

Georgia Kasten

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO AZITROMICINA PARA LIBERAÇÃO PULMONAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kasten, Georgia

Desenvolvimento de micropartículas poliméricas contendo
azitromicina para liberação pulmonar / Georgia Kasten ;
orientadora, Elenara Lemos-Senna - Florianópolis, SC, 2014.
153 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Micropartículas. 3. Administração
pulmonar. 4. Azitromicina. 5. Dupla emulsão. I. Lemos-
Senna, Elenara. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

*Dedico este trabalho à minha família: Marcos,
Soneli, Catarina e Rafael.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz, força e saúde.

Aos meus pais, Marcos e Soneli, por todo o apoio, carinho, conselhos e incentivo dados ao longo dos anos. Sem eles nada seria possível! Agradeço também à minha irmã Catarina e à minha avó Carmen, pelo pensamento positivo e compreensão, mesmo à distância.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Elenara Lemos Senna, muito obrigada pela oportunidade, confiança e paciência. Obrigada também por estar sempre presente, pela atenção e sabedoria.

Ao meu amigo Luis Felipe, por todo o apoio, troca de idéias, amizade e puxões de orelha!

Ao pessoal do laboratório, Mariana, Clarissa, Thaisa, Janaína, Letícia, Geci, Talitha, Bárbara, Priscila, pelos momentos de descontração e muito café. Em especial aos meus companheiros de mestrado, Mari e André, pelas risadas e companhia em várias disciplinas cursadas.

Aos amigos do laboratório de controle de qualidade, Camila, Cinira, Andréa, Cassiana, Rafael, Ana Carol, Manuela, pela ajuda em experimentos, otimismo e pela amizade. Agradeço também às professoras Simone Gonçalves Cardoso e Sílvia Cuffini pela simpatia e conselhos quanto ao projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro pela colaboração e disponibilidade no LDRX/UFSC.

Aos técnicos do LCME/UFSC, Renata e Luciano, pelas várias análises no MEV. E também ao Demétrio, do LAMEB/UFSC, pelo auxílio com o criostato.

Aos funcionários do departamento, Sandra, Nilson e Solange.

E agradeço também, em especial, ao “Fofuxo” Rafael Brazão, meu noivo, amigo e professor, por toda a cumplicidade, dedicação, compreensão e carinho. Agradeço por estar sempre presente nos momentos bons e ruins.

Muito obrigada!

*"(...) mas também nos gloriamos nas tribulações, sabendo que a tribulação produz a paciência, e a paciência a experiência, e a experiência a esperança."
Romanos 5:3-4*

RESUMO

A pneumonia comunitária (PAC) é apontada pela Organização Mundial da Saúde como uma das maiores causas de morbimortalidade no mundo, principalmente entre crianças e idosos, sendo a causa de 2 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos a cada ano. Sistemas microestruturados contendo azitromicina para inalação podem ser considerados uma estratégia promissora para o tratamento de infecções do trato respiratório como a PAC, visto que concentrações terapêuticas podem ser alcançadas diretamente no local de ação, com redução da distribuição sistêmica e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais indesejáveis. Entretanto, pós para inalação devem apresentar características de tamanho e densidade adequados para que concentrações terapêuticas efetivas alcancem os pulmões. Neste sentido, o diâmetro aerodinâmico médio mássico (DAMM) é considerado o parâmetro mais confiável para prever o comportamento das partículas inaladas. Neste trabalho micropartículas poliméricas contendo azitromicina foram obtidas através da técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente (A/O/A) a partir da policaprolactona para a liberação pulmonar. Agentes porogênicos foram testados a fim de produzir pós com densidade aparente reduzida. Um delineamento estatístico fatorial 2^3 foi empregado para avaliação de parâmetros de formulação sobre as características finais das partículas. Os fatores estudados foram: volume de fase orgânica (5 e 25 mL), pH (6 e 10) e saturação da fase aquosa secundária com solvente orgânico (sem e com saturação). As micropartículas obtidas apresentaram-se na forma de um pó branco e fino, com teor variando entre 3,5 e 23,1 % (m/m), e eficiência de encapsulação entre 9,4 e 61,5%. As formulações preparadas com menor volume de fase orgânica apresentaram maiores teores de azitromicina, sendo que estes valores foram estimados através de reação colorimétrica com a alizarina, desenvolvida neste trabalho. A saturação da fase aquosa teve efeito negativo sobre o teor. O diâmetro geométrico médio das partículas variou entre 4,0 e 15,4 μm , e baixos valores de span foram obtidos. As densidades aparente e compactada exibiram valores bastante reduzidos, abaixo de 0,2 g/mL, e o fluxo dos pós foi caracterizado como sendo bom a excelente, conforme índice de Carr. A MEV evidenciou que partículas esféricas e de superfície lisa e com ausência de poros foram obtidas. Entretanto, as fotomicrografias obtidas após

criosecção das partículas revelou uma estrutura interna “oca”, o que provocou a redução da densidade das mesmas. O DAMM foi calculado após determinação da densidade esquelética das partículas por picnometria, evidenciando diâmetros aerodinâmicos entre 2,3 a 8,9 μm . A simulação dos perfis de deposição pulmonar realizado com auxílio do software MPPD (v2.11) mostrou que as formulações MPD 5, 6 e 8 apresentaram as maiores frações de partículas depositadas nas regiões mais profundas dos pulmões. A análise térmica das micropartículas indicou a existência de interações entre fármaco e polímero e a análise de difração de raios-x mostrou que algumas formulações apresentavam fármaco na sua forma cristalina. O perfil de liberação da azitromicina a partir das micropartículas foi lento para todas as formulações, alcançando um platô de liberação após 12 horas de ensaio. Entretanto, os valores de eficiência de dissolução variaram de 34,0 a 63,9% de acordo com a formulação testada. A liberação da azitromicina seguiu o modelo cinético de Higuchi, indicando que a liberação do fármaco ocorreu por um mecanismo de difusão através da matriz polimérica. O conjunto dos resultados mostrou que o sistema desenvolvido é adequado para administração pulmonar da azitromicina visando o tratamento de PAC.

Palavras-chave: micropartículas, administração pulmonar, azitromicina, dupla emulsão

ABSTRACT

Title: Development of azithromycin-loaded polymeric microparticles for pulmonary delivery

Community-acquired pneumonia (CAP) has been considered by WHO as one of the biggest causes of morbimortality in the world, especially among children and the elderly, causing the death of 2 million children under 5, every year. Azithromycin-loaded microparticles for inhalation into the lungs may be considered as an interesting approach to treat respiratory tract infections such as CAP, since therapeutic concentrations may be reached directly on the site of action, reducing the drug systemic distribution, and consequently, the drug adverse effects. However, inhaled powders must display suitable characteristics of particle size and bulk density, in order to achieve effective therapeutic concentrations in the lungs. In this context, the mass mean aerodynamic diameter (MMAD) is believed to be the most reliable parameter to predict the behavior of inhaled particles. In this study, azithromycin-loaded polycaprolactone microparticles intended for pulmonary delivery were prepared by the double emulsion/evaporation technique. Porogenic agents were tested with the aim to obtain powders displaying low bulk densities. A factorial 2³ design was used to evaluate the effect of formulation parameters on the final properties of the particles. The studied factors were the volume of the organic phase (5 or 25 mL), pH (6 or 10) and saturation of the secondary aqueous phase with the organic solvent (with or without). The resulting microparticles appeared as a fine white powder with azithromycin loading varying from 3.5% to 23.1% (w/w) and encapsulation efficiency varying from 9.4% to 61.5%. Formulations prepared with the lower organic phase volume displayed higher loading values of drug. The saturation of the aqueous phase had a negative effect on drug loading. The mean geometric diameter of the particles ranged from 4.0 μm to 15.4 μm and low span values were obtained. Bulk and tapped densities were lower than 0.2 g/mL and powder flows were classified as good or excellent, according to the Carr's index. The SEM micrographs showed spherical particles with smooth surface, without pores. On the other hand, a hollow inner structure was visualized in the micrographs taken after cryosection of the particles, which, in turn, may explain the reduced values of bulk density mentioned above. The MMAD was calculated after determining the skeletal density of

