprimorado por Guterres e colaboradores (2013), utilizando a secagem por aspersão direta de nanocápsulas de núcleo lipídico, resultando na denominação da técnica de secagem por aspersão em etapa única, conhecida como *One Pot*. Através da caracterização físico-química dos aglomerados obtidos, os autores provaram que era possível realizar a secagem por aspersão sem a realização da etapa prévia de eliminação de solvente por rota-evaporação. Foram realizadas análises de tamanho e microscopia eletrônica por varredura que demonstraram que as partículas estavam íntegras quando na forma de pó.

Ortiz e colaboradores (2015) propuseram o desenvolvimento de micropartículas de quitosana contendo dapsona secas por *spray-drying* para o tratamento de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* através da via pulmonar. Os autores demonstraram que as partículas desenvolvidas apresentaram diâmetro aerodinâmico de 4,5  $\mu\text{m}$  e massa aerodinâmica média de 4,7  $\mu\text{m}$ , fração de partículas finas (FPF) de 50%, características estas necessárias para o sucesso de um futuro sistema de entrega de fármacos. Os autores realizaram também uma avaliação toxicológica *in vivo* (administração intratraqueal por insuflamento em traqueia exposta de ratos Wistar machos), onde as microcápsulas apresentaram baixa toxicidade, considerando os resultados das avaliações dos parâmetros bioquímicos (atividade da lactato desidrogenase; fosfatase alcalina; proteínas totais) e a microscopia tecidual.

O estudo desenvolvido por Sham e colaboradores (2004) demonstra a busca pelo desenvolvimento de um sistema de nanopartículas inaláveis para uso em *dry*

*powders inhalers*. Eles realizaram a secagem de dois tipos de nanopartículas diferentes para liberação pulmonar, uma a base de gelatina e outra de polibutilcianoacrilato, utilizando como técnica de obtenção o *spray-drying* e adjuvante de secagem a lactose. Os autores demonstraram que ambas as formulações permitiram o desenvolvimento de nanopartículas em sistemas inaláveis, sendo que as partículas desenvolvidas foram capazes de se depositar adequadamente no pulmão, além de possibilitar uma liberação imediata das nanopartículas quando submetidas a dissolução.

Por sua vez, Tomoda e colaboradores (2008) investigaram o efeito da temperatura de entrada durante a secagem por *spray-drying* sob a influência nas propriedades das nanopartículas inaláveis. Os autores prepararam previamente nanopartículas de PLGA e posteriormente as submeteram ao processo de secagem utilizando como adjuvante de secagem trealose e lactose. As partículas submetidas à secagem a uma temperatura de até 90°C apresentaram um diâmetro em torno de 2,5 µm, e quando submetidas à dispersão em água a recuperação das nanopartículas ocorria facilmente. No entanto, em temperatura acima de 100°C não ocorria a recuperação de nanopartículas em água, sem influenciar significativamente no tamanho da partícula. Porém, quando avaliaram a deposição em impactador em Cascata de Andersen, observaram que as partículas com trealose apresentaram FPF elevado quando preparadas em temperatura de 80°C, o mesmo só ocorreu para as partículas à base de lactose quando submetidas a uma temperatura de preparo de 90°C. Desta forma, foi evidenciado que a temperatura é capaz de influenciar nas propriedades aerodinâmicas das partículas inaláveis.

Tomoda e colaboradores (2008) ressaltam que em temperaturas menores que 70°C as partículas não apresentaram tamanho e propriedades aerodinâmicas adequadas. Porém, partículas produzidas acima de 100°C não permitem a recuperação das nanopartículas em água. Por sua vez, as partículas produzidas à base de trealose a 80°C apresentaram melhores propriedades para um futuro sistema de inalação.

