

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
FARMANGUINHOS

LUCAS TORRES MIRANDA SÁ

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS
PARTICULADOS BASEADOS EM POLIÉSTERES
OBTIDOS POR SPRAY DRYING PARA VIA INALATÓRIA**

RIO DE JANEIRO

2014

LUCAS TORRES MIRANDA SÁ

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS
PARTICULADOS BASEADOS EM POLIÉSTERES
OBTIDOS POR SPRAY DRYING PARA VIA INALATÓRIA**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas. Sob a orientação da Dra. Alessandra Lifitch Viçosa

Rio de Janeiro

2014

S111s

Sá, Lucas Torres Miranda

Sistemas de liberação de fármacos particulados baseados em poliésteres obtidos por spray drying para via inalatória. / Lucas Torres Miranda Sá – Rio de Janeiro, 2014.

X, 62f. : il. 30 cm.

Orientadora: Alessandra Lifschitz Viçosa, Prof^a Dr^a

Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, 2014.

Bibliografia: f. 65-72

1. Poliésteres alifáticos
2. Sistemas de liberação controlada
3. *Spray Drying*.
4. Pós-Secos.
5. Inalação. . I. Título.

CDD 174.28

LUCAS TORRES MIRANDA SÁ

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas. Sob a orientação da Dra. Alessandra Lifitch Viçosa

Orientadora: Profa. Alessandra Lifitch Viçosa
Doutora em Ciência e Tecnologia de Polímeros

BANCA EXAMINADORA

PhD, Alessandra Lifitch Viçosa, Farmanguinhos/FIOCRUZ

PhD, Fábio Dantas, Instituto Nacional de Tecnologia (INT)

Thiago Costa, Farmanguinhos/FIOCRUZ

RESUMO

Muitas doenças ainda não possuem um tratamento adequado, como a tuberculose e diversos tipos de o câncer. Os tratamentos complexos e demorados e os efeitos colaterais severos diminuem a adesão dos pacientes ao tratamento, levando a baixas taxas de cura, reincidência e/ou agravamento da doença. Com isso, novas abordagens para o diagnóstico e tratamento são necessárias. A inalação de pós-secos para ação local pulmonar de agentes bioativos (AB) e para absorção sistêmica é uma via promissora devido à fisiologia pulmonar ser única. Os sistemas de liberação controlada vêm atraindo o interesse da Indústria Farmacêutica, pois permitem a liberação de AB, como fármacos, proteínas e DNA, a uma taxa apropriada e/ou diretamente no seu sítio alvo de ação. Os sistemas baseados em poliésteres alifáticos, como o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) e a policaprolactona, são biocompatíveis e biodegradáveis, pré-requisitos para serem usados na área biomédica. Dentre os métodos de obtenção de pós secos com esferas de poliésteres carregados com agentes bioativos, o *spray drying* é muito utilizado, pois permite a produção de partículas de poliésteres carregados com agentes bioativos hidro e lipofílicos, termosensíveis ou não, de maneira reprodutível e em larga escala. Pode ser utilizado com a função primária de obtenção de agentes bioativos encapsulados em esferas poliméricas e finalístico, que permite a obtenção de nano-agregados, nanopartículas poliméricas carregadas com agentes bioativos agregados com auxílio de excipientes. A caracterização físico-química das partículas, as propriedades de fluxo e o comportamento aerodinâmico do pó-seco são determinados para que o pó-seco inalado atinja o local adequado e exerça a função desejada.

Palavras chave: Poliésteres alifáticos, Sistemas de Liberação Controlada, *Spray Drying*, Pós-Secos, Inalação.

ABSTRACT

Several pathologies, like tuberculosis, and cancer, don't have an adequate treatment yet. Long and complex treatments with severe toxic collateral effects decrease the patients' adhesion to the treatment, causing low rates of cure, relapse and/or the worsening of the disease. Therewith, new approaches to diagnosis and treatment are needed. Dry powder inhalation for local pulmonary action of bioactive agents and for systemic absorption is a promising route, because of its unique physiology. Drug delivery systems are attracting the interest of Pharmaceutical Industry, because it allows the delivery of bioactive agents, such as drugs, proteins and DNA, in an appropriate rate and/or directly in the site of action. The aliphatic polyesters systems, like poly(lactic acid-co-glycolic acid) and polycaprolactone, are biocompatible and biodegradable, pre requisites for being used in the biomedical field. Among dry powder production methods, spray drying is widely applied because allows production of thermosensitive hydro and lipophilic bioactive agents loaded polyester particles in a reproducible way and in industrial scale. Spray drying can be used in a primary function to production of polymeric particles loaded with bioactive agents and in a finalistic function, that permits nano-aggregates, bioactive agents loaded polymeric nanoparticles aggregated with excipients. Physical-chemical characterization of particle, flow properties and aerodynamic behavior of dry powders are determined in order to inhaled dry powder reach adequate place and performs the desired function.

Key words: Aliphatic polyesters, Controlled Drug Delivery Systems, Spray Drying, Dry powder, Inhalation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Via Pulmonar	11
1.2. Sistemas de Liberação	16
1.3. Polímeros.....	20
1.4. Poliésteres Alifáticos	21
1.4.1. Poli(ácido lático) (PLA), Poli(ácido glicólico) (PGA) e Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA).....	24
1.4.2. Policaprolactona (PCL)	25
1.5. <i>Spray Drying</i> (SD).....	26
1.6. Características físico-químicas ideias das partículas para a via inalatória.....	31
1.7. Caracterização físico-química das partículas, propriedades de fluxo e comportamento aerodinâmico dos pós-secos	34
2. OBJETIVO.....	39
2.1. Objetivo Geral.....	39
2.2. Objetivos específicos	39
3. JUSTIFICATIVA	40
4. METODOLOGIA.....	41
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	42
5.1. Patologias	42
5.2. Obtenção de nanopartículas pelos métodos de evaporação de solvente	46
5.3. Obtenção de pós-secos por <i>spray-drying</i>	50
5.3.1. Primária	54
5.3.2. Finalística	58
5.4. Comportamento das partículas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	60
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da divisão do sistema respiratório (http://nilson01.files.wordpress.com/2010/05/sistema-respiratorio.jpg).	11
Figura 2 – Possíveis destinos do pós inalado. Na via central, o AB pode interagir com o muco (1); remoção pelo sistema mucociliar (2); biotransformação ou complexação com algum componente epitelial (3); remoção pode por difusão antes de atingir alvo (4). Nos alvéolos, o AB pode sofrer diluição e difusão pelo surfactante pulmonar (1); captação pelos macrófagos (2); difusão pelo interstício e remoção pelo sistema linfático (3); biotransformação por enzimas das células endoteliais pulmonares (4) (HICKEY, 2003).	15
Figura 3 – Curva hipotética mostrando a concentração do fármaco em função do tempo em um sistema convencional (pontilhada); um sistema de liberação prolonga ou sustentada (cheia); e um sistema de liberação retardada ou adiada (vermelha).	17
Figura 4 - Diferentes sistemas de liberação de agentes bioativos já descritos (FARAJI, 2009).	19
Figura 5 – Mecanismos verdadeiros de liberação: (A) Difusão através de poros preenchidos com água; (B) Difusão através da matriz polimérica; (C) Erosão (FREDENBERG, 2011).	22
Figura 6 – Estrutura química dos principais poliésteres utilizados como carreadores de fármacos para sistemas de liberação controlada. Poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), o copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), a poli(caprolactona) (PCL).	23
Figura 7 – Esquema de spray dryer de ciclo aberto e os principais estágios envolvido no processo de secagem por <i>spray drying</i> (RÉ, 2006).	27
Figura 8 – Tipos de micropartículas obtidas por SD (RÉ, 2006).	28
Figura 9 – Equação para o cálculo do raio aerodinâmico (d_A) que é função da densidade geométrica (d_G) e da densidade efetiva da partícula (ρ_{eff}).	31
Figura 10 – Esquema de nano-agregado de nanopartículas de PLGA agregadas com auxílio do manitol que podem ser obtidos pela secagem por SD (OHASHI, 2009).	33

Figura 11 - Aparelho montado com os estágios equivalentes às diferentes partes do sistema respiratório (ANDRADE-LIMA, 2012).....	37
Figura 12 – Gráfico obtido no site scopus.com pela busca das seguintes palavras-chave: PLGA OR PCL (Title, abstract, keywords) AND inhalation (All fields).....	41
Figura 13 - Micrografia de MEV das nanopartículas modifocadas com DOTAP (JENSEN, 2012).....	48
Figura 14 - Micrografias de MEV das micropartículas de PLGA carregadas com insulina (Hamishehkar, 2010).....	49
Figura 15 - Esquema do spray dryer de 3 fluidos: suspensão do fármaco, ar e polímero de revestimento (SON, 2012).....	50
Figura 16 – Micrografias de MEV obtidas pelo spray dryer de 3 fluidos (SON, 2012) e de um <i>spray dryer</i> convencional (ONOSHITA, 2010).....	51
Figura 17 – Esquema do spray dryer de 4 fluidos (OZEKI, 2006).....	52
Figura 18 – Micrografias de MEV e esquema das micro e nano partículas RFP/PLGA, (RFP/PLGA)/MAN (OHASHI, 2009).....	52
Figura 19 - Esquema de spray dryer com atomização vibracional e coletor de partículas carregadas (BABA, 2013).	53
Figura 20 - Esquema do <i>spray freeze drying</i> (KHO, 2011).	54
Figura 21 – Micrografias de MEV das micropartículas de PLGA (SIVADAS, 2008).....	57
Figura 22 – Imagens fluorescentes in vivo do pulmão de ratos após administração com as microesferas ICG/PLGA e (ICG/PLGA)/MAN (OHASHI, 2009).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de polímeros usados na Indústria Farmacêutica e suas respectivas funções (ROWE, 2009).	20
Tabela 2 - Principais artigos publicados durante o período e os principais poliésteres utilizados na obtenção de partículas por <i>spray drying</i>	55
Tabela 3 - Principais artigos publicados durante o período e os principais poliésteres utilizados na obtenção de partículas por <i>spray drying</i>	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Via Pulmonar

A via inalatória é utilizada para o tratamento de doenças, principalmente as que acometem os pulmões, através da administração de agentes bioativos (AB) formulados diretamente nas vias aéreas por inalação.

O sistema respiratório é um sistema único no organismo e pode ser visto como uma serie de passagens que se originam na cavidade nasal e terminam nos sacos alveolares. É dividido em vias aéreas superiores, que contemplam a cavidade nasal, faringe e laringe e as vias aéreas inferiores, que começam na traqueia e terminam nos sacos alveolares (Figura 1).

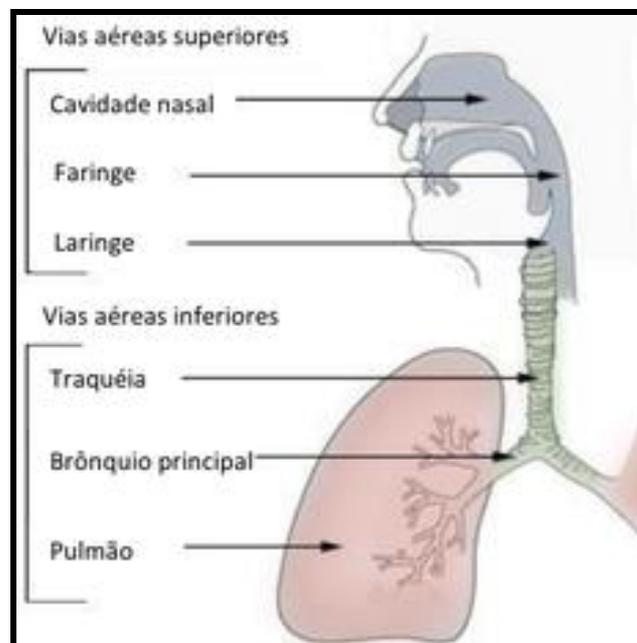


Figura 1 – Esquema da divisão do sistema respiratório (<http://nilson01.files.wordpress.com/2010/05/sistema-respiratorio.jpg>).

Os vários níveis das vias aéreas inferiores podem ser categorizados em zonas condutivas (da traqueia aos bronquíolos terminais), simplificada tendo a função apenas de condução do ambiente externo para a zona respiratória (dos bronquíolos respiratórios aos sacos alveolares), que realizam a troca gasosa. Na parede dos alvéolos, estão presentes os capilares pulmonares e para que as partículas sejam absorvidas, devem atravessar a barreira hemato-aérea, composta pelo epitélio alveolar, endotélio capilar e as membranas basais, distância de aproximadamente 500 nm. A grande área superficial proporciona uma grande área de absorção para a administração de aerossóis por inalação (HICKEY, 2003).

O epitélio que separa o lúmen da via aérea das estruturas subepiteliais reveste a superfície do lúmen das vias respiratórias e é constituído por uma camada de células conectadas por *tight junctions*, que limitam a penetração das partículas inaladas pela rota intercelular. Em algumas patologias, o epitélio está danificado e permite uma maior penetração das substâncias presentes no lúmen. Nas zonas condutivas, as células são ciliadas e cobertas por muco, que atuam impedindo a desidratação das células epiteliais, promovendo a saturação do ar com água, impedindo a colonização por microorganismos e protegendo contra xenobióticos ou substâncias químicas. O movimento coordenado (escalador mucociliar) dos cílios impulsiona o muco para as vias aéreas superiores e faringe, onde o muco é deglutido ou ejetado. Portanto, o muco é uma barreira que deve ser ultrapassada para a penetração efetiva de partículas. A hipersecreção do muco e deficiência ciliar (bronquite e fibrose cística) afetam a atividade terapêutica do fármaco inalado devido ao aumento da espessura da camada de muco, através da qual o fármaco deve ultrapassar para atingir o alvo de ação e exercer o efeito terapêutico (HICKEY, 2003).

Nos alvéolos, estão presentes as células de defesa, os macrófagos alveolares, que se localizam no interstício e no lúmen superficial do alvéolo. Os macrófagos fagocitam e degradam enzimaticamente, quando possível, substâncias estranhas, partículas e microorganismos presentes no alvéolo, e depois permanecem no alvéolo, migram para o escalador mucociliar, ou para o tecido linfático. Os fatores fisiológicos citados influenciam tanto a deposição do aerossol na via aérea, como a extensão da absorção (HICKEY, 2003).

Devido a essas características ímpares, os pulmões podem ser úteis para a inalação de aerossóis de dois modos:

- A grande área capilar alveolar dos pulmões (~1000 m²) permite uma absorção rápida e efeitos farmacológicos comparados à velocidade da injeção intravenosa. No caso dos pós e granulados, o tamanho das partículas determina a extensão da penetração nas regiões alveolares e a solubilidade, a extensão da absorção.
- A liberação de fármacos localmente permite o tratamento de diversas doenças que acometem os pulmões sem precisar de liberação sistêmica dos ABs.

A vantagem da via inalatória se deve à capacidade do pó contendo o AB inalado atuar diretamente no local de ação, mecanismo chamado de vetorização/direcionamento (*targeting*).

A terapia inalatória, especialmente para asma e bronquite, é realizada com sucesso há algum tempo. As vantagens da terapia inalatória para ação local no trato respiratório são:

- Ausência de efeitos colaterais sistêmicos com as concentrações adequadas do AB para a atividade terapêutica;
- Depuração lenta do sitio de ação comparando-se com a depuração sistêmica;
- Ativação do pró-fármaco no local de ação;
- Inativação do fármaco antes da liberação na circulação sistêmica.

Além da terapia local vetorizada, a grande área capilar alveolar dos pulmões com aproximadamente 100 m² também vem sendo explorada, já que permite uma absorção ampla e rápida e efeitos farmacológicos sistêmicos do AB evitando o metabolismo pelo efeito de primeira passagem. Essa abordagem vem cada vez mais sendo estudada, por exemplo, para o tratamento da dor com analgésicos quando uma ação rápida é necessária e também para a entrega de peptídeos e proteínas que possuem seu uso limitado devido à rápida degradação desses agentes pela via oral (HICKEY, 2003).