the particles by pycnometry, and aerodynamic diameters varying from 2.3 μm to 8.9 μm were obtained. Pulmonary deposition profiles were simulated using the MPPD (v2.11) software. The results indicated the highest deposition of particles in the deeper lung regions occurred for formulations MPD 5, 6, and 8. The thermal analysis of the microparticles indicated the existence of drug-polymer interactions and the powder x-ray diffraction analysis evidenced the presence of the drug in its crystalline form in some formulations. The drug release profiles revealed slow release rates for all formulations tested, reaching a drug release plateau after 12 hours of assay. However, the dissolution efficiency values ranged from 34.0% to 63.9%. The azithromycin releasing from microparticles followed the Higuchi's kinetic model, indicating that the release occurred by a diffusion mechanism of the drug through the polymeric matrix. The results taken together indicated that the azithromycin-loaded microparticles developed in this study may be useful for treating the PAC by pulmonary route.

Key-words: microparticles, pulmonary drug delivery, azithromycin, double emulsion/evaporation method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de pneumonias em crianças menores de 5 anos, por país.	39
Figura 2. Estrutura química da azitromicina.....	41
Figura 3. Anatomia das vias respiratórias.....	43
Figura 4. Esquema representativo das células em diferentes regiões do trato respiratório.....	44
Figura 5. Deposição de partículas no trato respiratório.....	47
Figura 6. Perfil de deposição das partículas no trato respiratório conforme tamanho.....	49
Figura 7. Funcionamento de um inalador de pó seco.....	51
Figura 8. Administração pulmonar de fármacos através de DPI. ...	54
Figura 9. Formação de poros em micropartículas poliméricas. Em (A) lixiviação de sais; (B) formação de gás (agente efervescente); (C) indução osmótica.....	57
Figura 10. Reação de síntese do PCL.	59
Figura 11. Processo de biodegradação do PCL.	60
Figura 12. Representação gráfica da técnica de preparação das micropartículas poliméricas por dupla emulsão.	70
Figura 13. Fotomicrografias das formulações preliminares (A) EP1 e (B) EP2.	86
Figura 14. Avaliação do tipo de agente porogênico utilizado na fase aquosa 1: (A) EP 3 com ABC 1%; (B) EP 4 com NaCl 0,5%; (C) EP 5 com NaCl 5%.	88
Figura 15. Fotomicrografias dos ensaios preliminares (A) EP 6, (B) EP 7, (C) EP 8, (D) EP 9 para avaliação da concentração de surfactante hidrofílico.....	90
Figura 16. Fotomicrografias das amostras (A) EP 3 com 150 mg de azitromicina e (B) EP 5 com 250 mg de azitromicina.	91
Figura 17. Fotomicrografia da formulação EP 14.	93
Figura 18. Estrutura química da alizarina.	95
Figura 19. Espectros de varredura obtidos a partir (A) solução padrão de azitromicina 70 µg/mL; (B) solução padrão de alizarina 38,4 µg/mL e (C) complexo alizarina-azitromicina formado em solução.	96
Figura 20. Diagrama de Job obtido para a determinação da estequiometria da reação de complexação entre a azitromicina e alizarina.....	97
Figura 21. Valores de absorbância do complexo azitromicina-alizarina em função do tempo de reação.	98

Figura 22. Espectros de FT-IR da (A) alizarina, (B) azitromicina e (C) complexo alizarina-azitromicina 1:1.	99
Figura 23. Espectros de absorção no UV/Vis obtidos após análise de micropartículas de policaprolactona (A) brancas e (B) contendo azitromicina.	100
Figura 24. Curva de calibração média obtida para quantificação da azitromicina, após complexação com a alizarina.	101
Figura 25. Diagrama de Pareto com estimativa de efeitos para o teor de azitromicina nas micropartículas.	107
Figura 26. Fotomicrografias das micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina com aumento de 2000 vezes. (A) MPD 1; (B) MPD 2; (C) MPD 3; (D) MPD 4; (E) MPD 5; (F) MPD 6; (G) MPD 7 e (H) MPD 8.	109
Figura 27. Fotomicrografias das micropartículas de policaprolactona brancas com aumento de 2000 vezes. (A) MPD 1 e (B) MPD 5.	109
Figura 28. Fotomicrografia das micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina com aumento de 5000 vezes. Formulação MPD 6.	110
Figura 29. Fotomicrografia da formulação MPD 1 branca após criosecção, nos aumentos de (A) 700 e (B) 5000 vezes.	111
Figura 30. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula das micropartículas poliméricas contendo azitromicina: (A) MPD 1; (B) MPD 2; (C) MPD 3; (D) MPD 4; (E) MPD 5; (F) MPD 6; (G) MPD 7; (H) MPD 8.	115
Figura 31. Diagrama de Pareto exibindo os efeitos dos fatores estudados sobre o DAMM ($p < 0,05$).	118
Figura 32. Estimativa de deposição das micropartículas por região, obtida através do software MPPD v2.11. (A) Fração depositada na cabeça e regiões traqueobronquial (TB) e pulmonar (P), (B) Fração depositada na região pulmonar central e periférica... ..	120
Figura 33. Termogramas da (A) Azitromicina diidratada; (B) PCL; (C) Mistura física fármaco: polímero (1:5); (D) MPD 1 branca; (E) MPD 1 contendo azitromicina.	122
Figura 34. Curvas de TGA, para (A) Azitromicina diidratada, (B) PCL, (C) Mistura física, (D) MPD 1 branca, (E) MPD 1.	124
Figura 35. Perfil de reflexão das amostras (A) Azitromicina diidratada, (B) PCL, (C) MPD 1 branca e (D) MPD 1, (E) MPD 2, (F) MPD 3, (G) MPD 4, (H) MPD 5, (I) MPD 6, (J) MPD 7 e (K) MPD 8.	124

Figura 36. Espectros de FT-IR obtidos para (A) azitromicina diidratada, (B) PCL; (C) mistura física; (D) MPD 1 branca e (E) MPD 5 contendo fármaco.	125
Figura 37. Cromatogramas referentes ao (A) PBS e à (B) azitromicina, respectivamente.	127
Figura 38. Curva de calibração da azitromicina em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 após análises por CLAE.	127
Figura 39. Perfis de liberação da azitromicina a partir das microparticulas de PCL. Em (A) são mostrados os perfis das amostras MPD 1 a 4 e em (B) das amostras MPD 5 a 8.	129
Figura 40. Fotomicrografias realizadas após o ensaio de dissolução (A) MPD 1 e (B) MPD 3.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações testadas para seleção do volume e tipo de agente porogênico.	67
Tabela 2. Composição das formulações de micropartículas poliméricas para avaliação do efeito da concentração de PVA.	68
Tabela 3. Composição das formulações de micropartículas poliméricas para avaliação do efeito da quantidade inicial de azitromicina.	68
Tabela 4. Variáveis independentes e seus níveis utilizados no delineamento fatorial 23.	71
Tabela 5. Delineamento fatorial 23 utilizado para obtenção das micropartículas.	71
Tabela 6. Composição das formulações de micropartículas poliméricas preparadas pela técnica de dupla emulsão.	71
Tabela 7. Misturas feitas a partir de soluções estoque de azitromicina 0,002 M e alizarina 0,002M.	73
Tabela 8. Classificação entre fluxo e Índice de Carr.	79
Tabela 9. Tamanho geométrico médio das formulações brancas para avaliação do tipo de agente porogênico.	87
Tabela 10. Tamanho geométrico médio das formulações iniciais, avaliando a concentração de surfactante hidrofílico.	90
Tabela 11. Tamanho geométrico médio das formulações iniciais avaliando a quantidade de fármaco adicionado.	91
Tabela 12. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão do método analítico.	102
Tabela 13. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intradia do método para quantificação da azitromicina nas micropartículas	103
Tabela 14. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão interdia.	103
Tabela 15. Eficiência de encapsulação (EE%) e teor de azitromicina nas micropartículas.	104
Tabela 16. Análise da variância realizada no estudo do efeito dos fatores de formulação sobre o teor de fármaco encapsulado.	106
Tabela 17. Valores de densidade aparente, de compactação e esquelética (real) das micropartículas.	112
Tabela 18. Índice de Carr e características de fluidez do pó.	114