Uma estratégia diferenciada foi utilizada por Osman e colaboradores (2013), que propuseram o preparo de *dry powders inhalers* com modificação da superfície utilizando a secagem simultânea do fármaco com polietilenoglicol (PEG) ou dipalmitofosfatidilcolina (DPPC) para redução da fagocitose e supressão da cristalização do fármaco, ciprofloxacino. Os autores trabalharam com dois tipos de

modificações, sendo a primeira no tipo do polímero e a segunda no tipo de ácido utilizado. Em ambas as modificações, concluíram que as partículas modificadas se mostraram seguras para células do epitélio pulmonar, além de apresentarem propriedades adequadas para a aerolização.

Parikh & Dalwadi (2014) investigaram a deposição pulmonar de micropartículas inaláveis de isoniazida, preparadas com e sem poli( $\epsilon$ -caprolactona), bem como a liberação em meio pulmonar simulado. Ambas as partículas apresentaram formato esférico e tamanho na faixa de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , sendo capazes de serem empregadas para via pulmonar. O teste de liberação comprovou que partículas preparadas com poli( $\epsilon$ -caprolactona) apresentaram melhor controle de liberação do fármaco.

Price e colaboradores (2017) realizaram a secagem de nanopartículas de óxido de ferro contendo doxorubicina em matriz de lactose para direcionamento magnético e avaliação da liberação pulmonar *in vivo*. O teste *in vivo* foi realizado em ratos, que receberam a dose do quimioterápico por administração diretamente na traqueia do animal na presença de um campo magnético externo. Após administração os ratos foram imediatamente sacrificados e a fluorescência e os íons de ferro foram quantificados nos tecidos afetados. Os autores concluíram que ocorreu a manutenção da citotoxicidade da doxorubicina após administração das nano-micropartículas magnéticas, além da possibilidade de alcançar regiões como o pulmão quando comparada com a solução de fármaco livre.

Dentre todos os estudos avaliados até o momento, poucos autores têm apresentado resultados sobre o comportamento toxicológico das nanopartículas inaláveis secas para uso em *dry powders inhalers*.

O estudo de Rawal e colaboradores (2017) desenvolveu uma nanopartícula seca inalável contendo rifampicina para o tratamento de tuberculose alveolar. Neste estudo eles buscaram alcançar uma administração local, sustentada, além da redução da dose e frequência de administração. Após administração de dose única da formulação-teste e formulação do mercado, os autores observaram que a nanopartícula desenvolvida não causou toxicidade aos tecidos dos animais. No entanto, a formulação comercial apresentou toxicidade grave conforme dados demonstrados na histologia, pela infiltração pleribronquial de células inflamatórias e hiperplasia do tecido linfoide. Os autores ainda sugerem que novos estudos sejam realizados, porém com doses repetidas para resultados de longa exposição.

Como foi possível verificar na literatura científica, poucos são os estudos com DPIs que fazem algum tipo de avaliação toxicológica apenas do sistema nanoparticulado desenvolvido.

No entanto, quanto aos estudos toxicológicos de suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas, vários são os estudos descritos na literatura. Para as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico, a sua toxicidade já foi avaliada tanto pela via parenteral quanto pela via oral, utilizando como modelo animal ratos Wistar macho adulto, sendo que a formulação não apresentou qualquer tipo de efeito citotóxico para administrações agudas ou crônicas (BULCHÃO, 2013; 2014; 2015).