Os pós-secos são inalados como aerossóis para o pulmão a partir de três sistemas: inaladores dosimetrados (*metered dosage inhalers* - MDIs), inaladores de pós-secos (*dry powder inhalers* - DPIs) e nebulizadores. Esses sistemas de inalação são usados para o tratamento de asma, desordens brônquicas e infecções que requerem uma distribuição adequada do aerossol inalado nas vias respiratórias. A nebulização de suspensões particuladas é a mais usada para a via inalatória devido à formulação simples, porém apresenta as desvantagens de baixa eficiência, longo tempo de tratamento, baixa estabilidade e não serem portáteis. Os DPIs são portáteis, rapidamente administrados, maior eficiência de entrega do pó e maior estabilidade durante acondicionamento (KHO, 2010). A desvantagem é a necessidade de coordenação entre ativação/inspiração para uma dosagem adequada. Os MDIs possuem a vantagem de serem mais baratos e portáteis e uma boa deposição, sem a necessidade de coordenação entre ativação/inspiração. Nos MDIs, os pós-secos são embalados sob pressão com um gás propelente e ingredientes terapeuticamente ativos que são liberados após a ativação de um sistema apropriado de válvulas, na forma do chamado pó aerossol. Os pós-secos são administrados pela via inalatória através do sistema respiratório nasal e oral tanto para o efeito local quanto para o efeito sistêmico. A inalação é realizada com auxílio de um inalador, dispositivo por meio do qual um medicamento pode ser administrado por inspiração através do nariz ou da boca.

A passagem do AB do sistema inalatório até o seu sítio de ação, isto é, o comportamento dessas partículas *in vivo* é governado por diversos fatores, que podem ser divididos em: (i) físicos, que determinam a deposição do fármaco da boca até a superfície do lúmen; e (ii) farmacocinéticos, que influenciam na extensão da passagem do AB para a célula/tecido alvo ou grau de absorção. Os possíveis destinos do aerossol administrado são mostrados na figura 2.

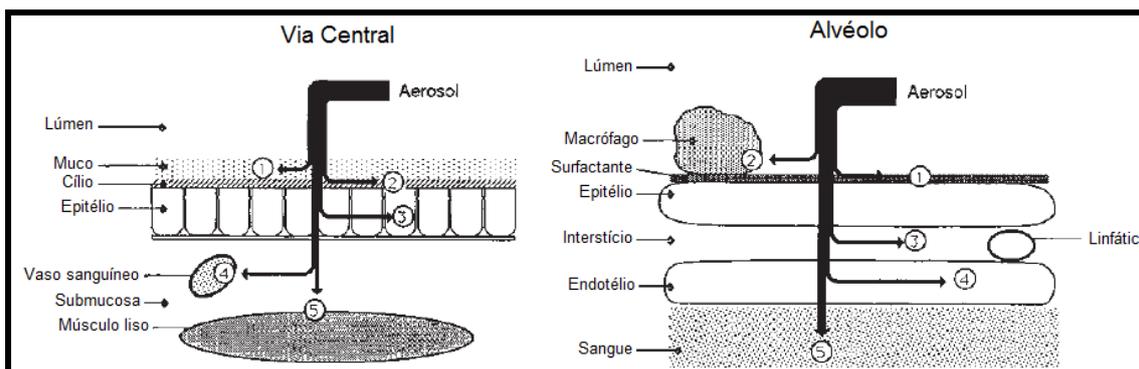


Figura 2 – Possíveis destinos do pó inalado. Na via central, o AB pode interagir com o muco (1); remoção pelo sistema mucociliar (2); biotransformação ou complexação com algum componente epitelial (3); remoção pode por difusão antes de atingir alvo (4). Nos alvéolos, o AB pode sofrer diluição e difusão pelo surfactante pulmonar (1); captação pelos macrófagos (2); difusão pelo interstício e remoção pelo sistema linfático (3); biotransformação por enzimas das células endoteliais pulmonares (4) (HICKEY, 2003).

De todo o pó administrado por inalação, apenas de 2-10% se deposita nos pulmões, enquanto que 90% se depositam nas vias aéreas superiores e boca, onde é deglutido. Portanto, a obtenção de pós-secos para inalação com as propriedades apropriadas devem gerar uma deposição adequada nas vias aéreas, captação/penetração pelo tecido/célula alvo (local de ação), penetração no epitélio pulmonar (quando ação sistêmica for desejada) e um perfil de liberação adequado.

Muitas vezes, os pós-secos submetidos à inalação contém além do AB, excipientes para melhorar suas propriedades físico-químicas, como manitol, lactose, leucina e diversos outros, que auxiliam nas propriedades de fluxo, deposição, uniformidade de dosagem, proteção do pó contra a humidade e liberação controlada do fármaco. Por isso, o pó-seco fabricado deve ser caracterizado para a determinação de suas propriedades físico-químicas e consequentemente prever como o inalado se comportará após a administração.

1.2. Sistemas de Liberação

O tratamento de diversas patologias é limitado devido à instabilidade dos ABs em determinado meio ou processo, aos efeitos colaterais tóxicos, aos problemas de solubilidade e permeabilidade, alta dosagem, ação não específica, pequena meia vida, à dificuldade de serem formulados corretamente, levando a tratamentos complexos e demorados. Essas limitações são um grande entrave enfrentado pela indústria farmacêutica, resultando em baixas taxas de cura e podendo ainda levar à reincidência e/ou agravamento da doença. Como exemplo, temos o tratamento longo e complexo da tuberculose, os efeitos colaterais tóxicos dos ABs utilizados para o tratamento de muitos tipos de câncer, a instabilidade de proteínas, DNA, RNA e peptídeos no trato gastrointestinal. Devido aos problemas envolvidos no tratamento dessas doenças, se faz necessário novas abordagens que permitam tratamentos mais eficientes (PARVEEN, 2011).

A liberação controlada de ABs é um campo de pesquisa intrigante que vem atraindo o interesse de pesquisadores há décadas. A liberação controlada de AB pode ser definida como o processo de liberação de um AB a uma taxa específica e/ou em um local específico. Além disso, o campo de liberação de ABs também atrai a atenção da Indústria Farmacêutica, pois oferece uma ferramenta estratégica para expandir o mercado, isto é, esses novos sistemas de liberação podem repaginar ABs clássicos, oferecendo uma vantagem competitiva mesmo após a expiração de patentes e evitando a competição com os genéricos. No cenário atual, porém, a liberação de ABs vetorizados a um local específico (*targeting*) e com uma taxa de liberação programada é uma limitação enfrentada pela Indústria Farmacêutica que deve ser superada para que seja possível explorar milhares de agentes terapêuticos que possuem uso limitado pela falta de um sistema de liberação efetivo e seguro.

A utilização de sistemas de liberação controlada¹ permite transportar ABs mais eficientemente que os do passado, aumentar a adesão do paciente ao

¹ O nome Sistema de Liberação de Fármacos é traduzido do inglês "*Drug Delivery System*" e será o nome utilizado para designar os sistemas de liberação. Durante o texto, o termo "sistema de liberação de

tratamento, estender o ciclo de vida do produto, diferenciar o produto e reduzir custos com a saúde (PARVEEN, 2011).

Dependendo da via de administração, a indicação terapêutica, a propriedade do AB e muitos outros aspectos, várias estratégias podem ser desenvolvidas para uma liberação bem sucedida. Como o principal aspecto de qualquer terapia é sua eficácia e segurança, primeiramente, a concentração do AB deve ser suficientemente alta no local de ação para haver o efeito terapêutico, mas ao mesmo tempo não tão alta a ponto de causar os efeitos colaterais tóxicos, isto é, a concentração do AB deve ser essencialmente constante dentro da janela terapêutica. Segundo o livro de Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos da Agência de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011), os tipos de liberação podem ser divididas em três modos (Figura 3):

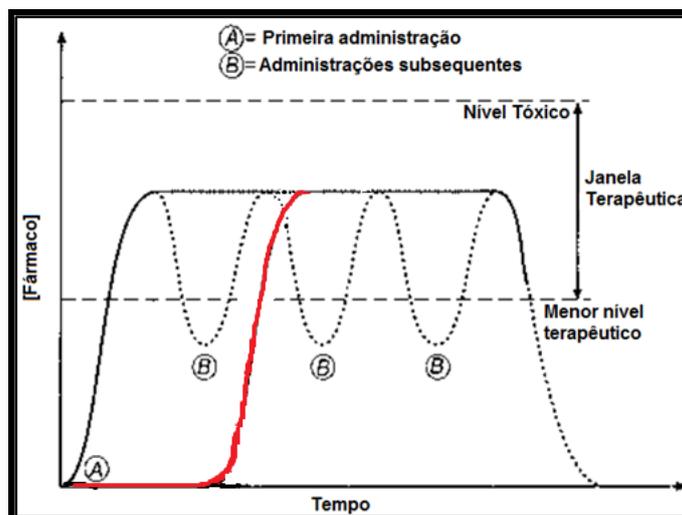


Figura 3 – Curva hipotética mostrando a concentração do fármaco em função do tempo em um sistema convencional (pontilhada); um sistema de liberação prolonga ou sustentada (cheia); e um sistema de liberação retardada ou adiada (vermelha).

- Liberação imediata: tipo de liberação de formas farmacêuticas que não são modificadas intencionalmente por um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação;

fármacos” será utilizado muitas vezes, mesmo quando forem para identificar sistemas de liberação de outros agentes bioativos, como proteínas, ácidos nucleicos ou peptídeos por exemplo.

- Liberação prolongada ou sustentada: tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que permite pelo menos uma redução na frequência de dose quando comparada com o medicamento apresentado na forma de liberação imediata. É obtida por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação.
- Liberação retardada ou adiada: tipo de liberação modificada de formas farmacêuticas que apresenta uma liberação retardada do princípio ativo. A liberação retardada é obtida por meio de um desenho de formulação especial e/ou método de fabricação. As preparações gastrorresistentes são consideradas formas de liberação retardada, pois são destinadas a resistir ao fluido gástrico e liberar o princípio ativo no fluido intestinal.

A liberação controlada de fármacos direcionada para um local de liberação é chamada de liberação vetorizada (*targeting*), isto é, quando o sistema é desenhado para que a liberação do fármaco seja realizada diretamente/exclusivamente em algum alvo, que pode ser uma célula, tecido ou região (ALLEN, 2011). A vantagem dessa abordagem é a capacidade de diminuir os efeitos tóxicos associados ao fármaco nos tecidos/células saudáveis pela liberação do AB apenas nos tecidos/células doentes. A vetorização buscando controle espacial do AB (liberação vetorizada / *targeting*) pode ser atingida com a combinação das propriedades físico-químicas (química de superfície e tamanho das partículas, por exemplo) aproveitando-se das características fisiológicas do alvo (direcionamento passivo) e a utilização de moléculas direcionadoras (ligantes) (direcionamento ativo), como carboidratos, ácido fólico e anticorpos ou sem (PHILLIPS, 2010).

Os sistemas de liberação podem melhorar o tratamento de patógenos intracelulares, caso da tuberculose, por exemplo, pois essas infecções estão localizadas nos macrófagos alveolares e a maioria dos antibióticos não atravessa as membranas celulares de maneira adequada, sendo difícil atingir concentrações altas no interior das células infectadas (CARRYN, 2003). Nas doenças pulmonares, como na asma, a vetorização do AB se dá pela inalação do aerossol que se deposita diretamente no seu local de ação não causando o efeito tóxico, quando o fármaco atinge a circulação sistêmica, e pode ser

melhorada com a liberação sustentada diminuindo o tempo entre as administrações. No caso do câncer, a vetorização também é de interesse para a liberação apenas nos tecidos tumorais e se aproveita muitas vezes dos impactos fisiológicos no local do tumor, como o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) ou pela super expressão de receptores na membrana celular, diminuindo os efeitos colaterais causados pelos fármacos antitumorais nos tecidos saudáveis (PARVEEN, 2011).

Uma ampla gama de materiais podem ser utilizados para encapsular ABs para utilização como sistemas de liberação controlada na forma de partículas²: os sistemas poliméricos, como esferas, cápsulas, dendrímeros e micelas; os sistemas lipídicos, como as partículas lipídicas sólidas e os lipossomas; os sistemas inorgânicos, como os nanotubos de carbono, sílicas e as partículas magnéticas; dentre outros (Figura 4).

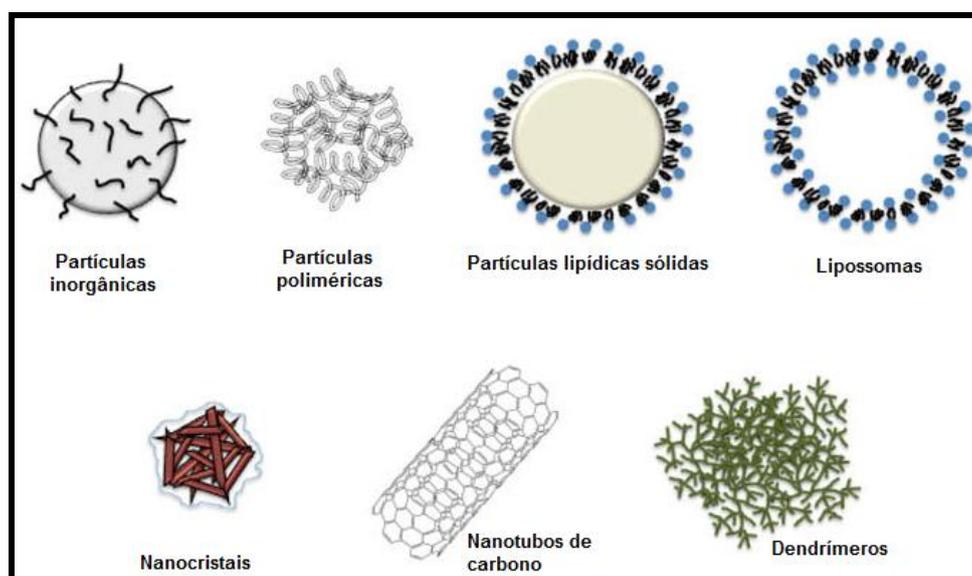


Figura 4 - Diferentes sistemas de liberação de agentes bioativos já descritos (FARAJI, 2009).

Atualmente, as nanopartículas, definidas como partículas coloidais com tamanhos que variam na faixa entre 10 e 1000 nm, vêm atraindo atenção oferecendo diversas vantagens na liberação de AB. Devido ao tamanho

² O termo partículas será utilizada durante todo o texto para as micro- e nanopartículas quando forem usadas genericamente. Quando forem usadas de modo específico, serão utilizados os prefixos micro e nano dependendo da faixa de tamanho que se enquadrarem.

submicrométrico, as nanopartículas podem passar em tecidos através de pequenos capilares e serem absorvidas mais eficientemente pelas células, acessando locais anteriormente inacessíveis.

1.3. Polímeros

Segundo definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), os polímeros são “moléculas de massa molar elevada, cuja estrutura compreende essencialmente a repetição múltipla de unidades derivadas, efetiva ou conceitualmente, de moléculas de baixa massa molar” (IUPAC, 2014), sendo que as múltiplas unidades formadoras são denominadas *meros* e as moléculas de massa molar baixa são denominadas *monômeros*.

As propriedades únicas dos polímeros se devem complexidade de sua estrutura, devido ao seu tamanho, estrutura química e interações intra- e intermoleculares. Os polímeros podem ser de origem natural e sintética com MM acima de 10^8 Da e entre 10^4 e 10^6 Da respectivamente (MANO, 1999).

Há décadas, são liberados pela *Food and drug Administration* (FDA³) como excipientes em formulações pela Indústria Farmacêutica. Podem ser utilizados em formas farmacêuticas sólidas (comprimidos e cápsulas), líquidas (xaropes) e semissólidas (geles e cremes), já que devido à grande variedade de estruturas químicas possíveis são bastante versáteis e podem desempenhar diversas funções. A tabela 1 apresenta alguns exemplos de polímeros usados na Indústria Farmacêutica e suas respectivas funções (ROWE, 2009):

Tabela 1 – Exemplos de polímeros usados na Indústria Farmacêutica e suas respectivas funções (ROWE, 2009).

Polímero	Função
Poliésteres alifáticos	<ul style="list-style-type: none"> Carreadores de AB em sistemas de liberação controlada

³ *Food and drug administration* é o órgão governamental americano responsável pelo controle dos alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e produtos derivados do sangue humano.