Tabela 19. Diâmetros geométricos médios das micropartículas poliméricas obtidos pela técnica de difração a laser.....	115
Tabela 20. Diâmetro aerodinâmico médio das micropartículas de PCL.	116
Tabela 21. Análise da variância realizada no estudo do efeito dos fatores de formulação sobre o DAMM.....	117
Tabela 22. Parâmetros termoanalíticos obtidos das curvas de DSC após análise das amostras de matérias-primas e formulações.	123
Tabela 24. Resultados da eficiência de dissolução das micropartículas.	129
Tabela 25. Parâmetros cinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo de Higuchi.	131

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Diâmetro aerodinâmico médio mássico	48
Equação 2	Densidade da partícula	49
Equação 3	Lei de Lambert-Beer	73
Equação 4	Limite de detecção	75
Equação 5	Limite de quantificação	75
Equação 6	Teor	77
Equação 7	Eficiência de encapsulação	77
Equação 8	Densidade aparente	78
Equação 9	Densidade de compactação	78
Equação 10	Índice de Carr	79
Equação 11	Span	80
Equação 12	Diâmetro aerodinâmico médio mássico	80
Equação 13	Cristalinidade relativa	81
Equação 14	Eficiência de dissolução	83
Equação 15	Diferença mínima significativa	105
Equação 16	Ajuste teor	106
Equação 17	Ajuste DAMM	118
Equação 18	Modelo cinético de Higuchi	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ângstrom
ABC	Bicarbonato de amônio
ANOVA	Análise da variância
ASC	Área sobre a curva
BSA	Albumina sérica bovina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAMM	Diâmetro aerodinâmico médio de massa
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
dms	Diferença mínima significativa
DP	Desvio padrão
DPI	Inalador de pó seco
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ED	Eficiência de dissolução
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
HPMC	Hidroxipropil metil-celulose
IC	Índice de Carr
ICH	<i>International conference on harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MDI	Inalador pressurizado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPD	Micropartículas poliméricas preparadas por dupla emulsão
nm	Nanômetro
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PCL	Policaprolactona
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PVA	Álcool polivinílico
rpm	Rotações por minuto

SUS	Sistema único de saúde
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
WHO	Organização mundial da saúde
μm	Micrômetro
ε	Porosidade
ρ	Densidade
χ	Fator de forma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	29
1.1 INTRODUÇÃO.....	31
1.2 OBJETIVOS.....	33
1.2.1 Objetivo geral.....	33
1.2.2 Objetivos específicos.....	34
2. REVISÃO DA LITERATURA	35
2.1 Pneumonia comunitária (PAC).....	37
2.1.1 Patologia da PAC.....	37
2.1.2 Dados epidemiológicos.....	38
2.1.3 Tratamento da PAC.....	39
2.2 Azitromicina.....	40
2.3 Administração pulmonar de fármacos.....	42
2.3.1 Anatomia do pulmão.....	42
2.3.2 Aerossóis farmacêuticos.....	45
2.3.2.1 Dispositivos inalatórios convencionais.....	49
2.3.2.2 Inaladores de pó seco (DPI).....	50
2.4 Sistemas microestruturados utilizados como carreadores de fármacos.....	52
2.4.1 Micropartículas poliméricas.....	53
2.5 Policaprolactona.....	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 MATERIAIS.....	65
3.1.1 Matérias-primas.....	65
3.1.2 Solventes, soluções e reagentes.....	65
3.1.3 Equipamentos.....	65
3.2 MÉTODOS.....	66
3.2.1 Estudos preliminares de formulação.....	66
3.2.1.1 Preparação das micropartículas de policaprolactona pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente.....	66
3.2.1.1.1 Seleção do tipo de agente porogênico.....	67
3.2.1.1.2 Avaliação da concentração de surfactante hidrofílico....	67
3.2.1.1.3 Avaliação da quantidade inicial de azitromicina.....	68
3.2.2 Estudo de formulação de micropartículas de policaprolactona por delineamento estatístico fatorial.....	69
3.2.2.1 Preparação das micropartículas porosas de policaprolactona pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente.....	69
3.2.2.2 Planejamento fatorial.....	70
3.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da azitromicina por espectroscopia de absorção no visível.....	72

3.2.3.1 Otimização das condições de complexação entre a alizarina e a azitromicina em solução.....	72
3.2.3.1.1 Avaliação da estequiometria da reação.....	72
3.2.3.1.2 Avaliação do tempo de reação.....	73
3.2.3.1.3 Caracterização do complexo azitromicina-alizarina por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	74
3.2.3.2 Validação da metodologia analítica de quantificação da azitromicina por espectroscopia de absorção no visível.....	74
3.2.3.2.1 Especificidade.....	74
3.2.3.2.2 Linearidade, limites de detecção e de quantificação.....	75
3.2.3.2.3 Exatidão.....	76
3.2.3.2.4 Precisão.....	76
3.2.3.3 Determinação do teor de fármaco encapsulado e da eficiência de encapsulação nas micropartículas	77
3.2.4.1 Avaliação da morfologia.....	77
3.2.4.2 Determinação da densidade bruta e de compactação.....	78
3.2.4.3 Avaliação do fluxo.....	78
3.2.4.4 Determinação da densidade real (esquelética) das micropartículas.....	79
3.2.4.5 Determinação do tamanho médio e distribuição granulométrica.....	79
3.2.4.6 Determinação do diâmetro aerodinâmico mássico médio (DAMM).....	80
3.2.4.7 Análise térmica.....	80
3.2.4.8 Difração de Raios-X.....	81
3.2.4.9 Espectroscopia no Infravermelho.....	82
3.2.5 Avaliação do perfil de liberação da azitromicina a partir das micropartículas.....	82
3.2.5.1 Avaliação da solubilidade da azitromicina em tampão fosfato.....	82
3.2.5.2 Otimização de metodologia analítica para quantificação da azitromicina em tampão fosfato por CLAE.....	82
3.2.5.2.1 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	83
3.2.5.3 Ensaio de liberação.....	83
3.2.6 Análise estatística.....	84
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1 Preparação das micropartículas poliméricas contendo azitromicina para liberação pulmonar.....	85