### 3.3 ADJUVANTES DE SECAGEM: LACTOSE, LEUCINA, MANITOL E AEROSIL

A lactose é um açúcar reduzido, cuja fórmula química é  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (massa molecular 342.30) para sua forma anidra, e  $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$  (massa molecular 360.31) para sua forma monoidratada. Além destes dois tipos de lactose já citados, existe ainda a lactose para inalação que difere das demais por suas particularidades de obtenção. Ela pode ser utilizada como um excipiente para compressão direta, carreador, diluente, facilitador de fluxo para *dry powders inhalers* e liofilização. Seu uso é seguro, podendo ser utilizada tanto pela via oral quanto pulmonar, além de injeções intravenosas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A leucina, também conhecida por L-Leucina, possui massa molecular de 131.7, fórmula química  $C_6H_{13}NO_2$  e é solúvel em água. Ela tem sido empregada como agente flavorizante, lubrificante, antiaderente, bem como para melhorar a desaglomeração de micropartículas e compondo preparações inalatórias. Seus estudos demonstram ser um excipiente seguro, porém possui toxicidade moderada quando utilizado pela via subcutânea (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O manitol é um álcool hexahídrico, de massa molecular 182.17, fórmula química  $C_6H_{14}O_6$  e solúvel em água. É comumente utilizado como diluente, agente terapêutico, edulcorante, plastificante, carreador em *dry powders inhalers* e formulações de liberação sustentada. As vias de administração empregadas são a parenteral, pulmonar e oral, esta última com cautela por ter sua absorção prejudicada no trato gastrointestinal (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O aerossil, também chamado de dióxido de silício coloidal, tem massa molecular de 60.08, fórmula química  $\text{SiO}_2$  e não é solúvel em água. Muito utilizado nas áreas farmacêutica, cosmética e alimentícia. É considerado um adsorvente, agente antiaglomerante, estabilizador de emulsões, desintegrante de comprimidos, estabilizador térmico, promotor de secagem de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

### 3.4 MELATONINA

A melatonina ou N-acetil-5-metoxitriptamina é um hormônio sintetizado principalmente na glândula pineal a partir da 5-triptamina durante a noite. Ela está relacionada com a regulação do humor, menos usual a função imune, e principalmente ao ritmo circadiano (RANG et al., 2007; HOFFMEISTER et al., 2012).

Tem sido utilizada para auxiliar no *jet lag* e tratamento de insônia (RANG et al., 2007; HOFFMEISTER et al., 2012), além de ser antioxidante, apresentar efeitos protetivos a lipoperoxidação e estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas (HOFFMEISTER et al., 2012; CHARÃO et al., 2015).

Seu uso na forma livre não tem se mostrado interessante por ter uma biodisponibilidade reduzida, com tempo de meia vida curto, por sofrer metabolismo de primeira passagem, além de ser pouco solúvel em água e possuir características de dissolução lenta (HOFFMEISTER et al., 2012; CHARÃO et al., 2015).

No presente trabalho, o seu uso como fármaco modelo se deu por sua disponibilidade, bem como sua importância frente a diferentes estudos já realizados sobre a encapsulação da melatonina em sistemas nanoparticulados desenvolvidos por Schaffazick e colaboradores (2005 e 2007), Hoffmeister e colaboradores (2012), Charão e colaboradores (2015), entre outros trabalhos não citados.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**



## 4.1 MATERIAIS E REAGENTES

### 4.1.1 Preparo e caracterização das nanocápsulas e seus aglomerados

Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) PM 80000 (Sigma<sup>®</sup>, Lote: MKBP7389); monoestearato de sorbitano (Span 60<sup>®</sup>) (Sigma<sup>®</sup>, Lote: 038K0816); polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) (Dinâmica<sup>®</sup>, Lote: 55055); triglicérido capríco/caprílico (CCT) (Delaware<sup>®</sup>, Lote: 1M03860); melatonina (Sigma<sup>®</sup>, Lote: SLBK0706V); vermelho de Nilo (Sigma<sup>®</sup>, Lote: BCBP8959V); acetona (Neon<sup>®</sup>, Lote: 36202); etanol (Neon<sup>®</sup>, Lote: 34665); acetonitrila grau HPLC (Merck<sup>®</sup>, Lote: JA050730); água ultrapura; e os seguintes adjuvantes de secagem: lactose (DFE Pharma, Lote: 585791); manitol (Sigma<sup>®</sup>, Lote: SLBH4398V); dióxido de sílicio coloidal (Aerosil<sup>®</sup>) (Farma-Degussa, Lote: 3754012922); e leucina (Sinochem NL, Lote: 20090516 #7).