Polivinilpirrolidona	<ul style="list-style-type: none"> • Desintegrante • Agente de suspensão • Aglutinante
Alginatos	<ul style="list-style-type: none"> • Liberação modificada • Estabilizante • Desintegrante
Carbômeros (Acrilatos)	<ul style="list-style-type: none"> • Bioadesivos • Agente de liberação modificada • Agente emulsificante • Modificador de reologia
Celulose	<ul style="list-style-type: none"> • Adsorvente • Diluente • Desintegrante • Agente de suspensão
Quitosana	<ul style="list-style-type: none"> • Espessante • Formador de filme • Mucoadesivo • Agente de revestimento

Os poliésteres alifáticos se destacam devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, requisitos básicos para utilização de materiais na área biomédica.

1.4. Poliésteres Alifáticos

Recentemente, os polímeros biomédicos tem atraído atenção da Indústria Farmacêutica, especialmente os usados como sistemas de liberação controlada, como os poliésteres alifáticos.

O termo poliéster se refere aos poliésteres alifáticos, isto é, polímeros que possuem grupos éster na sua cadeia principal. Os poliésteres alifáticos são um grupo de homo- e copolímeros comercializados com MM de 2.000 Da a mais

de 10.000 Da, que satisfazem os principais pré-requisitos para serem utilizados na área biomédica: biocompatibilidade e biodegradabilidade, isto é, são hidrolisados em subprodutos removíveis e não tóxicos, que podem ser removidos pelas vias metabólicas.

São utilizados como sistemas de liberação de AB particulados, pois podem encapsular AB na matriz polimérica na forma de cápsulas ou esferas. O entendimento dos mecanismos de liberação e os processos físico-químicos que influenciam a taxa de liberação do fármaco são essenciais para o desenvolvimento desses sistemas de liberação controlada. O termo “mecanismo de liberação” pode ser definido como “modo como as moléculas do AB são transportadas ou liberadas” (SANSDRAP, 1997) e/ou como “descrição do processo ou evento que determina a taxa de liberação dele” (KRANZ, 2000). Os mecanismos que definem como o AB é liberado dos poliésteres são apresentados na figura 5.

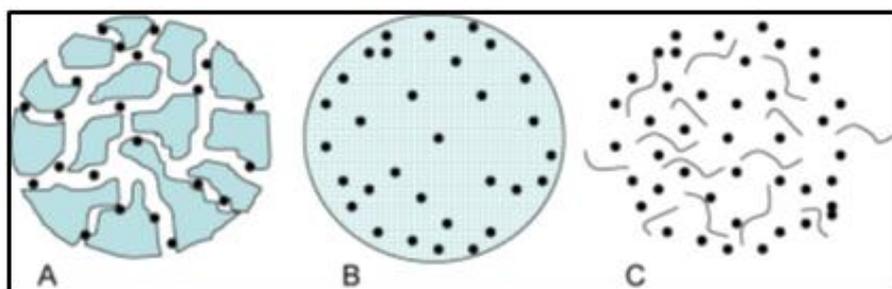


Figura 5 – Mecanismos verdadeiros de liberação: (A) Difusão através de poros preenchidos com água; (B) Difusão através da matriz polimérica; (C) Erosão (FREDENBERG, 2011).

O transporte do fármaco pela difusão através de poros preenchidos com água (A) ocorre principalmente com moléculas grandes e hidrofílicas e ocorre através da difusão das moléculas pela diferença do gradiente de concentração. O transporte do fármaco pela difusão através da matriz polimérica (B) ocorre com moléculas hidrofóbicas pequenas. O fármaco também pode ser liberado sem nenhum tipo de transporte, apenas pela dissolução do polímero, também chamada de erosão (C). Na prática, a liberação é regulada pela combinação desses mecanismos, porém a degradação é tida como a mais importante.

Assim, o controle da taxa de degradação da matriz, permite controlar a velocidade de liberação do AB, isto é, quanto mais rápida a taxa de degradação, mais rápida será a taxa de liberação do AB e vice-versa.

A taxa de degradação (hidrólise) da matriz polimérica é influenciada por diversos fatores: composição química (hidro/lipofilicidade), MM média, grau de cristalinidade (X_c) e temperatura de transição de vítrea (T_g) do polímero; interação entre o AB e a matriz polimérica; morfologia e tamanho das partículas e as condições de fabricação.

Além de controlar a liberação do AB, o encapsulamento dos AB também permitem melhorar a solubilidade e absorção, minimizar a degradação, controlar a captação/internalização (*uptake*) por células e tecidos e direcionar/vetorizar o AB a um local específico (*targeting*).

Na figura 5 são apresentados os poliésteres alifáticos liberados para a utilização na Indústria Farmacêutica: os polímeros o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e a poli(caprolactona) (PCL) e o copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).

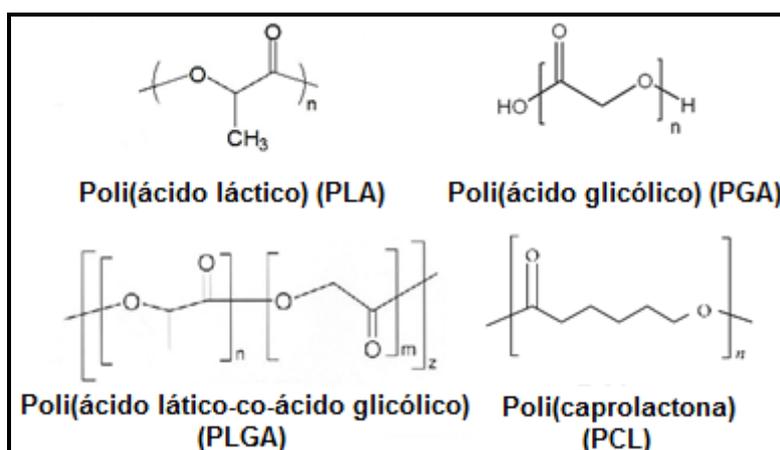


Figura 6 – Estrutura química dos principais poliésteres utilizados como carreadores de fármacos para sistemas de liberação controlada. Poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), o copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), a poli(caprolactona) (PCL).

1.4.1. Poli(ácido lático) (PLA), Poli(ácido glicólico) (PGA) e Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA)

Os polímeros poli(ácido lático) (PLA) e o poli(ácido glicólico) (PGA) e o copolímero poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) são aprovados pelo FDA como polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Dentre os biomateriais, são os mais populares e utilizados para obtenção de carreadores particulados na liberação controlada de AB. São formados pelos monômeros naturais, ácido glicólico e ácido lático, como no caso do PLA e PGA, e em diferentes razões ácido lático/ácido glicólico como no caso do PLGA.

Esses polímeros degradam por hidrólise (biodegradação) e produzem ácido glicólico e lático que são absorvidos pelo corpo humano. Por isso não levam a formação de intermediários tóxicos e são biocompatíveis (MAKADIA, 2011).

Devido ao fato do PLA de elevada massa molar média ser degradado muito lentamente pelo organismo humano e o PGA ser degradado muito rapidamente, o uso do copolímero PLGA tem sido uma boa alternativa em muitas aplicações biomédicas (PEREIRA, 2012). Portanto, assim que as propriedades dos sistemas homopoliméricos (PLA e PGA) foram definidas, sistemas copoliméricos (PLGA) também passaram a ser utilizados combinando funções e gerando sistemas cada vez mais efetivos.

A degradação da matriz do copolímero PLGA influencia diretamente na cinética de liberação do AB. Portanto, o perfil de liberação do fármaco da matriz polimérica pode ser modulado pela escolha e/ou modificação dos polímeros com o comportamento de degradação adequado. Os fatores que podem ser controlados para modular a degradação são:

- Composição do copolímero: O grupo glicólico degrada mais rapidamente que a molécula de ácido lático, portanto, a taxa de degradação de copolímeros PLGA pode ser ajustada, modificando-se a composição ácido lático/ácido glicólico do PLGA;

- Massa molar (MM): A taxa de degradação aumenta com a redução de MM. A presença de espécies de baixa MM leva a taxa de degradação mais rápida, devido à presença de mais grupos ácidos carboxílicos, catalizadores da degradação.
- Cristalinidade do polímero (X_c): A parte amorfa de uma matriz polimérica degrada mais cedo do que seus homólogos cristalinos, pois a penetração da água em estruturas cristalinas é mais prejudicada.
- pH do meio: Como a degradação da cadeia ocorre através de hidrólise de ligações ésteres, tanto o meio alcalino quanto os meios fortemente ácidos aceleraram a taxa de degradação.
- Tamanho da matriz: Amostras mais volumosas ou grossas são mais susceptíveis à degradação auto catalítica porque os produtos de degradação saem mais lentamente da rede. Outros fatores, como a natureza, a carga inicial, teor do fármaco incorporado, os aditivos, a esterilização, o fluxo de fluido, radiação gama e porosidade também tem demonstrado influência na cinética de degradação (PEREIRA, 2012).

1.4.2. Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona é um polímero semicristalino com temperatura de transição vítrea (T_g) de $-60\text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura de fusão cristalina (T_m) variando de 59 a $64\text{ }^\circ\text{C}$ dependendo da natureza cristalina da PCL. Sua massa molar média pode variar entre 10.000 e 42.500 , é solúvel em clorofórmio, tolueno e insolúvel em etanol e éter.

As vantagens da PCL como sistema de liberação de fármacos é devido a: biocompatibilidade e biodegradabilidade; alta cristalinidade e permeabilidade a diversas moléculas pequenas; integridade do polímero durante a produção das partículas (KHO, 2010); não gerar ambiente ácido durante a degradação, compatibilidade com excipientes e degradação mais lenta que o PLA e o PLGA (KOLESKA, 1978 e SINHA, 2004).

1.5. *Spray Drying* (SD)

Na Indústria Farmacêutica, muitas formas de dosagem sólidas baseiam-se na utilização de pós-secos. Os pós-secos são formas farmacêuticas sólidas constituídos por um ou mais princípios ativos secos com ou sem excipientes. Os pós-secos são inalados como aerossóis para o pulmão, distribuídos para o nariz, usados como enchimento em cápsulas, prensados em comprimidos para aplicações orais e usados em soluções/suspensões para via parenteral.

No passado, as funções primárias dos processos de secagem na Indústria Farmacêutica eram atingir um pó-seco com tamanho de partícula adequado e remover a maioria do solvente. Atualmente, essa perspectiva mudou e os pós-secos se baseiam em partículas obtidas não vistas apenas como um carreador passivo, mas preferencialmente como parte de um Sistema de Liberação e por isso devem ser capazes de garantir um perfil de liberação do AB bem definido e controlado e possuir propriedades de fluxo adequadas.

Atualmente, com a complexidade no tratamento de algumas patologias, os pós-secos são produzidos de modo que os ABs sejam encapsulados em partículas poliméricas. As partículas poliméricas carregadas com o AB devem ser produzidas com características homogêneas para permitir maior precisão e reprodutibilidade dose a dose e menor risco de vazamento de dose da matriz polimérica. Para isso, o *spray drying* é utilizado para a obtenção de partículas poliméricas carregadas com AB na forma de pó-seco.

O *spray drying* (SD) é um método de secagem para obtenção de pós-secos utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de polímeros e química. Essa técnica permite obterem-se pós-secos a partir de uma fase líquida. No caso do encapsulamento de AB em esferas ou cápsulas, o pó-seco pode ser obtido a partir de uma solução, suspensão ou emulsão. É também aplicado como método de preservação, aumentando a estabilidade durante o armazenamento devido à eliminação da água (GUTERRES, 2009). O SD é uma técnica reprodutível, rápida e conveniente, com condições moderadas de

processamento, podendo ser prontamente aumentado de escala (*scale up*) e produzindo partículas estáveis e sem necessidade de liofilização.

O sistema de secagem por SD é mostrado na figura 7. O equipamento *spray dryer* converte um líquido alimentador em partículas sólidas. É um processo contínuo dividido em quatro estágios: atomização, mistura das gotículas com o gás secante, evaporação e separação do produto (RÉ, 2006).

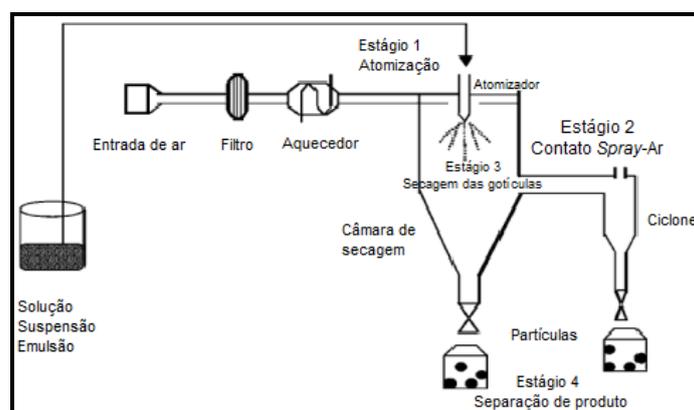


Figura 7 – Esquema de spray dryer de ciclo aberto e os principais estágios envolvidos no processo de secagem por *spray drying* (RÉ, 2006).

Existem diferentes desenhos de spray dryer. Normalmente, são de ciclo aberto por meio de que o gás secante (ar) é descarregado após o uso. Os *spray dryers* também podem ser ciclo fechado, que permite que solventes orgânicos sejam utilizados como meio alimentador. Nesses casos, utilizam-se gases inertes como o nitrogênio. Pode-se utilizar também *spray dryers* com gases com baixa concentração de oxigênio, que permitem que materiais suscetíveis à oxidação ou com tendências explosivas possam ser submetidos à secagem. Além disso, os *spray dryers* podem ser desenhados para a obtenção de pós estéreis e para isso, o líquido alimentador e o gás atomizante devem ser filtrados e com desenho que permita fácil limpeza.

A composição do líquido alimentador e das condições de secagem, como temperatura de entrada e saída; fluxo do spray; fluxo de ar comprimido, fluxo de alimentação (PATHAK, 2009) afetam fortemente as propriedades do pó

obtido e, portanto devem ser cuidadosamente definidos. O estágio de atomização é decisivo no processo, pois define a distribuição dos tamanhos das gotículas. Em regra geral, quanto maior a energia utilizada para a atomização, menor o tamanho de partículas obtidas (RÉ, 2006).

Do ponto de vista microestrutural, o processo de formação das gotículas no estado líquido seguido da solidificação pela evaporação do solvente é bastante estudado com a combinação de ferramentas experimentais, modelo numérico e um modelo analítico simplificado a fim de se entender o processo de secagem e obter-se as características desejadas para as partículas (VEHRING, 2007 e VEHRING, 2008). A microestrutura desejada é gerada por uma complexa mistura multifásica do polímero, surfactante e AB e dependendo do líquido alimentador inicial, que pode ser uma solução, emulsão e dispersão/suspensão. As soluções e emulsões submetidas à secagem geram esferas, enquanto que suspensões podem gerar esferas ou cápsulas (figura 8).

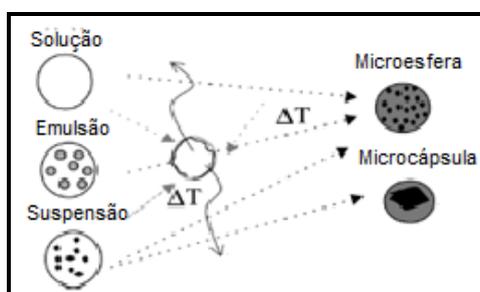


Figura 8 – Tipos de micropartículas obtidas por SD (RÉ, 2006).

O SD é um método de secagem primária e finalística utilizado para a obtenção de pós-secos com propriedades físico-químicas bem definidas.

É uma técnica de secagem primária, pois permite a obtenção de ABs encapsulados diretamente a partir de uma solução, emulsão ou dispersão, contendo o AB e o polímero. Nesse caso, a solução alimentadora pode ser: uma solução, onde o polímero e o AB são dissolvidos em um solvente orgânico, como o diclorometano; uma emulsão, onde o AB e o polímero são dissolvidos no solvente orgânico (fase orgânica (O)) e esta fase é adicionada a

uma a solução aquosa contendo um surfactante, como o poli(álcool vinílico) (PVA) e polissorbatos, (fase aquosa (A)). A adição da fase O na fase A com agitação mecânica, com homogeneizadores, ou ultrassom, com sonicadores, leva à formação de uma emulsão orgânico em água (O/A); e uma dispersão, onde o AB, normalmente hidrofílico, é disperso numa solução orgânica contendo o polímero dissolvido. Então, o líquido alimentador é atomizado/pulverizado pelo bico atomizador e imediatamente seco por ar quente gerando as partículas sólidas secas.