4.2.1	Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da azitromicina por espectrofotometria de absorção no visível....	93
4.2.1.1	Otimização das condições de complexação e caracterização do complexo.....	95
4.2.1.1.1	Avaliação da estequiometria da reação.....	96
4.2.1.1.2	Avaliação do tempo de reação.....	97
4.2.1.1.3	Caracterização do complexo azitromicina-alizarina por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	98
4.2.1.2.1	Especificidade.....	100
4.2.1.2.2	Linearidade.....	101
4.2.1.2.3	Exatidão.....	102
4.2.1.2.4	Precisão.....	102
4.2.1.3	Determinação do teor e eficiência de encapsulação da azitromicina nas micropartículas	103
4.2.2	Caracterização físicoquímica das micropartículas.....	107
4.2.2.1	Avaliação da morfologia.....	107
4.2.2.2	Determinação da densidade bruta, de compactação e esquelética (real).....	111
4.2.2.3	Avaliação do fluxo.....	113
4.2.2.4	Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica.....	114
4.2.2.5	Determinação do diâmetro aerodinâmico mássico médio.....	116
4.2.2.6	Análise térmica.....	121
4.2.2.7	Difração de raios-X.....	124
4.2.2.8	Espectroscopia no Infravermelho.....	125
4.2.2.9	Avaliação do perfil de liberação in vitro da azitromicina... ..	126
4.2.2.9.1	Solubilidade da azitromicina em tampão fosfato pH 7,4.....	126
4.2.2.9.2	Otimização de metodologia analítica para quantificação da azitromicina em tampão fosfato pH 7,4 por CLAE.....	126
4.2.2.9.3	Perfil de liberação da azitromicina.....	128
5	CONCLUSÕES	135
6	BIBLIOGRAFIA	139

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

A pneumonia comunitária é apontada pela Organização Mundial da Saúde como uma das maiores causas de morbimortalidade no mundo, principalmente entre crianças e idosos, sendo a causa de 2 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos a cada ano, mais do que a AIDS, tuberculose e sarampo combinados, sendo que em 7-13% dos casos é necessária a hospitalização (WHO, 2006; WANG et al., 2011). Estima-se que nos Estados Unidos os custos associados ao manejo da pneumonia comunitária ultrapassem 10 bilhões de dólares por ano (JONES et al., 2010). A incidência da doença é maior nos países em desenvolvimento, onde esta está ligada a fatores como má nutrição, baixo peso ao nascer, poluição, falta de amamentação, falta de vacinação, entre outros fatores de risco (FELMINGHAM et al., 2004; RUDAN et al., 2006; MANTESE et al., 2009). No Brasil as doenças do trato respiratório são a principal causa de internação hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS), excluídas as questões relacionadas à gestação, totalizando 1.286.220 internações por ano. Dados relativos ao ano de 2013 mostram que foram registradas 49.441 mortes no país causadas pela pneumonia (BRASIL, 2014).

Um fármaco bastante utilizado na terapia desta enfermidade é a azitromicina, um antibiótico pertencente à classe dos macrolídeos que exibe atividade *in vitro* e *in vivo* contra vários patógenos comuns à via respiratória, incluindo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* (TOGAMI et al., 2011; WANG et al., 2011). O uso deste fármaco é aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) no tratamento de pneumonias comunitárias e exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Geralmente, o tratamento oral da pneumonia é feito ao longo de 5 dias, enquanto que o tratamento e profilaxia de infecções pulmonares associadas a doenças crônicas, como DPOC, bronquites, asma, doenças micobacterianas não-tuberculosas e fibrose cística, pode ser feito continuamente. A azitromicina frequentemente produz efeitos adversos gastrointestinais e seu uso contínuo pode levar à perda auditiva reversível. Nestes casos, sugere-se que altos níveis plasmáticos de fármaco estejam envolvidos, necessitando reduzir a dose ou descontinuar o tratamento, principalmente entre pacientes idosos. A terapia por inalação, que libera o fármaco diretamente no pulmão,

pode ser utilizada para reduzir a dose, diminuir os efeitos adversos e maximizar a ação terapêutica deste fármaco (HICKEY et al., 2006; BARANDA et al., 2011).

Sistemas microestruturados poliméricos contendo azitromicina podem ser utilizados como estratégia no tratamento de infecções do trato respiratório, já que concentrações terapêuticas podem ser alcançadas diretamente no sítio de infecção (HICKEY et al., 2006; YANG et al., 2009). A administração pulmonar das micropartículas pode ser feita através de um inalador de pó seco (DPI, do inglês *dry powder inhaler*). Quando este dispositivo é acionado pela respiração do paciente, ocorre a formação de um aerossol, constituindo uma névoa de partículas que são carregadas pelo ar inspirado. Para isto, as micropartículas devem possuir características físicas bastante específicas, como densidade, tamanho e fluxo, para que sua aerossolização e deposição nos pulmões após a inalação seja adequada, e para que o fármaco tenha, então, a ação esperada no controle da infecção (AULTON et al., 2005).

Uma das características mais importantes para eficácia de um aerossol farmacêutico é o tamanho de partícula. Enquanto as partículas menores que 1 μm são exaladas com a expiração, as maiores de 10 μm permanecem retidas na região orofaríngea. Dessa forma, resta uma estreita faixa de tamanho de partículas que serão efetivamente depositadas nos pulmões. Por outro lado, partículas com tamanhos reduzidos possuem características coesivas e alta tendência à formação de aglomerados de tamanhos maiores, o que reduz o desempenho do aerossol. Além disso, possuem tamanhos ideais para fagocitose pelos macrófagos alveolares, reduzindo o período de permanência das partículas que alcançam os pulmões (ARNOLD et al., 2007). Entretanto, o diâmetro aerodinâmico médio mássico (DAMM) é considerado o parâmetro mais confiável para prever o comportamento das partículas inaladas. Este é descrito como o diâmetro físico de uma esfera de densidade unitária, que sedimenta no ar com uma velocidade igual à partícula sob análise (MUSANTE et al., 2001; ARNOLD et al., 2007; UNGARO et al., 2009). O DAMM pode ser obtido experimentalmente por ensaios em impactadores ou estimado através de equações matemáticas considerando seu diâmetro geométrico, densidade, porosidade e forma (AULTON et al., 2005).

Recentemente, estudos têm sido conduzidos com o intuito de obter micropartículas poliméricas com diâmetro geométrico de cerca

de 10 μm , incapazes de serem fagocitadas, mas com baixa densidade ($< 0,4 \text{ g/mL}$), apresentado, portanto, comportamento de aerossolização e deposição desejados, compatíveis com a via pulmonar (ARNOLD et al., 2007; YANG et al., 2009). Estes estudos se baseiam na obtenção de partículas porosas, e empregam métodos que incluem a separação de fases, adição de sais, e uso de agentes efervescentes e indutores osmóticos na etapa de preparação, geralmente quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é usada. As micropartículas poliméricas permitem também o controle da liberação do fármaco, o que reduz o número de doses e aumenta a adesão do paciente ao tratamento (ARNOLD et al., 2007).

A policaprolactona (PCL) tem sido amplamente utilizada na obtenção de sistemas de liberação de fármacos nano- e microestruturados, pois pertence à classe de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, juntamente com o poli(ácido-lático) (PLA), poli(ácido-glicólico) (PGA) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) (CHEN, WANG, 2000). Diversos estudos são descritos demonstrando a capacidade da PCL para encapsular diferentes fármacos, hidrofílicos e hidrofóbicos, como o taxol, clonazepam, saquinavir, docetaxel, vimblastina, insulina, entre outros, para administração oral e parenteral (PEREZ et al., 2000; KUMARI et al., 2010; RAVAL et al., 2011). Assim, a PCL será empregada neste trabalho para a obtenção de micropartículas porosas.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver micropartículas poliméricas a partir da policaprolactona para a liberação pulmonar da azitromicina, usando para isto a técnica de emulsão evaporação do solvente. O efeito de diferentes variáveis de formulação, incluindo a adição de agentes porogênicos, sobre as características finais das partículas e sobre o perfil de liberação do fármaco será avaliado neste trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver micropartículas poliméricas com características adequadas para a liberação pulmonar da azitromicina visando o tratamento de infecções respiratórias.