### 4.1.2 Análises toxicológicas

Cepas de *Caenorhabditis elegans* foram obtidas (Centro de Genética Caenorhabditis, Universidade de Minnesota - EUA). Bacto-agar e bacto-peptona, Becton Dickinson BD<sup>®</sup> (New Jersey, USA) e HiMedia Laboratories<sup>®</sup> (Mumbai, India), respectivamente.

**A partir desta página (48) até a página 79, os dados foram suprimidos, pois ainda não foram publicados.**

































































## **6 CONCLUSÕES**



As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico, com ou sem melatonina, apresentaram tamanho nanométrico na faixa de 190 a 200 nm, de acordo com medidas realizadas tanto pela técnica de difração a laser quanto quando avaliadas por espalhamento de luz dinâmico; ambas apresentaram ausência de população micrométrica.

O processo de secagem por aspersão pelo método *One pot* utilizando diferentes adjuvantes de secagem, lactose, leucina, manitol e aerosil, permitiu a obtenção de aglomerados de nanocápsulas secas de forma homogênea, porém cada adjuvante resultou em partículas com características diferentes.

As LNC-Lac 1 %, LNC-Leu 1 % e LNC-Aer 1 % apresentaram tamanho geométrico adequados para *dry powders inhalers* na faixa de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , exceto a LNC-Man 1 % que não alcançou características de tamanho adequada, pois ultrapassou a faixa recomendada.

Quando avaliadas em relação à recuperação das nanopartículas quando submetidas a desaglomeração por via úmida, apenas a LNC-Leu 1 % apresentou resultados satisfatórios.

As propriedades de fluxo de todos os aglomerados secos de nanocápsulas apresentaram condições de fluxo pobres, mesmo após a adição de um promotor de fluxo, o estearato de magnésio, possivelmente pelo tamanho micrométrico das partículas.

O teste de performance *in vitro* apresentou resultado satisfatório para FPF, acima de 50 %, demonstrando que a LNC-Leu 1% é um promissor *dry powders inhaler*, uma vez que permite a recuperação rápida das nanocápsulas e por ser uma partícula esférica, rugosa e irregular que confere características adequadas ao processo de aerolização.

A avaliação toxicológica *in vivo* através do nematoide *C. elegans* permitiu a adaptação do protocolo já utilizado com a finalidade de permitir a avaliação de nanomateriais na sua forma de pó, mantendo a integridade da amostra. Além disso, forneceu resultados preliminares de toxicidade das nanocápsulas de núcleo lipídico secas com leucina (LNC-Leu 1 %), onde as mesmas foram internalizadas e distribuídas para os diferentes tecidos do verme, sem causar alteração no seu desenvolvimento (área corporal) e resultado positivo de sobrevivência em concordância com outros autores.



## REFERÊNCIAS



ABDELAZIZ, H. M. et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. **Journal of Controlled Release**, v. 269, 374-392, 2018.

AGHDAM, M. H. et al. Aggregated Nanotransfersomal Dry Powder Inhalation of Itraconazole for Pulmonary Drug Delivery. **Adv Pharm Bull**, v. 6, n. 1, 57-64, 2016.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

AZARMI, S.; ROA, W. H.; LÖBENBERG, R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, 863-875, 2008.

BECK-BROICHSITTER, M.; MERKEL, O. M.; KISSEL, T. Controlled pulmonary drug and gene delivery using polymeric nano-carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 161, 214-224, 2012.

BIANCHIN, M. D. et al. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. **Journal of Drug Deliv. Scien. and Techn.**, v. 30, 180-189, 2015.

BULCÃO, R. P. et al. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules in Rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, 162-176, 2013.

BULCÃO, R. P. et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, 167-177, 2014.