E também é uma técnica de secagem finalística, pois permite obter pós-secos formados por partículas carregadas com o AB com excipientes. Nesses casos, os pós-secos são produzidos a partir de suspensões de partículas de carregados com AB previamente obtidas associadas a excipientes, com o objetivo de garantir às partículas propriedades e estabilidades diferenciadas. As partículas carregadas com o AB são previamente preparadas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente e suas modificações, como emulsificação/difusão do solvente; *salting out*; deslocamento de solvente, dentre outros (SOPPIMATH, 2001).

Após obtenção das partículas, essas são suspendidas em fase A e são submetidas à secagem por SD. Durante o processo de secagem, podem ser incorporados excipientes na fase A para gerar nano-agregados dessas partículas para conferir propriedades adequadas.

O método de evaporação de solvente se baseia na obtenção de emulsão do tipo O/A que origina nanosferas. Na dissolução do polímero (FO). O AB hidrofóbico e o polímero são dissolvidos em um solvente orgânico, como diclorometano, clorofórmio ou acetato de etila, formando a fase orgânica (O). A Fase O é emulsificada em uma FA contendo um surfactante para fazer uma emulsão óleo em água (O/A) com uma fonte de energia elevada, como os ultrassons ou homogeneização a alta pressão. O surfactante pode ser uma gelatina, poli(álcool vinílico) (PVA), polissorbato, poloxamer, albumina. Após a formação da emulsão estável, o solvente orgânico é evaporado pelo aumento da temperatura, sob vácuo ou apenas por agitação, ocorrendo a precipitação do polímero na fase externa aquosa e conseqüente formação das nanosferas.

O encapsulamento de agentes bioativos hidrofílicos é realizado por duplas emulsões do tipo água/óleo/água (A/O/A). Nesses casos, a fase A interna com AB dissolvido e a fase O com polímero dissolvido e um tensoativo (fosfolipídios) formando a emulsão primária A/O, que é adicionada em uma segunda fase A contendo tensoativo (PVA) (A/O/A).

O método de *salting out* é uma alternativa ao método anterior, pois não utiliza solventes orgânicos que podem ser tóxicos para o meio ambiente e para o sistema fisiológico. Nesse método, o polímero e o AB são dissolvidos em um solvente solúvel em água, como acetona, e esta solução é emulsificada em uma solução aquosa saturada de um eletrólito (sacarose e sais de cloreto, como $MgCl_2$, $NaCl$), agente *salting out*, contendo um tensoativo, como o PVA. A emulsão O/A preparada sob agitação intensa à temperatura ambiente. A emulsão é diluída num volume adequado de água deionizada ou de uma solução aquosa para a difusão do solvente orgânico para a fase externa, seguido da precipitação do polímero e a formação das nanosferas. Os agentes de salting-out não devem sofrer precipitação devido à separação das nanosferas recém-preparadas.

O método de emulsificação/difusão do solvente é uma versão modificada do *salting-out*, evitando-se eletrólitos, purificação ou lavagem das nanopartículas recém-formadas. Nesse método, um solvente parcialmente solúvel em água, como álcool benzílico, propilenocarbonato, acetona e acetato de etila, previamente saturados com água é misturado a um solvente insolúvel em água para garantir equilíbrio termodinâmico inicial da fase orgânica. A emulsificação com a solução aquosa com tensoativo O/A (PVA ou um poloxâmer) é realizada sob agitação intensa. Posteriormente, é adicionada água ao sistema, causando a difusão do solvente orgânico devido à difusão espontânea do solvente solúvel em água para a FA, cria-se uma turbulência interfacial entre as duas fases levando a formação de partículas menores. O solvente orgânico pode ser eliminado por evaporação ou por ultrafiltração, obtendo-se dispersão aquosa de nanopartículas.

As características físico-químicas das esferas são afetadas por (SOUTO, 2012):

- Solubilidade do AB: Hidrofílicos – não ionizados com ajuste do pH da fase A acima do pKa do PA ou emulsões A/O/A;
- Natureza do solvente orgânico: solubilizar PA, difundir FA;
- Concentração e MM do polímero: Quanto maior, maior viscosidade e mais difícil dispersão das fases e maior tamanho das esferas;
- Natureza e concentração do tensoativo: Quanto maior a concentração, menor esferas, pois mais moléculas inseridas na superfície das gotículas emulsificadas;
- Modo e duração da agitação: Ultrassons ou homogeneização a alta pressão, reduz tamanho das gotículas da fase interna e aumenta a superfície de contato entre as fases.

1.6. Características físico-químicas ideais das partículas para a via inalatória

As características físico-químicas das partículas relevantes para o campo farmacêutico são o tamanho médio e distribuição de tamanho, densidade e morfologia e aspecto das partículas. As características impactam em propriedades do pó-seco, como aerolização, fluxometria, solubilidade, dispersabilidade e higroscopicidade (RÉ, 2006).

A figura 9 mostra a equação usada para definir o raio aerodinâmico (d_A), principal parâmetro utilizado para avaliar a tendência de deposição das partículas inaladas. A equação mostra o cálculo do raio aerodinâmico (d_A), que é uma função do raio geométrica (d_G) e da densidade efetiva da partícula (ρ_{eff}) (KHO, 2010).

$$d_A = d_G \sqrt{\frac{\rho_{eff}}{\rho_s}} \quad \text{Onde, } \rho_s = 1\text{g/cm}^3$$

Figura 9 – Equação para o cálculo do raio aerodinâmico (d_A) que é função da densidade geométrica (d_G) e da densidade efetiva da partícula (ρ_{eff}).

As partículas esféricas com $d_A < 1 \mu\text{m}$, como as nanopartículas são exaladas do pulmão sem se depositar, enquanto que partículas com $d_A > 10 \mu\text{m}$ se depositam na garganta e boca devido a impactação inercial. Assim, são utilizados excipientes que permitam a obtenção de partículas com d_A entre 1 e 5 μm , ideias para uma deposição no trato respiratório inferior (traquéia aos sacos alveolares). O d_G também é importante para as partículas inaladas, isto é, partículas largas ($d_G > 5 \mu\text{m}$) e baixa densidade ($\rho_{\text{eff}} < 1 \text{ g/cm}^3$) apresentam maior eficiência de aerolização e maior biodisponibilidade no pulmão. Nos casos de maiores valores de d_G , há uma redução na tendência de aglomeração das partículas facilitando a aerolização das partículas. Contudo, o alto d_G deve ser acompanhado de uma baixa ρ_{eff} , que podem ser obtidas com a formação de partículas porosas ou ocas, para manter o d_A entre 1 e 5 μm e conseguir uma boa deposição nos alvéolos (KHO, 2010).

Em casos de partículas com d_G maior que 5 μm , elas são menos suscetíveis a captação pelo macrófagos (KHO, 2010). A captação das partículas pelos macrófagos, desejada para infecções cuja bactéria causadora se aloja nos macrófagos alveolares, é maior em partículas com d_G de 1 a 2 μm e com características preferencialmente lipofílicas.

Além das características aerodinâmicas ideais, hidro/lipofilicidade, carga superficial e química de superfície são importantes quando o tratamento visa uma maior interação com determinado tipo de célula ou tecido ou permeação em membranas (JANSEN, 2012) ou ainda absorção pulmonar. Nesses casos, utilizam-se excipientes para conferir essas características as partículas.

Muitas vezes, isso se dá pela obtenção de nano-agregados com as características necessárias para a ação pretendida, isto é, deposição, captação/penetração na célula/tecido adequado e/ou absorção pulmonar. Os nano-agregados são formados por nanopartículas carregadas com o AB agregadas com auxílio excipientes que atuam como pontes que conectam essas nanopartículas (figura 10).

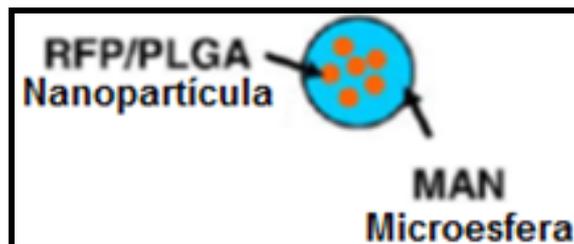


Figura 10 – Esquema de nano-agregado de nanopartículas de PLGA contendo rifampicina (RFP) agregadas com auxílio do manitol (MAN) que podem ser obtidos pela secagem por SD. (OHASHI, 2009).

Os nano-agregados devem ser reconstituídos nas nanopartículas primárias após a deposição adequada no pulmão. A reconstituição nas nanopartículas primárias é governada pela força de ligação dos nano-agregados e essa força é influenciada mais fortemente pela solubilidade em água dessas pontes interconectantes de nanopartículas, do que pelas forças atrativas intrínsecas entre as nanopartículas. Os nano-agregados são principalmente obtidos quando o SD é utilizado como técnica finalística, isto é, quando nanopartículas são obtidas por métodos de evaporação de solvente para que depois uma suspensão delas seja seca por SD.

Alguns excipientes que podem ser utilizados para obtenção de micro e nanopartículas, nano-agregados ou apenas como adjuvantes em pós-secos para formulações inalatórias com diversas finalidades conferindo diferentes características as partículas/pós são:

- Manitol – ajuste osmótico das soluções submetidas à secagem e dispersão das nanopartículas sem induzir agregação (TAKASHIMA, 2007). Usado também como diluentes e agentes aglutinantes (KHO, 2010).
- Lactose – Usado como diluente e agente aglutinante (KHO, 2010).
- Leucina – devido à natureza hidrofóbica é usada juntamente com excipientes hidrofílicos, como agentes de dispersão por reduzir a coesão entre as partículas.
- PVA – Usado também como diluente e agente aglutinante, porém não tão utilizado como o manitol, que também promove remoção do muco;

- Ciclodextrinas – Usadas também como diluentes e agentes aglutinantes (LEBHARDT, 2011)
- Quitosana – melhorar atividade de RNA e DNA pelo aumento da captação celular das nanopartículas (JENSEN, 2012).
- Dioleoiltrimetilamoniopropano (DOTAP) – melhorar atividade de RNA e DNA pelo aumento da captação celular das nanopartículas (JENSEN, 2012).
- Poletilenoimina (PEI) – promove a partícula superfície catiônica, melhorando a captação celular das nanopartículas e conseqüentemente a transfecção de RNA e DNA (JENSEN, 2012).

A escolha dos excipientes adequados deve ser bem estudada, pois alguns problemas podem ocorrer quando não selecionados adequadamente. Nos nano-agregados, por exemplo, alguns problemas que pode ocorrer são: (i) Os nano-agregados não se desagregam e, portanto podem ser captados por macrófagos em patologias em que a captação não é desejável; (ii) altas concentrações de excipientes (excipiente/NP 100:1) só é possível para AB muito potentes; (iii) surfactantes são utilizados como excipientes para prevenir a agregação das NP entre si, podendo causar distúrbios no muco e nas camadas de surfactantes alveolares e irritação do epitélio pulmonar (LEBHARDT, 2011).

1.7. Caracterização físico-química das partículas, propriedades de fluxo e comportamento aerodinâmico dos pós-secos

Sendo o pó-seco um conjunto de partículas sólidas, a primeira característica que se nos apresenta como relevante definir é a dimensão das partículas. A dimensão das partículas não é o único fator que afeta o comportamento do pó. A densidade do material de que as partículas são constituídas afeta igualmente a sua massa, e por isso o seu peso. Outros fatores, tais como a morfologia e a rugosidade das partículas têm também influência, já que afetam a área de

contato entre as partículas, e conseqüentemente a intensidade das interações entre elas.

Os pós-secos são caracterizados para determinação da morfologia, tamanho e densidade partículas (raio aerodinâmico (d_A), raio geométrico (d_G), densidade efetiva da partícula (ρ_{eff})), carga superficial da partícula (potencial zeta), conteúdo de água, parâmetros importantes para as propriedades tecnológicas do pó-seco, como densidade aparente (ρ_a), densidade compactada (ρ_c), Índice de Carr (IC), ângulo de repouso e velocidade de escoamento e capacidade de aerolisação.

A morfologia, o aspecto das partículas e algumas vezes o tamanho de partículas são determinados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). O MEV é utilizado para determinar o tamanho de partículas em nano-agregados, pois na determinação pelas técnicas de difração a laser e espalhamento de luz, coloca-se as partículas em água desfazendo o granulado.

O tamanho de partículas (d_G) e distribuição de tamanho de partículas por difração a laser, no caso de micropartículas, ou por espectrofotometria de espalhamento de luz dinâmico, no caso de nanopartículas. Em geral, o espalhamento de luz dinâmico é aplicado na caracterização de partículas dispersas em um líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partícula usando a relação Stokes-Einstein (MALVERN, 2014 b).

O potencial zeta é determinado para avaliação da carga superficial das partículas. O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade. Sua medição oferece uma visão detalhada sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação, podendo ser aplicada para melhorar a formulação de dispersões, emulsões e suspensões (MALVERN, 2014 a).

A redispersibilidade de pós é realizada para avaliar a capacidade de redispersão dos nano-agregados. O pó é redisperso em água e mede-se o tamanho das partículas antes do processo de secagem por SD e após a redispersão em água.

O conteúdo de água é determinado por análise termogravimétrica ajuda a prever agregação do pó e avaliar as propriedades de fluxo.

A difração de raio X e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) permitem avaliar a estrutura do fármaco e do polímero, assim como a interação entre eles (SILVA-JUNIOR, 2008 e SILVA-JUNIOR, 2009).

Após a determinação das características determinam-se as propriedades de fluxo do pó-seco.

A densidade aparente (ρ_a) é medida pelo volume ocupado por certa massa de pó em um cilindro graduado. A densidade compactada (ρ_c) é determinada pelo teste de densidade batida, onde adiciona-se uma massa de pó em um cilindro graduado, que é submetido à batidas leves com um número de batidas por minuto programada. Após o fim das batidas, mede-se o volume final do pó e determina-se sua densidade (GARCIA, 2012).

O fluxo de pós é determinado indiretamente pela densidade aparente e pela densidade compactada, pelo índice de compressibilidade de Carr (IC):

$$IC = (\rho_c - \rho_a / \rho_c) \times 100$$

Os valores de IC < 10% indicam excelente fluxo; IC de 11 a 15% fluxo bom; IC de 16 a 20% fluxo fraco; IC de 21 a 31% fluxo pobre; IC de 16 a 31% fluxo pobre (pós coesivos); IC > 32% fluxo muito pobre.

O ângulo de repouso é calculado pela tangente determinada pela altura e raio formado pelo cone da amostra. De acordo com os resultados obtidos, os pós são classificados em termos de propriedades de escoamento como se segue: ângulo de repouso de 25-30° fluxo excelente; de 31-35° fluxo bom; de 36-40° fluxo aceitável; de 41-45° fluxo passável; de 46-55° fluxo pobre; de 56-65° fluxo muito pobre; de 65° fluxo extremamente pobre (GARCIA, 2012).

Para tentar simular a deposição *in vivo* é, então, realizada a avaliação aerodinâmica das partículas a qual pode ser feita em diversos aparelhos, sendo os mais utilizados, o *Twin-Stage Liquid Impinger* e o Impactador em Cascata da Andersen. O funcionamento básico destes aparelhos é o mesmo, ou seja, é fazer passar o aerossol e um fluxo de ar pelo aparelho a uma velocidade constante (CARLOS, 2002).

O mais utilizado *in vitro* é o impactador em cascata, constituído por vários estágios de depósito com orifícios de diâmetros sucessivamente menores, onde são retidas as partículas de acordo com o seu tamanho pelo qual o produto contido no jato inalatório é levado, por meio de vácuo com fluxo controlado, para um conjunto de peneiras que simulam, *in vitro*, essa distribuição desde a via respiratória até o alvéolo pulmonar (Figura 11). O equipamento simula a distribuição aerodinâmica de partículas no sistema respiratório humano (ANDRADE-LIMA, 2012).