1.2.2 Objetivos específicos

- Preparar micropartículas poliméricas constituídas de PCL contendo azitromicina pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente.
- Avaliar o efeito de diferentes fatores sobre as características de tamanho geométrico e aerodinâmico, morfologia, densidade, fluidez e microestrutura interna das partículas.
- Avaliar o efeito da adição de agentes porogênicos sobre as características das partículas que afetam a deposição pulmonar.
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por espectroscopia de absorção no visível para determinação da azitromicina nas partículas.
- Determinar o teor e a eficiência de encapsulação da azitromicina nas micropartículas.
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação da azitromicina nos estudos de liberação *in vitro*.
- Avaliar os perfis de liberação da azitromicina *in vitro* a partir das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4.
- Estimar a deposição das micropartículas através de modelo *in silico* para avaliação da eficiência do sistema microestruturado quanto a penetração e deposição pulmonar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pneumonia comunitária (PAC)

2.1.1 Patologia da PAC

Infecções respiratórias agudas podem ocorrer em qualquer parte do trato respiratório, desde o ouvido médio ao nariz, até os pulmões. A pneumonia adquirida na comunidade (PAC), ou pneumonia comunitária, é uma forma severa de infecção respiratória inferior que afeta especificamente os pulmões (WHO, 2006). Esta enfermidade é caracterizada por uma infecção aguda do trato respiratório inferior que acomete um ou ambos os pulmões e pode ser causada por vírus, bactérias ou fungos (WOLKERS et al., 2009; JONES et al., 2010).

As causas mais comuns de PAC são as infecções bacterianas causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo B, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus*. Infecções por patógenos atípicos também podem ocorrer, como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, e *Legionella pneumophila*. Além disso, as pneumonias podem ser causadas por vírus como o Influenza, parainfluenza, adenovírus e vírus sincicial respiratório, além de fungos da espécie *Aspergillus spp.* A rota de infecção mais comum é a microaspiração do patógeno, que passa a colonizar um novo hospedeiro. A interação entre a resposta imune, a virulência do microorganismo infectante e o tamanho do inóculo determinam se o paciente desenvolverá a doença (MANDELL et al., 2007; NAIR, NIEDERMAN, 2011).

A doença pode manifestar-se de forma moderada com melhora rápida do paciente, ou até evoluir para sepse severa com falência múltipla de órgãos e morte. As consequências mais graves estão relacionadas aos extremos de idade e comorbidades, como DPOC, asma e imunossupressão (NAIR, NIEDERMAN, 2011). Nas crianças, a PAC pode ser relacionada também a fatores de risco como má nutrição, baixo peso ao nascer, poluição, falta de amamentação, falta de vacinação e atenção básica em saúde, entre outros (FELMINGHAM et al., 2004; RUDAN et al., 2006; MANTESE et al., 2009).

Os sintomas relatados são febre, tosse, respiração rápida e curta, dores de cabeça e perda de apetite. Ao exame físico, o paciente comumente apresenta sinais como taquiplnéia, taquicardia, estertores, derrame pleural. Na suspeita clínica de PAC, a radiografia de tórax pode ser útil no diagnóstico, com a visualização de infiltrados pulmonares (Sociedade Brasileira de Pneumologia,

2007). A coleta de sangue e escarro para cultura e identificação do patógeno é indicada. Entretanto, devido a um grande número de agentes etiológicos possíveis, à dificuldade de se obter amostras fidedignas e com respostas laboratoriais em tempo hábil, a coleta de material para exames específicos é uma prática não habitual na clínica médica. O patógeno não é identificado em até 60% dos casos de pneumonia (Sociedade Brasileira de Pneumologia, 2007).

2.1.2 Dados epidemiológicos

A pneumonia é apontada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das maiores causas de mortalidade no mundo, principalmente entre crianças menores de 5 anos e idosos acima de 65 anos, chegando a 450 milhões de novos casos por ano e 4 milhões de óbitos. Entre as crianças, a doença causa mais mortes que a AIDS, tuberculose e sarampo combinados (WHO, 2006; WANG et al., 2011; RUUSKANEN et al., 2011; RUDAN et al., 2013).

Cerca de 156 milhões de novos casos de pneumonia em crianças menores de cinco anos ocorrem a cada ano, sendo que 74% destes ocorrem em países em desenvolvimento. Estima-se que a China e a Índia apresentem os maiores números de novos casos da doença por ano, com 43 e 21 milhões de casos, respectivamente. Países como Bangladesh, Nigéria e Indonésia, aparecem com 6 milhões de novos casos cada. Nestes países, a incidência de episódios da doença por criança encontra-se entre 0,28 e 0,41 por ano (figura 1) (RUDAN et al., 2008).

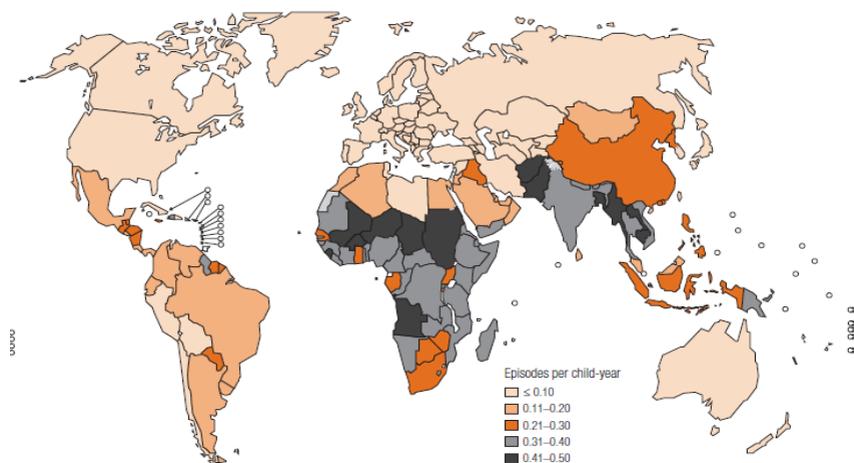


Figura 1. Incidência de pneumonias em crianças menores de 5 anos, por país.
(Fonte: RUDAN et al., 2008).

Estima-se que nos Estados Unidos os custos associados ao manejo da pneumonia ultrapassem 17 bilhões de dólares por ano, sendo que em 7 - 13% dos casos é necessária a hospitalização (RUUSKASNEN et al., 2011). No Brasil as doenças do aparelho respiratório figuram como a principal razão de internação hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS), excluídas as questões relacionadas a gestação, totalizando 1,286 milhões de internações no ano de 2013. Dentre estas, 677.912 internações condizem a casos de pneumonia, sendo que 49.441 pacientes foram a óbito no mesmo ano (BRASIL, 2014).

Medidas preventivas são essenciais para reduzir o número de acometimentos pela doença e mortes. Desta forma, incentiva-se a amamentação, imunização (vacinação), higienização das mãos e redução da poluição atmosférica e do tabagismo passivo (WHO, 2006; Sociedade Brasileira de Pneumologia, 2007).

2.1.3 Tratamento da PAC

Diretrizes internacionais direcionam o tratamento desta enfermidade considerando diversos fatores, como o histórico clínico do paciente, o patógeno suspeito da infecção, tipo de tratamento

(ambulatorial, internação ou UTI), recomendando o uso de antibióticos, como a amoxicilina/clavulanato, amicacina, azitromicina, ceftriaxona, gentamicina, levofloxacino, penicilina G, entre outros. Apesar de não haver um consenso, especialistas recomendam que pacientes com pneumonia sejam tratados com antibióticos, ainda que haja suspeita de infecção viral (MANDELL et al., 2007; RUUSKANEN et al., 2011). A antibioticoterapia é utilizada também no controle e profilaxia de afecções do trato respiratório inferior associadas a doenças de base, como a fibrose cística, enfisema pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma (LAVOIE et al., 2005).