BULCÃO, R. P. et al. Do poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules induce oxidative or inflammatory damage after in vivo subchronic treatment? **Toxicology Research**, v. 4, 994-1005, 2015.

CHARÃO, M. F. et al. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary line. **Mutation Research**, v. 784-785, 1-9, 2015.

CONTRI, R. V. et al. Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and in Vitro Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration. In: Beck, Ruy; Guterres, S.; Pohlmann, A. editors. *Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for Skin Care*. German: Springer; 2011. p. 3-35.

COPLEY, Scientific. **Quality solutions for inhaler testing**. 2015. Manual de Operação.

COURRIER, H. M.; BUTZZ, N. VANDAMME, T. F. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 19, 425-498, 2002.

D' ALMEIDA, A. P. L. et al.  $\alpha$ -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, 4479-4491, 2018.

D'ANGELO, I. et al. Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, 717–725, 2015.

DIMER, F. et al. Inhalable resveratrol microparticles produced by vibrational atomization spray drying for treating pulmonary arterial hypertension. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 29, 152-158, 2015.

DURET, C. et al. New inhalation-optimized itraconazole nanoparticle-based dry powders for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, 5475–5489, 2012.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, R1-R4, 1989.

FONTANA, M.C. et al. Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational *spray-drying*: one-step preparation and *in vitro* lung deposition. **Powder Technology**, v. 258, 49-59, 2014.

GARCIA, Fabrício de Melo. Nanomedicina e terapia de doenças pulmonares. Einstein: São Paulo, v. 12, n. 14, 533-533, 2014.

GUTERRES, S. S. et al. **Processo de secagem de suspensões coloidais de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas por aspensão**. Patente Brasileira INPI: PI9906081-7, 22 nov. 1999. 9 p.

GUTERRES, S. S. et al. Influence of benzylbenzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7, 195-199, 2000.

GUTERRES, S. S. et al. **Processo One pot de síntese de nanocápsulas poliméricas, suas formas secas, composições farmacêuticas de nanocápsulas poliméricas e seus usos**. Patente Brasileira INPI: BR 102013019136-1 A2, 26 jun. 2013. 23 p.

HOFFMEISTER, C. R. D. et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 251, 1-13, 2012.

JÄGER, E., et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical and Nanotechnology**, v. 5, 130-140, 2009.

LOIRA-PASTORIZA, C.; TODOROFF, J.; VANBEVER, R. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 75, 81-91, 2014.

MANSOUR, H. M.; RHEE, Y-S.; WU, X. Nanomedicine in pulmonary delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, 299-319, 2009.

MENON, J. U. et. al. Dual-drug containing core-shell nanoparticles for lung cancer therapy. *Nature: Scientific Reports*, v. 7, 2017.

MÜLLER, C. R. et al. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, 343-347, 2000.

MURALIDHARAN, P. et al. Microparticles/nanoparticles powders of a novel Nrf2 activator and an aerosol performance enhancer for pulmonary delivery targeting the lung Nrf2/Keap-1 pathway. **Mol. Sys. Des. Eng.**, v. 1, 48-68, 2016.

ORTIZ et al., submetido para publicação no *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

ORTIZ, M. et al. Development of Novel Chitosan Microcapsules for Pulmonary Delivery of Dapsone: Characterization, Aerosol Performance, and In Vivo Toxicity Evaluation. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 16, n. 5, 2015.

OSMAN, R. et. al. Spray dried inhalable ciprofloxacin powder with improve aerosolisation and antimicrobial activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 449, 44-58, 2013.

PARIKH, R.; DALWADI, S. Preparation and characterization of controlled release poly- $\epsilon$ -caprolactone microparticles of isoniazid for drug delivery through pulmonary route. **Powder Technology**, v. 264, 158-165, 2014.

PATRA, H. K. et al. MRI-visual order-disorder micellar nanostructures for smart cancer theranostics. **Adv. Healthcare Mater.**, v. 3, 526-535, 2014.