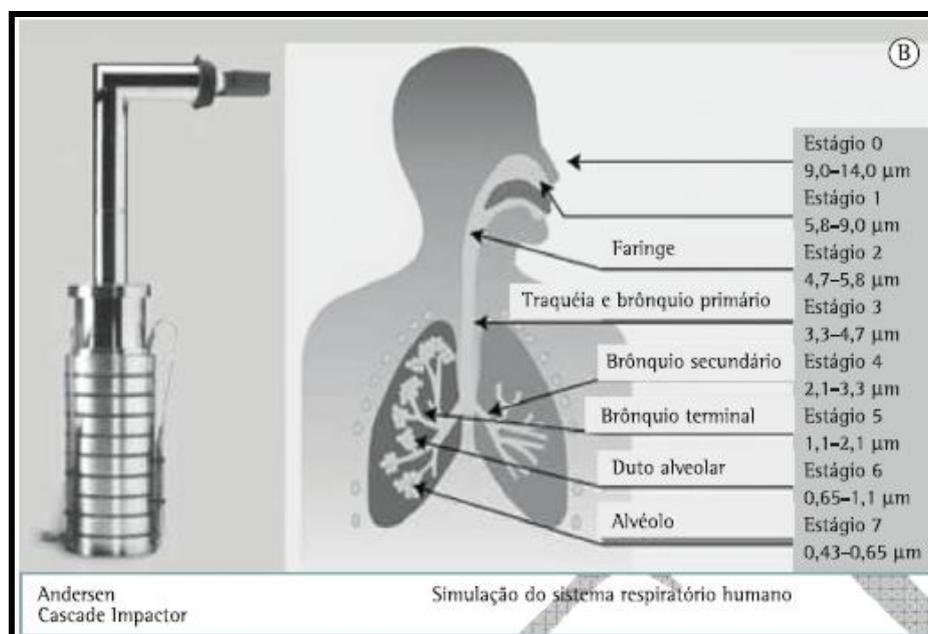


Figura 11 - Aparelho montado com os estágios equivalentes às diferentes partes do sistema respiratório (ANDRADE-LIMA, 2012).

Corresponde a uma técnica não invasiva que permite o fracionamento e recolhimento do aerossol gerado após liberação do inalador e de ser feito

passar por uma "garganta" a qual mimetiza o que ocorre *in vivo*. No impactador em cascata é correlacionado o fator velocidade com massa, onde partículas de maiores dimensões (> 10 μm) são depositadas nos estágios superiores por impacto e partículas mais finas conseguem penetrar nos estágios mais profundos do aparelho. Por meio deste aparelho é feita uma determinação da distribuição do tamanho das partículas, de muita utilidade para a comparação de diferentes dispositivos inalatórios e formulações (CARLOS, 2002).

Quatro parâmetros são examinados para avaliar comportamento do pó inalado: dose emitida (DE), fração de partícula fina (FPF), diâmetro aerodinâmico médio (DAM) e índice de coesão (IC). DE é a quantidade de pó aerolizado para fora do inalador expresso em função da quantidade adicionada no inalador. FPF é a quantidade de pó com $dA \leq 5 \mu\text{m}$ em função do total de pós coletado no inalador. Quanto maior FPF, maior performance aerossol, isto é, maior capacidade de deposição nos alvéolos. DAM é o valor médio determinado pela distribuição de massa da dA . O IC caracteriza a aglomeração durante aerolização, determinado pela razão DAM e dA , onde alto IC significa grande aglomeração durante aerolização.

Após a determinação das propriedades físico-químicas das partículas e das propriedades de fluxo dos pós-secos, são realizados estudos através de testes *in vitro* e *in vivo* para determinar-se a resposta ao pó-seco inalado.

A administração de aerossóis para o pulmão, estudos de deposição *in vivo*, O transporte da partícula pela monocamada de células pulmonares do tipo CaLu-3, integridade das junções das células CaLu-3, captação pela célula alvo, como macrófagos e células Cos-7 (células de rim de macaco africano verdes). A atividade em muco artificial, interação com muco, difusão em catarro, captação macrófago para estudos em fibrose cística. A avaliação da resposta ao antígeno, estudo de transfecção de gene *in vitro* e *in vivo*, atividade de silenciamento de gene *in vitro* e testes de suscetibilidade de biofilme.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Abordar a obtenção de partículas baseadas em poliésteres alifáticos carregadas com agentes bioativos pelo método de *spray drying* e a utilização dessas partículas na forma de pós-secos em aerossóis para administração inalatória para ação local pulmonar e para absorção pulmonar para ação sistêmica.

2.2. Objetivos específicos

- Apresentar as doenças pulmonares e a vantagem da via inalatória para seu tratamento;
- Abordar a obtenção de nanopartículas de poliésteres carregadas com agentes bioativos por técnicas de evaporação do solvente;
- Abordar os métodos de obtenção de pós-secos baseados em partículas de poliésteres por *spray drying*;
- Discutir aplicações da utilização de partículas por inalação para ação pulmonar e ação sistêmica.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, muitas doenças pulmonares, como a fibrose cística, a tuberculose e a hipertensão pulmonar, possuem tratamento limitado devido à baixa concentração do agente bioativo (AB) nos tecidos/células acometidos pela patologia; aos efeitos colaterais tóxicos sistêmicos do AB; e à complexidade do tratamento. Somado a isso, diversos AB possuem uso limitado pela via oral por serem rapidamente metabolizados ou degradados. Assim, a via inalatória surge como uma via alternativa, pois permite a vetorização do AB diretamente no local de ação e permite explorar AB que apresentam instabilidade por outras vias, além de permitir a administração sistêmica para casos onde uma resposta rápida é necessária. A biodegradabilidade e biocompatibilidade dos poliésteres permite que sejam utilizados no trato respiratório para modular a resposta biológica local e sistêmica.

Por fim, o estudo desses sistemas pela via inalatória podem levar a tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais tóxicos, o que à longo prazo, pode aumentar a adesão do paciente ao tratamento e a taxa de cura, melhorando a qualidade de vida e reduzindo os danos causados por diversas patologias com terapia limitada.

4. METODOLOGIA

A monografia tem como objetivo buscar e comparar as informações mais relevantes contidas em trabalhos publicados sobre o tema focando na possibilidade de utilização de pós-secos em formulações inalatórias pela Indústria Farmacêutica tanto para ação sistêmica quanto para ação local pulmonar.

O processo de busca dos artigos ocorreu por meio dos portais sciencedirect.com, scopus.com e periodicos.capes.gov.br. A pesquisa de dados buscou artigos publicadas no período de 2004 até 2014, período de crescente interesse pelo tema, de acordo com dados obtidos apresentados no gráfico da figura 12.

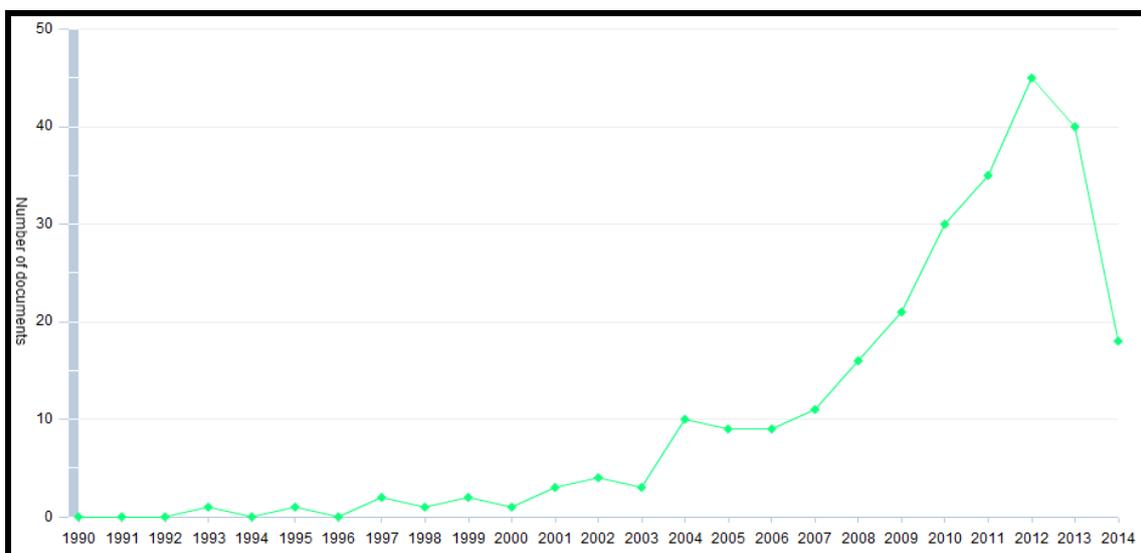


Figura 12 – Gráfico obtido no site scopus.com pela busca das seguintes palavras-chave: PLGA OR PCL (Title, abstract, keywords) AND inhalation (All fields).

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Conforme apresentado na figura 12, observa-se um crescente interesse na via inalatória para entrega e liberação de AB a partir de nano e micropartículas baseadas em poliésteres alifáticos. Assim, a revisão da bibliografia aborda as perspectivas para o tratamento de doenças pela via inalatória.

5.1. Patologias

O pulmão é acometido por diversas doenças que se forem tratadas pela via inalatória com a utilização de partículas carregadas com agentes bioativos (AB) podem apresentar um tratamento mais eficaz. A terapia inalatória permite o direcionamento do AB diretamente ao local de ação, impedindo os efeitos colaterais tóxicos que normalmente ocorrem com a exposição dos ABs em células/tecidos saudáveis. As partículas poliméricas carregadas permitem que o AB seja liberado de maneira sustentada levando a uma menor frequência de doses e permitindo também que a partícula seja reconhecida e internalizada pelas células devido as suas características físico-químicas (solubilidade e tamanho de partícula, por exemplo).

A criptococose e a tuberculose são doenças que acometem o pulmão e suas agentes causadores infectam principalmente os macrófagos alveolares. Assim, via inalatória para a ação pulmonar, portanto, pode aumentar o efeito terapêutico e reduzir o efeito sistêmico, responsável pela resistência e efeitos colaterais. O alvo é o macrófago alveolar e os tamanhos de partícula de 1 a 2 μm apresentam maior captação pelos macrófagos.

O *Cryptococcus neoformans*, fungo responsável pela criptococose, é causador da meningite em pacientes portadores da HIV quando o fungo atinge o sistema nervoso central. O *C. neoformans* infecta primeiramente os macrófagos

alveolares, sendo o pulmão, portanto, a porta de entrada. Além disso, a via oral tem causado a resistência do fungo ao fluconazol, fármaco de escolha. (RIVERA, 2004).

A *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose, infecta os macrófagos alveolares. Os micro-organismos crescem lentamente e a doença é frequentemente crônica com um tratamento de 6 meses, que somado à toxicidade dos fármacos (combinação multifármacos) e o desenvolvimento de resistência bacteriana são entraves para um tratamento adequado, podendo levar a baixas taxa de cura devido à baixa adesão do paciente ao tratamento. Portanto, a via inalatória permite que o fármaco seja diretamente direcionado ao local de ação, mantendo baixa a concentração sistêmica e as partículas carregadas com antituberculostáticos permitem liberação sustentada e maior penetração no granuloma (agregados de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* cercados por diferentes tipos de células imunológicas). Assim, a frequência de doses, os efeitos colaterais tóxicos, a resistência da micobactéria ao fármaco e interações medicamentosas poderiam ser diminuídas (TOMODA, 2005; ONOSHITA, 2010; HIROTA, 2013).

A Rifampicina (RIFA) é o fármaco mais problemático da combinação multifármacos, pois apresenta baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade (MARIAPPAN, 2006); polimorfismos (AGRAWAL, 2004), interações medicamentosas (MEMENTO TERAPÊUTICO FARMANGUINHOS, 2006), possuindo maior apelo para encapsulamento e para a via inalatória. O óxido nítrico (NO) é uma espécie bactericida da resposta inata dos macrófagos às infecções intracelulares. Como sua inalação não apresenta benefícios no tratamento da TB, o encapsulamento de doadores abre uma nova oportunidade de tratamento, pois pode aumentar a penetração no granuloma (VERMA, 2012). A oxoflacina (Ox), fármaco de segunda linha moderadamente solúvel em água utilizado no tratamento da TB pode ser complexado com paládio (Pd) (complexo Pd/Ox) e encapsulado em partículas diminuindo a solubilidade em água e aumentando a penetração no macrófago (PALAZZO, 2013).

As doenças pulmonares obstrutivas crônicas são responsáveis por infecções pulmonares persistentes e inflamações devido à formação de biofilme⁴ no pulmão. São normalmente tratadas pela nebulização dos antibióticos, porém a barreira mucociliar espessa limita ao acesso ao biofilme. O encapsulamento de levofloxacina em nanopartículas pode melhorar a penetração no muco, e conseqüentemente, no biofilme devido ao seu tamanho, aumentando a eficácia do tratamento. Além disso, possuem maior tempo de retenção, pois são mais dificilmente reconhecidas pelo sistema imune que as micropartículas (KHO, 2010; CHEOW, 2010; CHEOW, 2011ab).

O encapsulamento de antibióticos, como o cetiofur (cefalosporina de 3^a geração), a tobramicina e a claritromicina em micro e nanopartículas respectivamente podem ser realizadas para o tratamento de doenças respiratórias bacterianas (ZHIHUI, 2013; UNGARO, 2012; e MOGHADDAN, 2013).

Além das infecções bacterianas, o tratamento de doenças pulmonares obstrutivas, como a asma, com agonistas β_2 (salbutamol) é limitado pela rápida duração do efeito levando a necessidade de doses frequentes e a associação com anti-inflamatórios esteroidais (beclometasona e dexametasona) leva a efeitos adversos devido a altas concentrações do corticosteroide na garganta. Com isso, o encapsulamento e a liberação controlada dos fármacos podem eliminar esses dois problemas (LEAROYD, 2010 e FONTANA, 2014). O encapsulamento de budesonida e salbutamol em partículas também pode auxiliar no tratamento da asma (JAIN, 2013). Nesses casos, tanto micro quanto nanopartículas podem tornar o tratamento mais eficiente.

Outra doença que acomete o pulmão é a hipertensão pulmonar, patologia, cuja terapia pode ser mais eficaz com o encapsulamento do sildenafil em micro e nanopartículas, inibidor da fosfodiesterase (PDE-5) que causa vasodilatação, para utilização na via inalatória (BECK-BROICHSITTER, 2012).

⁴ Comunidade fixa de bactérias recobertas por uma matriz auto secretada composta por substância polimérica extracelular que exhibe alta tolerância a antibióticos.

A via inalatória vem ganhando destaque, pois permite que ABs que possuem uso limitado pela via oral, como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (DNA e RNA), sejam administrados para ação sistêmica. O pulmão possui uma grande área superficial que pode ser explorada para absorção de ABs para ação sistêmica sem o efeito de primeira passagem, responsável por grande metabolismo do AB e possui um ambiente fisiológico menos drástico que o ambiente ácido do estômago, responsável pela desnaturação das PTNs por exemplo.

Somado a isso, problemas, como a desnaturação desses ABs durante a fabricação, aerolização e acondicionamento; propriedades de fluxo ruins resultando em entrega ineficiente do pó-seco inalado; rápida depuração do pulmão devido ao sistema mucociliar; degradação enzimática; e fagocitose pelos macrófagos alveolares, podem ser superados com o encapsulamento em micro e nanopartículas (SIVADAS, 2008). O encapsulamento de PTNs em nano e micropartículas permite um aumento de sua estabilidade e da absorção pulmonar, melhora nas propriedades aerodinâmicas, liberação controlada e escape dos sistemas de depuração. A albumina é utilizada normalmente como PTN modelo para esses estudos. A utilização de anticorpos direcionados para os patógenos pulmonares por inalação é desejável, pois a via injetável é inconveniente e sofrem degradação pela via oral (KAYE, 2009). A insulina (peptídeo) foi encapsulada para absorção pulmonar, pois essa pode manter a estrutura por mais tempo e sendo uma alternativa a via subcutânea (HAMISHEHKAR, 2010).

A entrega de genes é limitada pela baixa captação celular e pela degradação seguida de endocitose, resultando em baixa eficiência de expressão gênica. Os retrovírus e adenovírus são utilizados para melhorar a transfecção e expressão de genes, porém são tóxicos, imunogênicos e não são específicos para tecidos alvo (TAKASHIMA, 2007).

O conceito da interferência de RNA mediada por RNA de interferência (SiRNA) fornece uma oportunidade para o tratamento de doenças associadas a genes. Portanto, doenças que acometem as vias aéreas, como câncer, síndrome respiratória aguda severa e influenza, podem ser tratadas com SiRNA

encapsulado em partículas para serem administrados pela via inalatória para ação pulmonar para aumentar a transfecção de genes (JENSEN, 2010). Ao mesmo tempo, o encapsulamento de DNAase, enzima mucolítica, em partículas para facilitar a penetração no muco pode ser realizada (OSMAN, 2013).