A exposição aos antibióticos e principalmente seu uso indiscriminado tem sido relacionado com o aumento da incidência de cepas resistentes (BLASI et al., 2007). A crescente resistência aos antimicrobianos é uma questão importante para a saúde pública em geral, já que limita as opções de tratamento e implica na potencial falha terapêutica levando a maiores gastos com o tratamento, dias de trabalho perdidos, hospitalização e o falecimento do paciente (JONES et al., 2010). A racionalização do uso de antimicrobianos é necessária, tendo sido implantada no Brasil a Resolução 44/2010 que limita a venda de desta classe de medicamentos a fim de diminuir a incidência de cepas resistentes (BRASIL, 2010).

2.2 Azitromicina

A azitromicina (9-deoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A) (figura 2) é um antimicrobiano semi-sintético, pertencente à classe dos macrolídeos. É derivada da eritromicina A, sendo que a azitromicina possui em sua estrutura uma lactona macrocíclica expandida com 15 membros, contendo um nitrogênio metil-substituído incluído em seu anel lactônico na posição 9a o que lhe confere maior espectro de ação contra patógenos Gram-negativos em relação à molécula precursora (LODE et al., 1996; NEU, 1991). Além disso, a azitromicina apresenta menores efeitos colaterais gastrointestinais, maior estabilidade em meio ácido, maior tempo de meia vida plasmática e maior afinidade tecidual e fagocítica em relação a eritromicina (GANDHI et al., 2002; LODE et al., 1996).

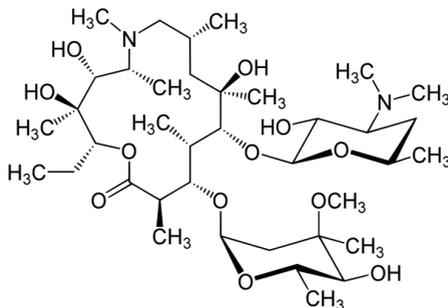


Figura 2. Estrutura química da azitromicina.

Farmacocineticamente, a azitromicina é rapidamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, concentrando-se tanto nos compartimentos intersticiais quanto intracelulares (como macrófagos alveolares). Sua biodisponibilidade chega a 37% da dose administrada, com meia vida plasmática longa (RANG et al., 2007; OLSEN, 1996, MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2005). É encontrada comercialmente nas formas farmacêuticas comprimidos revestidos e pó para suspensão oral.

A azitromicina apresenta-se como um pó cristalino branco muito pouco solúvel em água, e facilmente solúvel em etanol, metanol e clorofórmio. É um fármaco de massa molecular igual a 749 g/mol na sua forma anidra (BRASIL, 2010). A azitromicina pode ser encontrada nas formas anidra (amorfa) ou como solvatos, assumindo, neste caso, características cristalinas. Quando amorfa, possui característica higroscópica e tende a sofrer transição para a forma mais estável diidratada. A forma monoidratada é menos comum e tende a transformar-se em diidrato durante o armazenamento do fármaco ou da forma farmacêutica (TIMOUMI et al., 2010).

Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica bacteriana pelo bloqueio da subunidade 50S ribossomal de microorganismos sensíveis (RANG et al., 2007; BLASI et al., 2007). É largamente utilizada clinicamente, sendo indicada no tratamento de infecções do trato respiratório inferior, como bronquites e pneumonias, comumente causadas por patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*. Também é utilizada em infecções causadas por patógenos intracelulares, como *Chlamydia*

pneumoniae e *Legionella pneumophila* (TOGAMI et al., 2011). A azitromicina também é indicada no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis não complicadas, infecções de pele e otite média (NEU, 1991; HOPKINS, 1991; AZHDARZADEH et al, 2012). Como os demais macrolídeos, a azitromicina não é afetada pela produção de β -lactamase (WANG et al., 2011).

Diferentes metodologias analíticas podem ser encontradas na literatura para determinação da azitromicina. A monografia do fármaco incluída na Farmacopéia Brasileira V (2010) preconiza que o doseamento da matéria-prima e das preparações farmacêuticas (pó para suspensão oral e cápsulas) seja feito através de ensaios microbiológicos de difusão em ágar. Entretanto, outros métodos são descritos para a determinação da azitromicina incluindo CLAE com detecção amperometria (USP 30, 2007) e por fluorescência, após derivatização do analito (TORANO, GUCHELAAR, 1998), assim como métodos espectrofotométricos envolvendo a degradação do fármaco com ácido sulfúrico (SULTANA et al., 2006), reação de oxidação com permanganato de potássio (SUHAGIA et al., 2006) ou formação de complexos (BEBAWY et al., 1997; KELANI et al., 1997; HUANG et al., 2006; PAULA, ALMEIDA, CASSELA, 2010b).

2.3 Administração pulmonar de fármacos

2.3.1 Anatomia do pulmão

O trato respiratório possui a função principal de garantir as trocas gasosas com o meio ambiente. Sua anatomia pode ser dividida em três regiões principais: extratorácica, traqueobronquial e pulmonar (figura 3).

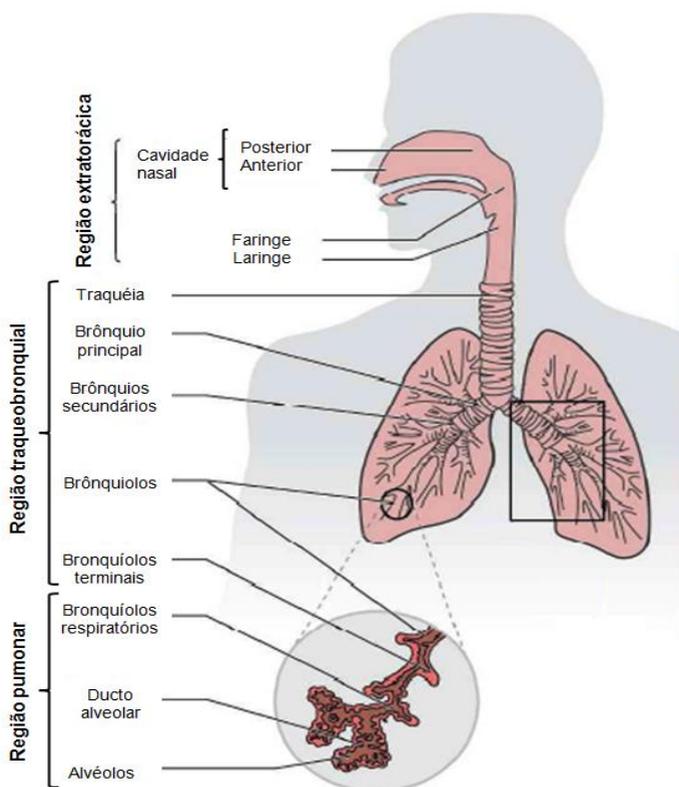


Figura 3. Anatomia das vias respiratórias.
(Fonte: adaptado de HUSSAIN et al., 2011).

A porção extratorácica (vias aéreas superiores) se estende desde a cavidade nasal até a laringe. Nesta porção ocorre a filtração de partículas de maior tamanho, aquecimento do ar inspirado e condução para a região traqueobronquial. A arquitetura básica da região traqueobronquial consiste predominantemente em uma série simétrica de ramificações dicotômicas, cada uma das quais levando o nome de geração. Existem 23 gerações de ramificações desde a tráqueia até a extremidade da árvore traqueobronquial, na qual é caracterizada por um decréscimo em ambos diâmetro e comprimento dos ductos de cada ramificação, e no aumento dramático da área superficial (TAYLOR, KELLAWAY, 2001).