PHAM, D-D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, 517-529, 2015.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, 305-312, 2002.

PORSIO, B. et al. Nano into micro formulations of tobramycin for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **Biomacromolecules**, v. 18, 3924-3935, 2017.

PRICE, D. N. et al. *In vivo* pulmonary delivery and magnetic-targeting of dry powder nano-in-microparticles. **Mol. Pharmaceutics**, v. 14, 4741-4750, 2017.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 829 p.

RAWAL, T. et al. Rifampicin loaded chitosan nanoparticle dry powder presents an improved therapeutic approach for alveolar tuberculosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, 321-330, 2017.

RIGO, L. A. et al. Nanoencapsulation of a glucocorticoid improves barrier function and anti-inflammatory effect on monolayers of pulmonary epithelial cell lines. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, 1-10, 2017.

ROWE, R. C; SHESKEY, P. J; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6 ed. Washington DC: Pharmaceutical Press, 2009, 888 p.

SALZANO, G. et al. Cyclodextrin-based nanocarriers containing a synergic drug combination: a potential formulation for pulmonary administration of antitubercular drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, 577-587, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 3, 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. **Pharmazie**, v. 62, 354–360, 2007.

SHAM, J. O.-H. et al. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, 457–467, 2004.

SUNG, J. C.; PULLIAM, B. L.; EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 12, 563-570, 2007.

TAKEUCHI, I. et al. Effects of L-leucine on PLGA microparticles for pulmonary administration prepared using spray drying: fine particle fraction and phagocytotic ratio of alveolar macrophages. **Colloids and Surfaces A**, v. 537, 411-417, 2018.

TAVARES, M. et al. Development of PLGA dry powder microparticles by supercritical CO<sub>2</sub>-assisted *spray-drying* for potential vaccine delivery to the lungs. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.128, 235-243, 2017.

TOMODA, K. et al. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: Effects of the temperature at a spray-dryer in let up on the properties of particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, 138–144, 2008.

TORGE, A. et al. Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 527, 92-102, 2017.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1047p.

VAN DE GRAAFF, K. M. **Anatomia humana**. 6. ed. Barueri, Sp: Manole, 2003. 840 p. Tradução e revisão científica: Nader Wafae.

VENTURINI, C.G., et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 375, 200–208, 2011.

YANG, W.; PETERS, J. I.; WILLIAMS III, R. O. Inhaled nanoparticles — A current review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, 239-247, 2008.

YU, H. et al. Dry powder inhaler formulation of high-payload antibiotic nanoparticle complex intended for bronchiectasis therapy: spray drying versus spray freeze drying preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, 38-46, 2016.