A enzima quimiotripsina foi encapsulada em copolímeros como modelo para o tratamento da fibrose cística, doença autossômica recessiva que acomete o pulmão (TAWFEEK, 2013).

A vacina contra a hepatite é administrada pela via intramuscular, causando reações no local da injeção. O alúmen presente na vacina é responsável pela formação de nódulos e eritemas e as técnicas de secagem estão associadas à diminuição da imunogenicidade da vacina. A obtenção do antígeno da hepatite encapsulado para entrega pulmonar é interessante, pois o pulmão apresenta um maior tempo de residência e é onde as células apresentadoras de antígeno, como os macrófagos, estão amplamente localizados, podendo, portanto, aumentar a eficácia da vacinação (MUTTIL, 2010).

5.2. Obtenção de nanopartículas pelos métodos de evaporação de solvente

Os métodos de evaporação de solvente permitem a obtenção de nanopartículas carregadas com antibióticos, PTNs, peptídeos, DNA, RNA e antígenos, que são posteriormente submetidas à secagem por SD. A ação finalística do SD visa produzir nano-agregados na escala micro com as características aerodinâmicas (diâmetro e densidade) desejadas para deposição, redispersão e respostas biológicas adequadas.

No tratamento de biofilme, utiliza-se a levofloxacino, fármaco solúvel em solventes orgânicos e em água, o que dificulta atingir uma boa eficiência de encapsulamento, já que o fármaco se difunde pelas duas fases. Por isso, diferentes métodos buscam uma melhor eficiência. Assim, as nanopartículas de

PLGA (CHEOW, 2010; CHEOW, 2011a) e PCL (KHO, 2010; KHO, 2011; CHEOW, 2011b) carregadas com levofloxacino (LEV) podem ser obtidas por métodos emulsificação/evaporação do solvente, nanoprecipitação e dupla emulsificação/evaporação do solvente. O método de emulsificação/evaporação de solvente é realizado pela dissolução da LEV e PLGA ou PCL em diclorometano, solvente orgânico. A fase O é então emulsificada em uma fase aquosa contendo PVA 1% ou pluronic F-68 0,1% sob sonicação. A emulsão é deixada sob leve agitação para evaporação do solvente orgânico e precipitação das nanopartículas. Posteriormente, a suspensão é centrifugada e lavada para retirada do surfactante residual. Normalmente, as partículas de PLGA obtidas apresentam tamanhos entre 200 e 300 nm com distribuição de tamanho de partículas monodispersa, mas os métodos avaliados não apresentam boa eficiência de encapsulamento. A obtenção de nanopartículas carregadas com sildenafil foi realizada pelo mesmo método (BECK-BROICHSITTER, 2012).

A obtenção de nanopartículas de PLGA carregadas com tobramicina (Tb) pode ser feita também pelo método de emulsificação/difusão com auxílio de polímeros hidrofílicos, como o PEG, a quitosana, alginato e o PVA para modular o tamanho e propriedades, como carga superficial, mucoadesividade, tamanho, liberação, eficiência de encapsulamento e propriedades de fluxo. As partículas de 250 a 300 nm alcançaram uma eficiência de encapsulamento até 60 x com a utilização de alginato. A quitosana e o PVA diminuem a tendência de agregação pela carga positiva e neutra da superfície da partícula. A liberação sustentada da Tb durou até um mês em partículas modificadas com alginato. A mucoadesividade permitiu que as partículas não fossem removidas rapidamente o que comprometeria o tratamento. A obtenção de nano-agregados permitiu boas propriedades de fluxo e aerolização (UNGARO, 2012).

A obtenção de nanopartículas de PLGA carregadas com claritromicina pelo método de emulsificação/evaporação do solvente permitiu a obtenção de partículas com diferentes tamanhos e eficiências de encapsulamento em diferentes razões fármaco/polímero e concentrações de PVA. A diminuição na razão fármaco/polímero e na concentração de PVA aumentou a eficiência de encapsulamento, isto porque, o aumento na concentração do polímero causa

um aumento na viscosidade da fase interna atrapalhando a difusão do fármaco para a fase externa e a menor concentração de PVA, diminui a solubilidade da claritromicina, fármaco lipofílico, na fase externa (MOGHADDAM, 2013).

A obtenção de nanopartículas de PLGA contendo siRNA, AB hidrofílico, a partir de emulsão A/O/A. Uma solução aquosa tampão contendo o siRNA é adicionado numa solução orgânica de diclorometano contendo o PLGA dissolvido. A emulsão A/O é obtida com auxílio de um sonicador. Posteriormente, a fase A contendo PVA como surfactante é adicionada sob a emulsão A/O formando uma dupla emulsão A/O/A, que é diluída em solução aquosa de PVA e colocada para evaporar o solvente orgânico (JENSEN, 2010). As nanopartículas carregadas com um modificador catiônico, o propanoato de dioleoiltrimetilamonio (DOTAP), foram obtidas buscando maior eficiência do sistema em silenciamento de genes. O método de obtenção é o mesmo, porém o modificador é adicionado na fase O junto com o PLGA. As nanopartículas apresentaram tamanhos de 200 a 260 nm e conforme aumentasse a concentração de DOTAP, diminuiu-se o tamanho das nanopartículas (figura 13) (JENSEN, 2012).

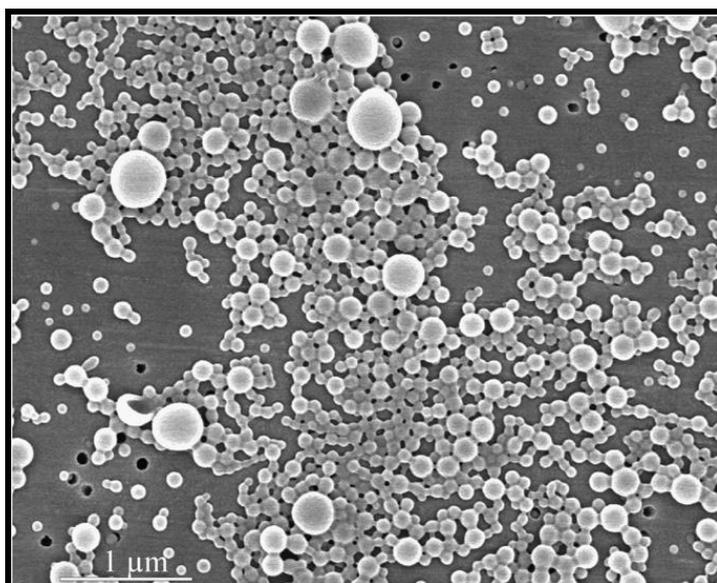


Figura 13 - Micrografia de MEV das nanopartículas modificadas com DOTAP (JENSEN, 2012).

Micropartículas carregadas com insulina foram obtidas por método um pouco diferente. A insulina, peptídeo hidrofílico, foi dissolvida em solução aquosa de ácido clorídrico que foi incorporado em uma solução de PLGA em acetonitrila. A solução obtida foi dispersa em óleo mineral contendo span 80, como surfactante, e colocado sob agitação para evaporação da fase interna. As micropartículas apresentaram tamanho médio de 4,65 μm com morfologia esférica e superfície lisa e regular sem a tendência de formar agregados (figura 14) (HAMISHEHKAR, 2010).

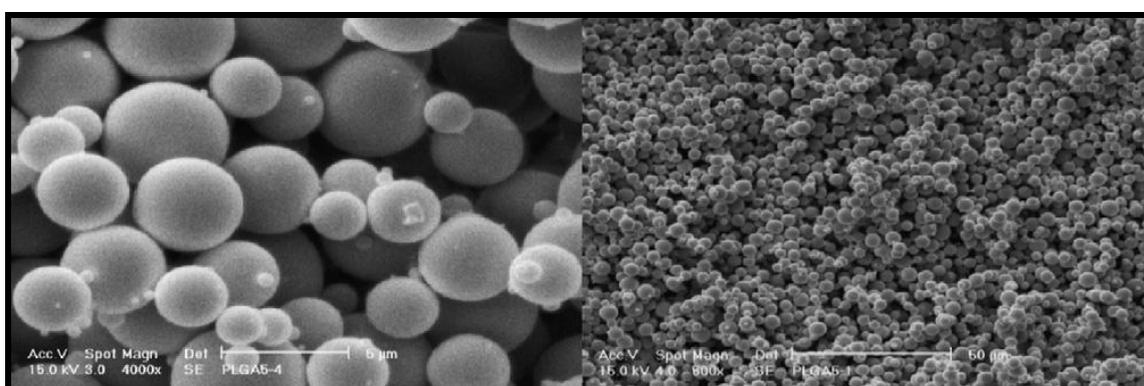


Figura 14 - Micrografias de MEV das micropartículas de PLGA carregadas com insulina (Hamishehkar, 2010).

Percebe-se então, que a utilização de métodos de evaporação de solvente com modificações permite a obtenção de micro e nanopartículas de PLGA carregadas com PTNs, fármacos lipo e hidrofílicos e apresentando morfologias esféricas e superfícies lisas. Além disso, a adição de modificadores de superfície nas partículas podem auxiliar na obtenção de melhores eficiências de encapsulamento, liberação sustentada, mucoadesividade. O grande problema das técnicas de evaporação de solvente é a limitação tecnológica que ainda não permite a produção das partículas em larga escala.

5.3. Obtenção de pós-secos por *spray-drying*

Os *spray dryers* convencionais possuem um bico que atomiza apenas um único líquido de alimentação. A obtenção de partículas estáveis com dimensões menores e nano-agregados com AB íntegros e com propriedades de fluxo e aerolização adequadas utilizam-se *spray dryers* modificados.

A secagem por *spray drying* permite a obtenção de partículas carregadas com proteínas com alta eficiência de encapsulamento e mantendo a integridade das mesmas em muitos exemplos de partículas de PLGA carregadas com: albumina sérica bovina (MOK, 2008), PspA (ANISH, 2014) e lisozima (WAN, 2014).

O *spray dryer* de 3 fluidos (Figura 15) produz partículas revestidas do fármaco sem o encapsulamento em um carreador. Para isso, esse modelo possui 3 passagens para fluidos, onde uma suspensão do fármaco é introduzida pelo bico interno, uma solução do polímero para o revestimento é introduzida pelo bico externo, e a terceira é a passagem para o gás (SON, 2012).

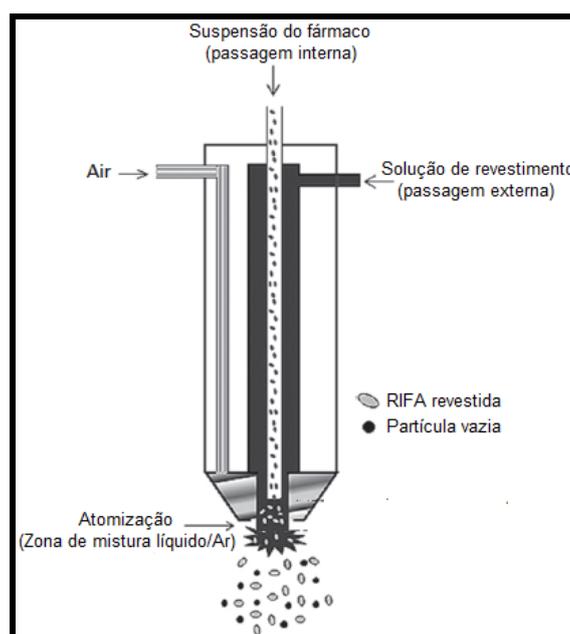


Figura 15 - Esquema do *spray dryer* de 3 fluidos: suspensão do fármaco, ar e polímero de revestimento (SON, 2012).

O spray dryer permite a produção de partículas com morfologias iguais as das partículas do fármaco em suspensão, no caso, uma estrutura laminar com superfície rugosa, diferente das partículas esféricas, com superfície lisa, obtidas normalmente pela alimentação de uma solução polímero/fármaco (ONOSHITA, 2010). O tamanho das partículas obtidas variaram entre 8 e 12 μm , tamanho superior as obtidas pelos convencionais de 2 μm aproximadamente (Figura 16) (SON, 2012 e ONOSHITA, 2010).

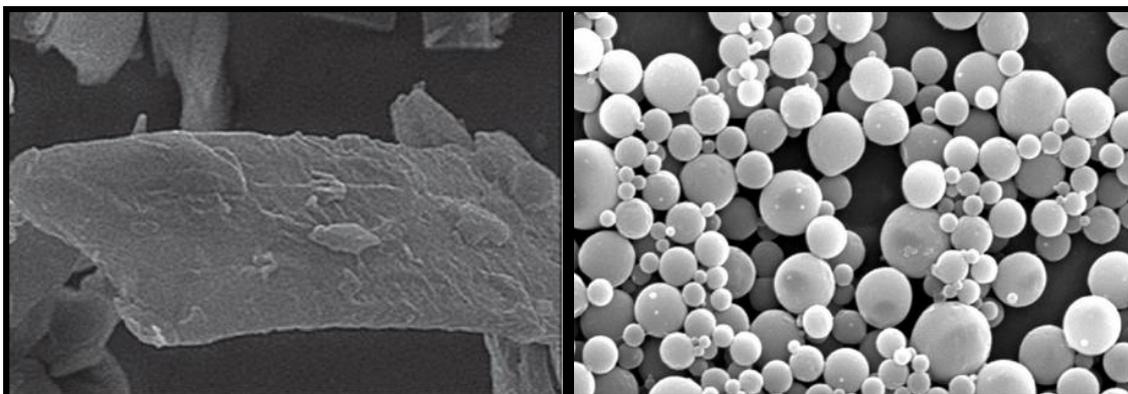


Figura 16 – Micrografias de MEV obtidas pelo spray dryer de 3 fluidos (SON, 2012) e de um *spray dryer* convencional (ONOSHITA, 2010).

O *spray dryer* de 4 fluidos (Figura 17) possui duas passagens para dois líquidos diferentes e duas para gases, permitindo assim que soluções aquosas e orgânicas contendo o AB e excipientes possam ser atomizadas ao mesmo tempo. Por exemplo, uma solução orgânica contendo o AB e o polímero e outra aquosa contendo excipientes hidrofílicos são atomizadas e secas juntas, permitindo obter nano-agregados com as características ideais de aerolização (OZEKI, 2006).

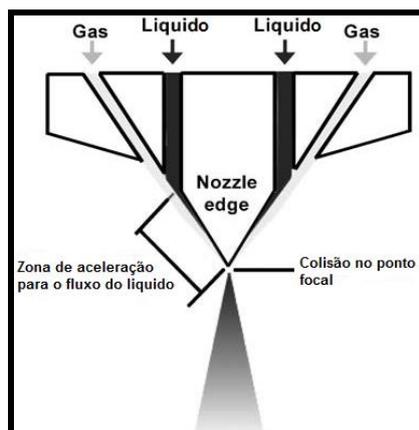


Figura 17 – Esquema do spray dryer de 4 fluidos (OZEKI, 2006).

Uma solução orgânica do polímero (PLGA) e uma solução aquosa de excipiente, como o manitol podem ser submetidas à secagem para obtenção de carreadores solúveis em água das micropartículas de PLGA (PLGA/MAN). O mesmo grupo utilizou esse equipamento para a obtenção de micropartículas de MAN contendo nanopartículas de PLGA carregadas com RIFA, conforme micrografias e esquema da figura 18 (OHASHI, 2009).