A região traqueobronquial é responsável pela condução do ar, sendo constituída pela laringe, traquéia e bronquíolos. Esta porção do trato respiratório é coberta por células ciliadas e caliciformes, as quais são secretoras de muco (figura 4). Nesta região, o muco está presente como uma camada viscoelástica que, em condições normais, apresenta cerca de 0,5 a 5 μm de espessura, sendo constituído por uma mistura complexa de glicoproteínas, proteínas, lipídios e água. O muco não existe como uma camada estagnada, ao contrário, ele é constantemente propelido da região traqueobronquial por meio do batimento ritmado dos cílios das células epiteliais, em direção aos brônquios, traqueia e garganta (TAYLOR, KELLAWAY, 2001). Desta forma, o movimento mucociliar é responsável pela remoção de partículas retidas na camada de muco, levando-as para o trato gastrointestinal.

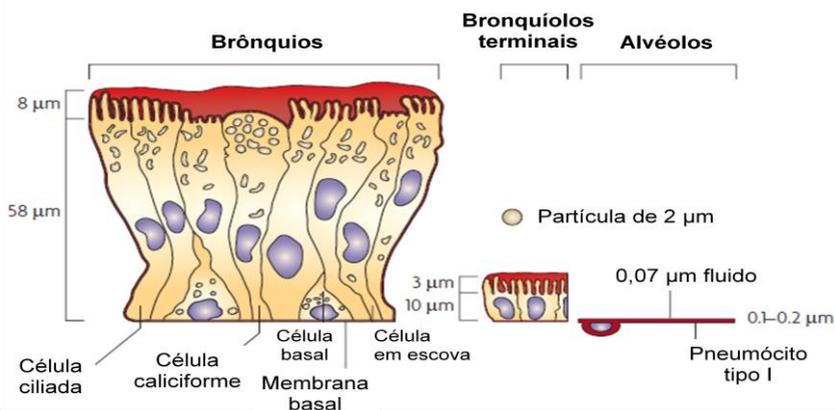


Figura 4. Esquema representativo das células em diferentes regiões do trato respiratório.

(Fonte: adaptado de PATTON, BYRON, 2007).

A terceira região é a pulmonar, abrangendo a porção terminal dos bronquíolos, ductos e sacos alveolares, onde ocorrem efetivamente as trocas gasosas. A região alveolar é desprovida de muco e caracterizada por apresentar um epitélio achatado, constituído por dois tipos de células, os pneumócitos tipo I, os quais oferecem um estreito caminho para que ocorram as trocas gasosas com o sangue, e os pneumócitos tipo II, os quais são células cubóides que secretam o surfactante pulmonar. Este é composto

por fosfolipídeos, especialmente a dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), colesterol e proteínas associadas, que reduzem a tensão superficial entre o líquido da cavidade pulmonar e o ar inspirado. Ainda, os macrófagos alveolares perfazem cerca de 3% da região alveolar e são responsáveis pela captura e transporte de material particulado dos alvéolos para os linfonodos ou para regiões que apresentam o mecanismo de depuração mucociliar (TAYLOR, KELLAWAY, 2001).

A via pulmonar pode ser utilizada no tratamento de enfermidades locais, bem como no tratamento de doenças sistêmicas. A deposição de partículas no trato respiratório é importante para a eficácia dos aerossóis farmacêuticos, entretanto, a deposição no sítio de interesse é crucial. Sabe-se que para ação local é desejável que a deposição das partículas ocorra na porção central do pulmão, enquanto que para obtenção de uma ação sistêmica, a deposição deve ocorrer em nível dos alvéolos, região onde ocorre a absorção dos compostos ativos através do seu epitélio fino (UNGARO et al., 2012). O fluxo de ar, o transporte do aerossol e sua deposição no trato respiratório são bastante influenciados pelas dimensões e orientação das vias aéreas. Ainda, o volume pulmonar expande durante a inalação e reduz na exalação, resultando em uma geometria variável (HUSSAIN, MADL, KHAN, 2011).

2.3.2 Aerossóis farmacêuticos

Medicamentos administrados pela via inalatória tem sido empregados na clínica médica desde a década de 1950 (ISLAM, GLADKI, 2008). No tratamento de doenças respiratórias há várias vantagens na administração local de fármacos pela via pulmonar, como a possibilidade de atingir altas concentrações de fármaco diretamente no seu sítio de ação, possibilitando a diminuição da dose administrada e minimização do risco de efeitos adversos sistêmicos, obtendo também uma resposta clínica rápida e contornando as barreiras biológicas que intervêm na eficácia terapêutica, tais como a baixa absorção pelo trato gastrointestinal e elevada metabolização hepática (LABIRIS et al., 2003; PATTON, BYRON, 2007; DANIHER, ZHU, 2008). Atualmente diversos fármacos são administrados pela via inalatória visando a ação local. Entre eles destacam-se os broncodilatadores, corticosteróides e antibióticos, utilizados no controle da constrição brônquica, de

processos inflamatórios e infecções, respectivamente (UNGARO et al., 2012).

Em relação ao tratamento de doenças sistêmicas, a utilização da via pulmonar também pode ser vantajosa, visto que a absorção é favorecida devido à elevada área superficial (cerca de 100 m²), à presença de um epitélio fino e altamente permeável na região alveolar (0,2 a 0,7 µm de espessura), ao elevado fluxo sanguíneo (5 L/minuto), visto que os alvéolos recebem todo o sangue proveniente do coração, à atividade mucociliar lenta nas zonas periféricas que resulta no aumento do tempo de residência dos sistemas de liberação e, finalmente, à baixa atividade enzimática comparada ao ambiente hepático. Além disso, a cinética de absorção pode ser apontada como reprodutível, em comparação à via oral, onde a dieta, presença de enzimas extracelulares e diferenças metabólicas interindividuais afetam diretamente a absorção de fármacos (LABIRIS et al., 2003; PATTON, BYRON, 2007). Medicamentos inalados visando ação sistêmica podem ser utilizados como estratégia quando há necessidade de rápido início de ação, sem apresentar a característica de invasividade das vias injetáveis. Exemplos destes medicamentos incluem os opióides para analgesia e peptídeos para tratamento do diabetes e da osteoporose (UNGARO et al., 2012).

Os medicamentos administrados por esta via devem constituir um aerossol, isto é, um sistema bifásico de partículas sólidas ou gotículas líquidas dispersas no ar ou em uma fase gasosa. As características de aerossolização e deposição das partículas são determinantes para a eficácia terapêutica, já que a absorção e/ou ação do fármaco depende do nível de penetração deste nos pulmões (AULTON et al., 2005). A deposição pulmonar resulta de um complexo conjunto de fatores relacionados às características físico-químicas das partículas, dispositivo de cedência, modo de inalação ou respiração, além das características anatômicas e fisiológicas das vias respiratórias e da condição clínica do paciente (HUSSAIN, MADL, KHAN, 2011; UNGARO et al., 2012). Para a máxima eficácia dos aerossóis farmacêuticos, deve-se adotar uma inalação lenta e profunda, até a total capacidade pulmonar, seguida da suspensão da respiração antes de exalar o ar retido (AULTON et al., 2005).