# **ANEXO A - Covalidação de metodologia analítica para quantificação de melatonina**

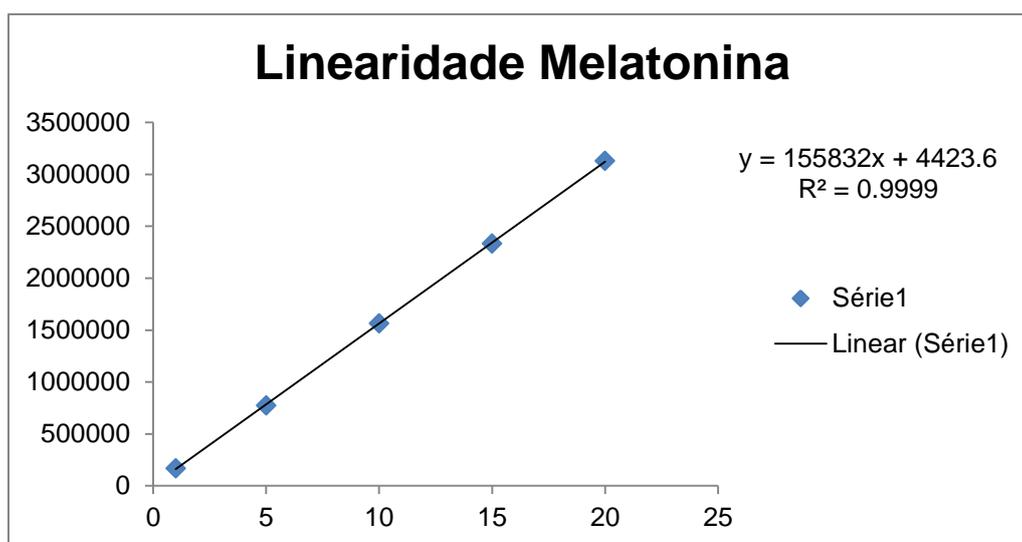


A Tabela 1, do anexo, representa os resultados obtidos nas 3 curvas independentes para as diluições realizadas a partir de solução mãe de melatonina a 500 µg/mL.

**Tabela 1** - Áreas das concentrações 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Concentrações (µg/mL)	Curva A	Curva B	Curva C	Média	DP	CV
1	164901	170931	172504	169445	4013	2,36
5	778639	767841	776698	774392	5756	0,74
10	1552010	1582684	1555772	1563488	16729	1,07
15	2351213	2306565	2341352	2333043	23454	1,00
20	3120352	3155032	3112093	3129159	22784	0,72

O gráfico de linearidade representado na Figura 1, do anexo, demonstra que o método desenvolvido e covalidado foi linear, com  $r^2$  de 0,9999.



**Figura 1** - Curva de linearidade para Melatonina, 1 a 20 µg/mL.

O limite de detecção calculado foi de 0,0253, enquanto que o limite de quantificação foi de 0,0843.

O método se mostrou preciso conforme dados demonstrados na Tabela 2, com coeficiente de variação menor que 5 % conforme observado.

**Tabela 2** - Teor da formulação LNC-Mel(0,5 mg/mL)-Leu 1% obtido a partir da extração do ponto médio (10 µg/mL) da curva de calibração.

<b>AMOSTRA</b>	<b>ÁREA</b>	<b>TEOR (%)</b>
1	1731590	110,75
2	1724836	110,31
3	1733587	110,87
4	1720469	110,04
5	1722043	110,14
6	1727224	110,47
7	1735422	110,99
8	1761917	112,69
9	1760736	112,61
10	1722987	110,20
11	1747473	111,76
12	1749907	111,92
<b>MÉDIA</b>	<b>1732589</b>	<b>110,81</b>
<b>DP</b>	<b>14887,48</b>	<b>0,95</b>
<b>CV (ou DPR)</b>	<b>0,859</b>	<b>0,85</b>

O método também apresentou exatidão, comprovada pelas Tabelas 3 e 4, que representa a área e porcentagem recuperado das diferentes extrações realizadas para o teste de exatidão.

**Tabela 3** - Exatidão do método demonstrada pela área do pico.

<b>Conc. µg/mL</b>	<b>Área SM1</b>	<b>Área SM2</b>	<b>Área SM3</b>	<b>µg/mL média</b>	<b>Área média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
<b>1,2</b>	201604	211191	201676	1,20	204823	5514	<b>2,69</b>
<b>9,8</b>	1568873	1553963	1538863	9,93	1553900	15005	<b>0,96</b>
<b>19,8</b>	3289800	3102605	3106678	20,23	3166361	106920	<b>3,37</b>

**Tabela 4** - Exatidão do método demonstrada pela porcentagem de melatonina recuperada.

<b>Conc. µg/mL</b>	<b>% Recup. SM1</b>	<b>% Recup. SM2</b>	<b>% Recup. SM3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
<b>1,2</b>	99,14	103,86	99,18	100,73	2,71	<b>2,69</b>
<b>9,8</b>	102,39	101,41	100,43	101,41	0,97	<b>0,96</b>
<b>19,8</b>	106,19	100,15	100,28	102,21	3,45	<b>3,37</b>