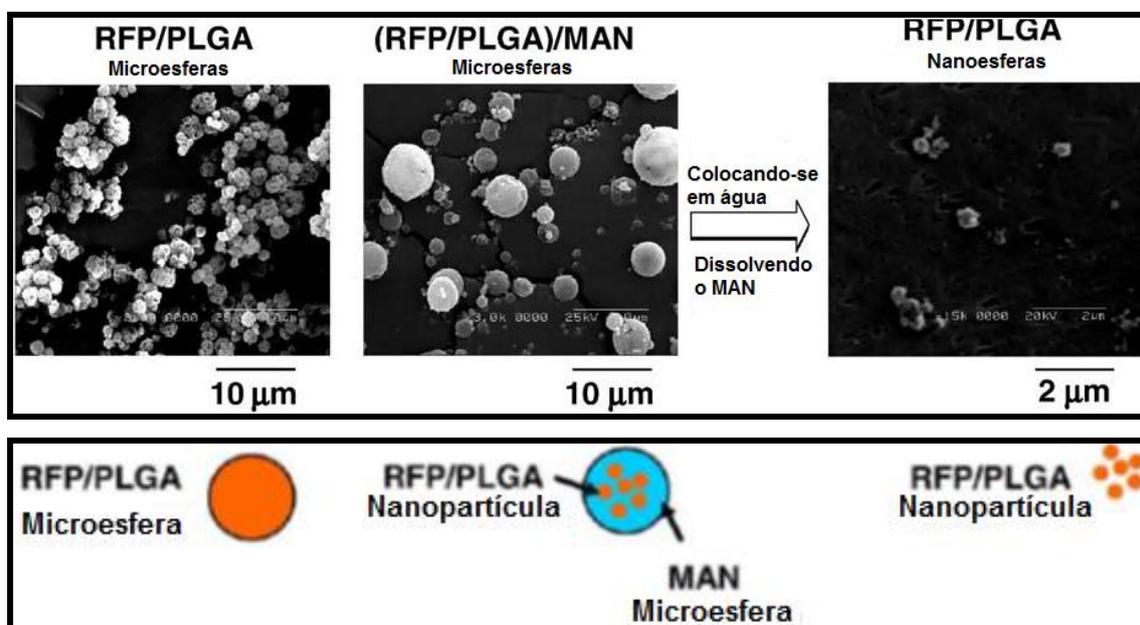


Figura 18 – Micrografias de MEV e esquema das micro e nano partículas RFP/PLGA, (RFP/PLGA)/MAN (OHASHI, 2009).

Outros excipientes, como o PEI também permitiu conferir características catiônicas às partículas (PLGA/MAN/PEI) que são usadas para entrega de DNA (OZEKI, 2006).

Muitas vezes, os *spray dryers* convencionais possuem como desvantagens, uma atomização insuficiente para atingir tamanhos de gotículas nanométricos. A utilização de *spray dryers* com atomização vibracional ajuda na quebra das gotículas e conseqüentemente após a secagem, obtém-se menores tamanhos de partículas. Os coletores eletrostáticos também são utilizados, pois permitem um maior rendimento do que quando utiliza-se o ciclone pelos *spray dryers* convencionais (figura 19) (BECK-BROICHSITTER, 2012 e FONTANA, 2014).

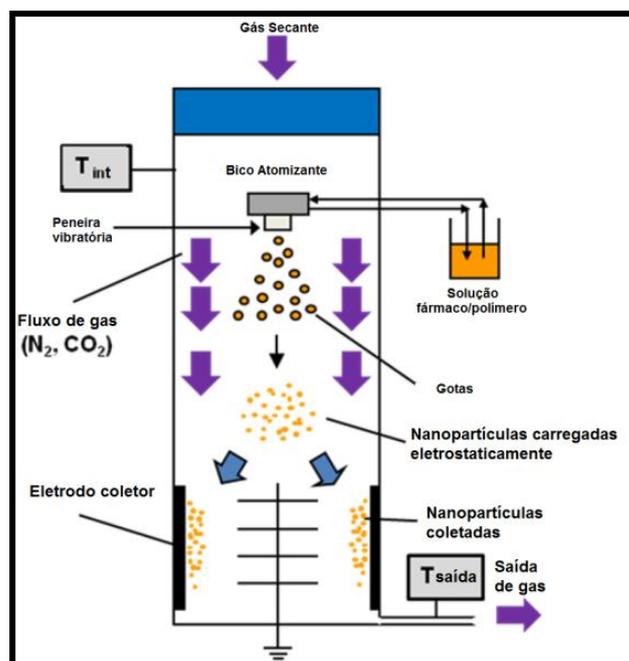


Figura 19 - Esquema de spray dryer com atomização vibracional e coletor de partículas carregadas (BABA, 2013).

O *spray freeze drying* (SFD) muitas vezes é utilizado para eliminar altas temperaturas, se tornando uma alternativa aos AB termoinstáveis. No processo de SFD, as gotículas atomizadas da suspensão de partículas são rapidamente congeladas em nitrogênio líquido seguido de liofilização dos cristais de gelo para produzir pós-secos de nano-agregados (figura 20).

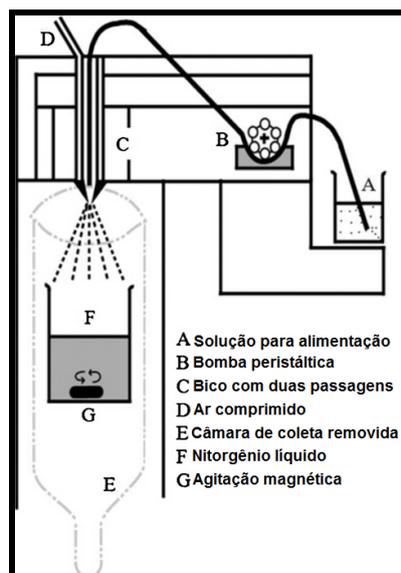


Figura 20 - Esquema do *spray freeze drying* (KHO, 2011).

As partículas produzidas por SFD normalmente apresentam d_G maiores que as produzidas por SD, pois a etapa de congelamento seguida de sublimação em SFD resulta em tamanhos de partícula comparáveis a gotícula inicial, ao contrário do SD que se baseia na evaporação da gotícula seguido de encolhimento das partículas. Além disso, as partículas obtidas por SFD são inerentemente porosas, isto é, com baixa densidade, devido à sublimação dos cristais no interstício das gotículas congeladas. Portanto, o SFD é adequado para a produção de agregados de nanopartículas com d_G alto e baixa densidade (KHO, 2011). Em uma adaptação de SFD, as nanogotículas formadas são congeladas em uma manta de resfriamento de nitrogênio líquido e, portanto, as partículas são congeladas durante o voo sem entrar em contato com o nitrogênio líquido (ALI, 2014).

5.3.1. Primária

A tabela 2 apresenta partículas obtidas por SD com o objetivo de encapsulamento de fármaco em matrizes poliméricas (primário).

Tabela 2 - Principais artigos publicados durante o período e os principais poliésteres utilizados na obtenção de partículas por *spray drying*.

Agente Bioativo	Polímero	Excipientes	Objetivo	Referência
Fluconazol	PLGA	-	Primário	RIVERA, 2004
Rifampicina	PLGA	-	Primário	TOMODA, 2005
-	PLGA	Manitol PEI	Primário	OZEKI, 2006
Rifabutina Isoniazida	PLA	-	Primário	MUTTIL, 2007
pDNA	PLGA	Manitol PEI DOTMA DC-Col CTAB	Finalística	TAKASHIMA, 2007
Albumina	PLGA	-	Primário	SIVADAS, 2008
IgG	PLGA	Lactose Leucina	Primário	KAYE, 2009
Rifampicina	PLGA	Manitol	Primário	OHASHI, 2009
Salbutamol Beclometasona	PLGA	-	Primário	LEAROYD, 2010
Rifampicina	PLGA	-	Primário	ONOSHITA, 2010
Fluoresceína	PGA-co-PDL	-	Primário	TAWFEEK, 2011
Óxido Nítrico	PLGA	-	Primário	VERMA, 2012
Rifampicina	PLA PLGA	-	Primário	SON, 2012
Ofloxacina	PLA	-	Primário	PALAZZO, 2013
Rifampicina	PLGA	-	Primário	HIROTA, 2013
DNAase I	PEG-co-(PGA- co-PDL)	-	Primário	TAWFEEK, 2013a
Diclofenaco	PEG-co-(PGA- co-PDL)	-	Primário	TAWFEEK, 2013b
DNAase I	PLGA	Leucina Lactose Ciclodextrina Polivinilpirrolidona Ovalbumina	Primário	OSMAN, 2013
Salbutamol Budesonida	PLGA	-	Primário	JAIN, 2013
Cetiofur	PLGA	-	Primário	ZHIHUI, 2013
Dexametasona	PCL	-	Primário	FONTANA, 2014

Siglas: poli(ácido láctico) (PLA); poli(ácido glicólico) (PGA); poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA); poli(caprolactona) (PCL), poli(álcool vinílico) (PVA); polietilenoglicol (PEG); poli(gliceroladipato-co-pentadecalactona) (PGA-co-PDL).

Diferentes bioativos podem ser encapsulados, como antibióticos, anti-inflamatórias, PTNs e DNA diretamente a partir soluções, emulsões e suspensões dos polímeros PLGA, PCL e PEG-co-(PGA-co-PDL).

A obtenção de partículas carregadas com ABs a partir de soluções do fármaco antituberculostáticos com o polímero em solvente orgânico (diclorometano, acetonitrila) submetidas à secagem por SD produz micropartículas de 2 a 5 µm,

tamanho ideal para captação pelos macrófagos, alvo da terapia contra a TB (ONOSHITA, 2010; MUTTIL, 2007; TOMODA, 2005; PALAZZO, 2013).

A obtenção de micropartículas de PLGA com dimensões de 7 a 14 μm foram produzidas a partir de soluções orgânicas com diferentes concentrações de fluconazol, fármaco hidrofílico, em concentrações constantes de PLGA. O tamanho das micropartículas pode ser modulado pela concentração de fármaco ou pela MM do polímero. Conforme aumenta-se a concentração do fármaco ou a MM, maior o tamanho das micropartículas. O aumento da hidrofiliabilidade do polímero e conseqüentemente a cristalinidade, aumenta o tamanho das partículas. O aumento do tamanho nesses casos está relacionado à maior viscosidade da solução de alimentação que impede a força mecânica de quebrar as gotas em gotículas maiores.

A obtenção de partículas de PCL demonstrou ser bastante influenciada pela concentração de PCL na fase O. O tamanho de partículas de aproximadamente 1 μm não foi influenciado pelo aumento da concentração de PCL, mas observou-se que esse aumento causou maior dificuldade de desaglomeração das partículas, o que dificultou o controle na liberação da dexametasona. As partículas com menor concentração de polímero apresentaram menor tendência de aglomeração facilitando o controle da liberação (FONTANA, 2014).

A obtenção de micropartículas de PLGA, PCL carregadas com PTNs mantendo a integridade da PTN é realizada com sucesso em diversos exemplos. Micropartículas de PLGA carregadas com albumina, proteína modelo, apresentaram d_G de 5,5 μm , densidade 0,11 g/cm^3 e d_A de 1,82 μm com superfície lisa e morfologia esférica (figura 21), propriedades ótimas para deposição no trato respiratório inferior (SIVADAS, 2008).

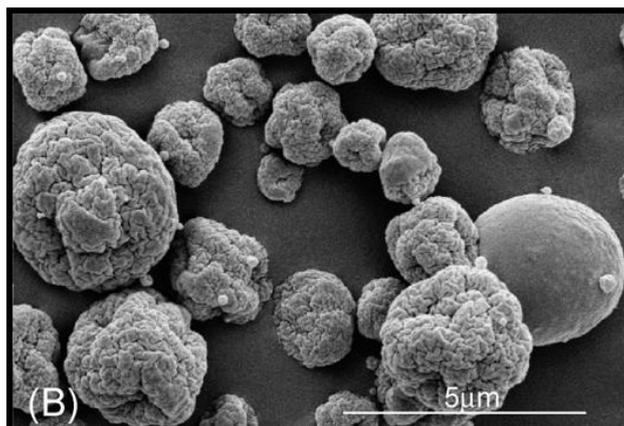


Figura 21 – Micrografias de MEV das micropartículas de PLGA (SIVADAS, 2008).

As micropartículas foram fabricadas a partir de emulsão A/O. A fase aquosa contendo albumina foi emulsionada na fase orgânica de diclorometano e PLGA, usando-se Tween 20 como surfactante, e submetida à secagem por SD. A eficiência de encapsulamento foi de 62%, mais baixa que para os polímeros hidrofílicos, como o alginato, e a integridade da PTN foi mantida durante o processo (SIVADAS, 2008).

Além da albumina, foram obtidas micropartículas de PLGA carregadas com a enzima DNAase a partir da secagem de duplas emulsões (A/O/A) com a utilização de excipientes hidrofílicos. As micropartículas produzidas apresentam morfologias esféricas, tamanhos de partícula entre 2,5 e 6,4 µm dependendo dos excipientes utilizados e eficiência de encapsulamento de 63% (OSMAN, 2013). Também foram obtidas micropartículas de PEG-co-(PGA-co-PDL) carregada com quimiotripsina com morfologias esféricas, tamanhos de partícula de 1 a 2 µm e eficiência de encapsulamento de 12-25% (TAWFEEK, 2013).

Conclui-se que a utilização do SD permitiu a obtenção de micropartículas majoritariamente, porém com capacidades de aerolização ideais para a deposição no pulmão. Por outro lado, mesmo que a utilização de excipientes na secagem primária por SD não seja tão comum, foram utilizados íons divalentes, ovalbumina, cilcodextrinas e lactose que permitem modular a morfologia e tamanho das partículas, a eficiência de encapsulamento e o perfil de liberação. A manutenção da integridade de PTNs faz com que essa técnica

seja utilizada, porém com a limitação de que a eficiência de encapsulamento de PTNs é baixa.

5.3.2. Finalística

A tabela 3 apresenta a obtenção de partículas por SD a partir suspensões de nanopartículas de PLGA e PCL carregadas com fármacos, PTNs e DNA obtidas previamente por evaporação de solvente. São preparadas suspensões de partículas que são submetidas à secagem com a utilização de excipientes, como o manitol, leucina, lactose, ciclodextrinas, para a obtenção de nano-agregados com propriedades físico-químicas ideais para a deposição pela via inalatória.

Tabela 3 - Principais artigos publicados durante o período e os principais poliésteres utilizados na obtenção de partículas por *spray drying*.

Agente Bioativo	Polímero	Excipientes	Objetivo	Referência
Levofloxacina	PCL	Leucina Manitol Lactose	Finalística	KHO, 2010
Insulina	PLGA	Manitol	Finalística	HAMISHEHKAR, 2010
Levofloxacina	PCL	-	Finalística	CHEOW, 2010
Antígeno hepatite B	PLGA/PEG	-	Finalística	MUTTIL, 2010
SiRNA	PLGA	-	Finalística	JENSEN, 2010
Levofloxacina	PCL	-	Finalística	KHO, 2011
Levofloxacina	PCL	Lactose Manitol Leucina PVA	Finalística	CHEOW, 2011
-	PLGA	Manitol Lactose Ciclodextrina	Finalística	LEBHARDT, 2011
Levofloxacina	PLGA	PVA Leucina	Finalística	CHEOW, 2011
Sildenafil	PLGA	-	Primário	BECK-BROICHSITTER, 2012
SiRNA	PLGA	DOTAP	Finalística	JENSEN, 2012
Trobramicina	PLGA	Lactose	Finalística	UNGARO, 2012
Claritromicina	PLGA	Lactose Manitol Leucina	Finalística	MOGHADDAM, 2013
-	PLGA	Maltodextrina	Finalística	ALI, 2014

Siglas: poli(ácido láctico) (PLA); poli(ácido glicólico) (PGA); poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA); poli(caprolactona) (PCL), poli(álcool vinílico) (PVA); polietilenoglicol (PEG).

O SD permite obter nano-agregados com boa redispersabilidade das nanopartículas após a deposição adequada das partículas. O objetivo finalístico garantiu aos nano-agregados diâmetros, morfologias e densidades ideais para uma aerolização adequada das partículas. A utilização de excipientes é fundamental para atingir as propriedades de fluxo e aerolização adequadas e por isso é mais utilizada que o SD com objetivo primário.

O spray drying de nanopartículas de PCL leva a degradação do polímero e formação de filmes. A utilização de manitol permite a obtenção de nano-agregados, porém com alta coesão, dificultando a dispersão das nanopartículas posteriormente. A adição de leucina, excipiente hidrofóbico, e manitol diminui a força de coesão, porém a dispersão leva a coalescência das

partículas. A combinação de lactose e leucina em concentrações adequadas permitiu produção de nano-agregados com d_G ótimos para a deposição e também passíveis de dispersão (KHO, 2010). O *spray freeze drying* permite a obtenção de nano-agregados com leucina e manitol com maior estabilidade, porém alta polidispersão na distribuição de tamanho de partícula (KHO, 2011). O PVA e o manitol foram os melhores excipientes para proteger as partículas durante o congelamento e também os que mais facilitaram a dispersão dos nano-agregados (CHEOW, 2011).

A via pulmonar também foi objeto de estudo para a liberação de sildenafil, fármaco utilizado em hipertensões pulmonares graves, de partículas de PLGA. Os resultados mostraram que ocorreu a deposição no pulmão nas partículas de 1 μm e os estudos de liberação mostraram uma liberação sustentada do sildenafil durante um período de 5 horas, sendo interessante para a diminuição na frequência de doses (BECK-BROICHSITTER, 2012).

5.4. Comportamento das partículas *in vitro* e *in vivo*

Após a caracterização das partículas, o comportamento das partículas *in vitro* e *in vivo* utilizadas na via inalatória é avaliado. Dependendo da doença, alvo terapêutico e local de ação, são avaliadas a capitação por determinado tipo celular, penetração pelo endotélio alveolar,

- Capitação pelos macrófagos;
- Passagem por células epiteliais pulmonares do tipo CaLu 3;
- Aerolização.

A capitação por macrófagos de micropartículas de PLGA (2 μm), nano-agregados (PLGA/MAN) (3,1 μm) e nanopartículas (360 nm) de PLGA carregadas com cumarina, usado como marcador de fluorescência ao invés da RIFA mostrou a importância do tamanho das partículas para capitação. Em

estudos *in vitro*, as micropartículas apresentam captação 3,5 vezes maior que as nanopartículas, demonstrando que as nanopartículas conseguem fugir do sistema imune (OHASHI, 2009). Aproximadamente 80% das micropartículas de PLGA de 2 μm endocitadas pelos macrófagos se localizam nos lisossomas por até uma semana após a administração (ONOSHITA, 2010). Em estudos *in vivo*, a captação das micropartículas foi bem pequena (menor que 2%), enquanto que os nano-agregados (PLGA/Manitol) apresentaram captação de 9% após a administração (OHASHI, 2009).

A deposição dos nano-agregados no estágio 7 do impactador, correspondente aos alvéolos, foi cerca de 9% maior no PLGA/MAN comparando-se com as micropartículas de PLGA, indicando a melhor performance aerossol quando utilizam-se excipientes para garantir o d_A ideais (OHASHI, 2009).

A figura 22 mostra que as micropartículas de PLGA acumularam-se no pulmão após 5 minutos e após 1 hora tenderam a se localizar na traqueia, provavelmente devido ao sistema mucociliar. Já os nano-agregados PLGA/MAN depositaram-se no pulmão após até 1 hora, sendo observados após até 12h da administração. O manitol se dissolve rapidamente e as nanopartículas de PLGA se dispersam e se depositam no pulmão, ficando suscetíveis a captação pelos macrófagos (OHASHI, 2009).

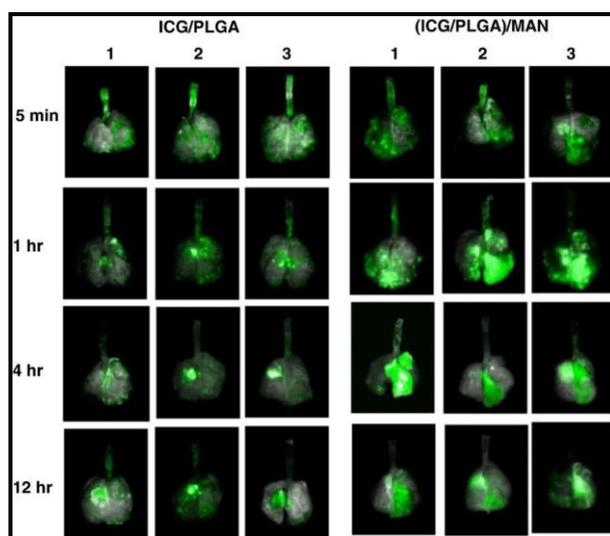


Figura 22 – Imagens fluorescentes *in vivo* do pulmão de ratos após administração com as microesferas ICG/PLGA e (ICG/PLGA)/MAN (OHASHI, 2009).

A utilização de nano-agregados com nanopartículas de PLGA e nanopartículas modificadas com DOTAP (características catiônicas) de PLGA carregadas com siRNA mostrou que houve uma melhora no silenciamento de genes em estudo *in vitro.*, mostrando que a transfecção de gene foi realizada com sucesso. O silenciamento foi maior conforme foi aumentando-se a concentração de DOTAP em células de carcinoma de pulmão do tipo H1299, abrindo uma nova possibilidade de tratamento para câncer de pulmão. Porém, o silenciamento ainda foi menor que com o lipofectamina 2000m, reagente de transfecção comercial (JENSEN, 2010 e JENSEN, 2012).

O encapsulamento de DNAase I em nanopartículas de PLGA com superfície modificadas com PGA e dextrina mostraram alta atividade mucolítica em escarro de fibrose cística, sendo promissor para o tratamento da fibrose cística (OSMAN, 2013).

6. CONCLUSÕES

A utilização de partículas de poliésteres para via inalatória vem atraindo cada vez mais o interesse da Indústria Farmacêutica.

A produção de pós-secos baseados em partículas de poliésteres carregadas com propriedades aerodinâmicas adequadas para deposição nos alvéolos é realizada com sucesso pela secagem por *spray drying*.

Os poliésteres demonstram ser bastante versáteis para a utilização na área biomédica, pois além de serem biodegradáveis e biocompatíveis, permitem a obtenção de partículas carregadas de proteínas, diversas classes de fármacos, proteínas, DNA, RNA e toxóides para utilização desde vias de administração mais simples, como a oral, até vias mais complexas, como a pulmonar e a parenteral.

O encapsulamento de fármacos hidro e lipofílicos em partículas com características físico-químicas e propriedades aerodinâmicas adequadas é realizado com sucesso. O comportamento *in vitro* e *in vivo* mostram que a deposição, a captação por macrófagos e células alvo e repostas fisiológicas a essas partículas permitem que sejam utilizadas para aumentar a eficácia do tratamento de doenças, como a tuberculose, melhorando a adesão do paciente ao tratamento.

O encapsulamento de proteínas, DNA e RNA em partículas, é realizado mantendo a integridade do AB. As partículas apresentam respostas interessantes para utilização no tratamento de local de patologias, como a fibrose cística, porém estudos de absorção para ação sistêmica ainda não são realizados.

Os métodos de evaporação de solvente para obtenção principalmente de nanopartículas é realizado com sucesso, mas ainda são limitados em larga escala e o desenvolvimento de novas tecnologias se fazem necessárias para se chegar à escala industrial.

Assim, fica demonstrado que o investimento na tecnologia de *spray drying* para a obtenção de sistemas particulados de poliésteres é promissor e pode levar a tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais para doenças com que ainda não possuem um tratamento adequado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S., ET AL. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2004) 22, 3, 127-144.

ALI, M.E., LAMPRECHT, A. Spray freeze drying for dry powder inhalation of nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2014) in press.

ANDRADE-LIMA, M. ET AL. Equivalência farmacêutica da formulação combinada de budesonida e formoterol em cápsula única com dispositivo inalador de pó. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* (2012) 38, 6, 748-756.

ANISH, C. ET AL. Influences of process and formulation parameters on powder flow 2 properties and immunogenicity of spray dried polymer particles 3 entrapping recombinant pneumococcal surface protein A. *International Journal of Pharmaceutics* (2014) in press.

ALLEN, L.V. *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 9ª ed. 710 páginas.

BABA, K.; NISHIDA, K. Steroid Nanocrystals Prepared Using the Nano Spray Dryer B-90. *Pharmaceutics* (2013) 5, 107-114.

BECK-BROICHSITTER, M. ET AL. Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonar drug delivery. *Journal of Controlled Release* (2012) 158, 2, 329–335.

BRASIL. *Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos*, 1ª Edição / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

CARLOS, C.I.A. *Preparações para inalação avaliação aerodinâmica das partículas finas* / por Carla Isabel Amante Carlos. 2002. Porto. 128p.

CARRYN, S. ET AL. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infectious Disease Clinics of North America* (2003) 17, 615–634.

CHEOW, W.S., HADINOTO, K. Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* (2010) 370, 79–86.

CHEOW, W.S. ET AL. Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: Effect of freeze-drying adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics* (2011) a 404, 289–300.

CHEOW, W.S., CHANG, M.W., HADINOTO, K. The roles of lipid in anti-biofilm efficacy of lipid–polymer hybrid nanoparticles encapsulating antibiotics. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* (2011) b 389, 158–165.

FARAJI, A.H., WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009) 17, 2950–2962.

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* (2014) 258, 49–59.

FREDENBERG, S. ET AL. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics* (2011) 415, 34–52.

GARCIA, A.Q.R. ET AL. Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculadoem sachê. *Rev. Bras. Farm.* (2012) 93(4), 469-475.

GUTERRES, S.S. ET AL. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. *Brazilian Journal of Physics* (2009) 39, 1A.

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

HICKEY, A.J. *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*. 2a ed. 2003. 288 páginas.

HIROTA, K. ET AL. Distribution and deposition of respirable PLGA microspheres in lung alveoli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2013) 105, 92– 97.

IUPAC. <http://old.iupac.org/reports/1996/6812jenkins/substances.html>. Acceso: 25/06/2014.

JENSEN, D.M.K. ET AL. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *Journal of Controlled Release* (2010) 142, 138–145.

KAYE, R.S. ET AL. Simultaneously Manufactured Nano-In-Micro (SIMANIM) Particles for Dry-Powder Modified-Release Delivery of Antibodies. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* (2009) 98, 11.

KHO, K. ET AL. Aqueous re-dispersibility of spray-dried antibiotic-loaded polycaprolactone nanoparticle aggregates for inhaled anti-biofilm therapy. *Powder Technology* (2010) 203, 432–439.

KHO, K.; HADINOTO, K. Optimizing aerosolization efficiency of dry-powder aggregates of thermally-sensitive polymeric nanoparticles produced by spray-freeze-drying. *Powder Technology* (2011) 214, 169–176.

KOLESKE, J.V. Blends containing poly(ϵ -caprolactone) and related polymers. In: Paul, D.R., Newman, S. (Eds.), *Polymer Blends*, vol. 2. Academic Press, New York, 1978 pp. 369–389.

KRANZ, H., UBRICH, N., MAINCENT, P., BODMEIER, R.. Physicomechanical properties of biodegradable poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)

films in the dry and wet states. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2000) 89, 1558–1566.

LOYD V., ALLEN JR, NICHOLAS G. POPOVICH, HOWARD C. ANSEL. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 9th edition (2011).

JAIN, D.P. ET AL. Pharmacokinetic Study of Dry Powder Inhaler Formulations of Antiasthmatic Drugs. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* (2013) 23, 2, 51, 319-327.

JANSEN, D.K. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *Journal of Controlled Release* (2010) 142 138–145.

JANSEN, D.K. ET AL. Design of an inhalable dry powder formulation of DOTAP-modified PLGA nanoparticles loaded with siRNA. *Journal of Controlled Release* (2012) 157 141–148.

LEAROYD, T.P. ET AL. Sustained delivery of salbutamol and beclometasone from spray-dried double emulsions. *Journal of Microencapsulation*, 2010; 27, 2, 162–170.

LEBHARDT, T. ET AL. Surfactant-free redispersible nanoparticles in fast-dissolving composite microcarriers for dry-powder inhalation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2011) 78, 90–96.

MAKADIA, H.K. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* (2011) 3, 3 1377-1397.

MALVERN a. <http://www.malvern.com/br/products/measurement-type/zeta-potential/>. Acesso: 25/06/2017

MALVERN b. <http://www.malvern.com/br/products/technology/laser-diffraction/default.aspx>. Acesso: 25/06/2017.

MANO, E.B. ET AL. *Introdução a polímeros*. Eloisa Biasotto Mano, Luís Cláudio Mendes. - 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MARIAPPAN, T.T, SINGH, S. Positioning of rifampicin in the Biopharmaceutics Classification System (BCS). *Clin. Res. Regul. Aff.* (2006) 23, 1–10.

Memento Terapêutico. Farmanguinhos comprimido 300 mg de rifampicina, 2006.

MOGHADDAN, P.H. ET AL. Development of a nano–micro carrier system for sustained pulmonary delivery of clarithromycin. *Powder Technology* (2013) 239, 478–483.

MOK, H.; PARK, T.G. Water-free microencapsulation of proteins within PLGA microparticles by spray drying using PEG-assisted protein solubilization technique in organic solvent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008) 70, 137–144.

MUTTIL, P., ET AL. Immunization of Guinea Pigs with Novel Hepatitis B Antigen as Nanoparticle Aggregate Powders Administered by the Pulmonary Route. *The AAPS Journal* (2010) 12, 3.

O'HARA, P. and HICKEY, A. J. Respirable PLGA microspheres for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization. *Pharmaceutical Research* (2000) 17, 955–961.

OHASHI, K. ET AL. One-step preparation of rifampicin/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis. *Journal of Controlled Release* (2009) 135, 19–24.

ONOSHITA, T. ET AL. The behavior of PLGA microspheres containing rifampicin in alveolar macrophages. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2010) 76, 151–157.

OSMAN, R. ET AL. Inhalable DNase I microparticles engineered with biologically active excipients. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2013) 26, 700–709.

OZEKI, T. ET AL. Preparation of Polymeric Submicron Particle-Containing Microparticles Using a 4-Fluid Nozzle Spray Drier. *Pharmaceutical Research* (2006) 23, 1, 177–183.

PALAZZO, F. ET AL. Development of a spray-drying method for the formulation of respirable microparticles containing ofloxacin–palladium complex. *International Journal of Pharmaceutics* (2013) 440, 273– 282.

PATHAK, Y.; THASSU, D. *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. Livro 1ª edição (2009).

PARVEEN, S. ET AL. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging (2012) 8, 2, 147-66.

PEREIRA, E.D. Síntese, preparo e caracterização nanocompósito PLGA/maghemita para a liberação controlada do cotrimoxazol/ Emiliane Daher Pereira. 2012. 73 folhas

PHILLIPS, M.A.; GRAN, M.L; PEPPAS, N.A. Targeted nanodelivery of drugs and diagnostics. *Nano Today* (2010) 5, 143–159.

RÉ, M.I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Drying Technology* (2006) 24, 433–446.

RIVERA, P.A. ET AL. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *Journal of microencapsulation* (2004)21, 2, 203-211.

ROWE, R.C. ET AL. *HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS*. 6ª ed. 2009. 888 páginas.

SANSDRAP, P., MOËS, A.J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* (1997) 43, 47–58.

SILVA-JÚNIOR, A.A. ET AL. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochimica Acta* (2008) 467, 91–98.

SILVA-JÚNIOR, A.A. ET AL. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *International Journal of Pharmaceutics* (2009) 368, 45–55.

SINHA, V.R., TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release* (2003) 90, 261–280.

SIVADAS, N. ET AL. A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins. *International Journal of Pharmaceutics* (2008) 358, 159–167.

SOPPIMATH, K.S. ET AL. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* (2001) 70, 1–20.

SON, Y-J., ET AL. Preparation of sustained release rifampicin microparticles for inhalation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2012) 64, 1291–1302.

SOUTO, E. B. ET AL. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte II. *Polímeros* (2012) 22, 1, 101-106.

TAKASHIMA, Y. ET AL. Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. *International Journal of Pharmaceutics* (2007) 343, 262–269.

TAWFEEK, H.M ET AL. Poly(Glycerol Adipate-co- ω -Pentadecalactone) Spray-Dried Microparticles as Sustained Release Carriers for Pulmonary Delivery. *Pharm Res* (2011) 28:2086–2097.

TOMODA, K. ET AL. Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2005) 45, 1–6.

UNGARO, F. ET AL. Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *Journal of Controlled Release* (2012) 157, 149–159.

WAN, F. ET AL. One-Step Production of Protein-Loaded PLGA Microparticles via Spray Drying Using 3-Fluid Nozzle. *Pharmaceutical Research* (2014) in press.

VEHRING, R.; FOSS, W.R.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. *Aerosol Science* (2007) 38, 728–746.

VEHRING, R. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharmaceutical Research* (2008) 25, 5, 999–1022.

VERMA, R.K. ET AL. Inhalable Microparticles Containing Nitric Oxide Donors: Saying NO to Intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Pharmaceutics* 2012, 9, 3183–3189.

ZHIHUI, H. Preparation of PLGA Ceftiofur Hydrochlorate Lungtargeted Microsphere with Spray Drying Process. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci.* (2013).