Várias características físicas das partículas são importantes para o desempenho dos aerossóis, sendo o tamanho de partícula

uma das principais que afetam a deposição nos pulmões (PILCER, AMIGHI, 2010). A deposição das partículas após a inalação pode ser dividida em três mecanismos: a colisão ou impactação inercial, sedimentação gravitacional e a difusão. A impactação ocorre quando partículas encontram-se em alta velocidade e passam por uma bifurcação no trato respiratório, onde o ar muda de direção. Estas partículas colidem, devido a sua inércia, com as paredes do trato respiratório e se depositam principalmente na boca e vias aéreas superiores. Isto ocorre com as partículas maiores que 5 ou 10 μm . A sedimentação das partículas apresentando tamanho entre 0,5 e 5 μm ocorre pela ação da gravidade nas regiões traqueobronquial inferior e alveolar. Em geral, partículas com tamanhos entre 3 e 5 μm se depositarão predominantemente na região traqueobronquial, enquanto partículas menores que 3 μm se depositarão na região alveolar (TAYLOR, KELLAWAY, 2001). A figura 5 representa esquematicamente as gerações do trato respiratório e os mecanismos principais de deposição envolvidos em cada etapa.

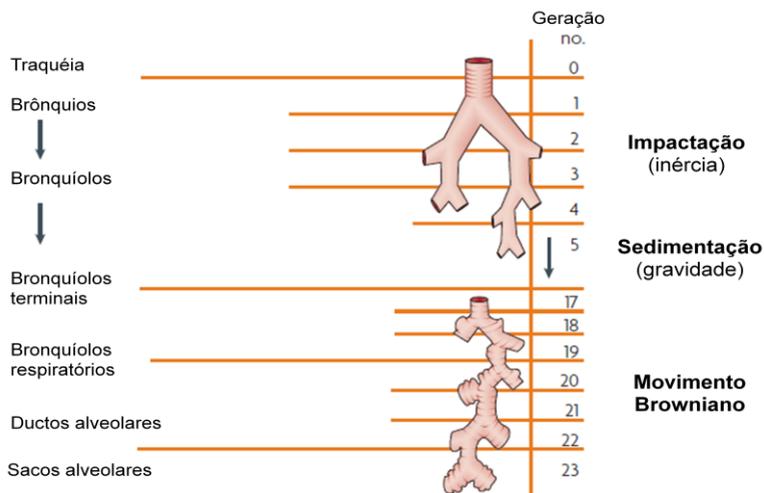


Figura 5. Deposição de partículas no trato respiratório. (Fonte: adaptado de PATTON, BYRON, 2007).

Como discutido anteriormente, o diâmetro ideal de partícula para deposição pulmonar encontra-se entre 1 e 5 μm (YANG et al., 2009; PILCER, AMIGHI, 2010). Por outro lado, partículas entre 1 a 3

um possuem tamanho ideal para captura por macrófagos alveolares (células de diâmetro entre 15 e 22 μm). A fagocitose é um mecanismo de defesa que remove partículas potencialmente tóxicas que alcançam os alvéolos pulmonares. No caso dos aerossóis farmacêuticos, a fagocitose reduz o tempo de residência das partículas nos pulmões, limitando o potencial de controle da liberação do fármaco a partir dos sistemas de liberação, além de alterar seu perfil farmacocinético e reduzir a biodisponibilidade (PATTON, BYRON, 2007; EDWARDS, BEN-JEBRIA, LANGER, 1998). Ainda, em partículas de tamanho muito reduzido existe a tendência à formação de aglomerados pela atuação de forças coesivas, como forças eletrostáticas ou de Van der Waals, que prejudicam a fluidez e dispersibilidade do pó (HASSAN, LAU, 2009).

Novas estratégias têm sido estudadas para contornar tais limitações e aumentar a eficácia dos aerossóis farmacêuticos. A manipulação das propriedades físicas das partículas tem possibilitado a obtenção de perfis de aerossolização adequados à administração pulmonar. Micropartículas poliméricas com tamanho geométrico maior que 10 μm , mas densidade menor que 0,4 g/cm, têm mostrado perfis de aerossolização adequados para a administração pulmonar, visto que o diâmetro aerodinâmico médio de massa (DAMM) das mesmas situa-se na faixa de 1 a 5 μm (ARNOLD et al., 2007; GIOVAGNOLI et al., 2007; UNGARO et al., 2009). O DAMM é definido como o diâmetro físico de uma esfera de densidade unitária, que sedimenta no ar com uma velocidade igual a partícula sob análise (AULTON et al., 2005; PILCER, AMIGHI; 2010). O DAMM descreve o comportamento aerodinâmico das partículas e a capacidade de deposição nos pulmões (AULTON et al., 2005), e é descrito pela equação:

$$DAMM = d_{geométrico} \cdot \sqrt{\frac{\rho_{partícula}}{\rho_{ref} \cdot \chi}} \quad \text{Equação 1}$$

onde $d_{geométrico}$ é o diâmetro geométrico das partículas (dado em μm), $\rho_{partícula}$ é a densidade da partícula, ρ_{ref} é a densidade de referência (1 g/cm³) e χ é o fator de formato da partícula ($\chi = 1$ para partículas esféricas). Para partículas porosas, considera-se também a porosidade (equação 2) (VAMBEVER et al., 1999).

$$\rho_{particula} = \rho_{esquelética} \cdot (1 - \varepsilon) \quad \text{Equação 2}$$

onde $\rho_{esquelética}$ é a densidade esquelética e ε é a porosidade (%).

Desta forma, é possível estimar o local da deposição das partículas de acordo com seu diâmetro aerodinâmico. Um esquema mostrando o perfil de deposição das partículas de acordo com seu tamanho aerodinâmico é mostrado na figura 6 (EDWARDS, BEN-JEBRIA, LANGER, 1998; LABIRIS, DOLOVICH, 2003).

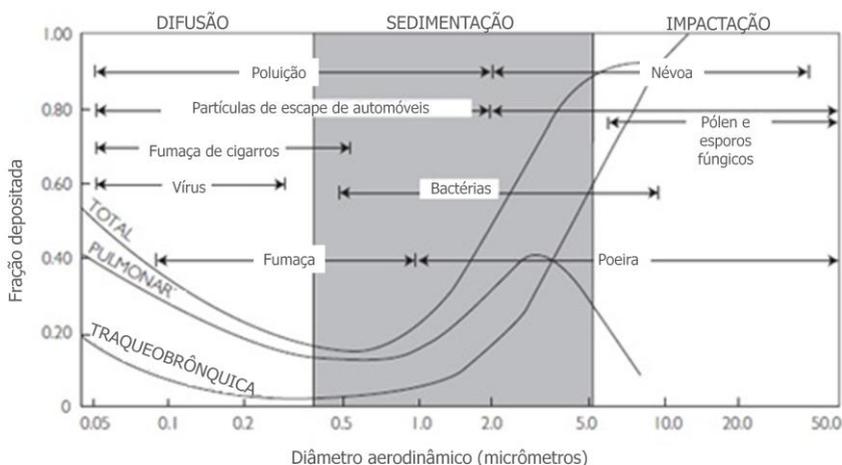


Figura 6. Perfil de deposição das partículas no trato respiratório conforme tamanho.

(Fonte: adaptado de LABIRIS, DOLOVICH, 2003).

2.3.2.1 Dispositivos inalatórios convencionais

Vários tipos de dispositivos inalatórios estão disponíveis no mercado. Os três tipos de dispositivos geradores de aerossóis mais utilizados são os inaladores pressurizados, os nebulizadores e os inaladores de pós secos. Os inaladores pressurizados são os dispositivos de cedência mais utilizados no mundo, principalmente para controle da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica. Estes cedem doses maiores com rapidez e maior reprodutibilidade, entretanto, este tipo de dispositivo possui algumas desvantagens como a necessidade de gases propelentes (clorofluorcarbonos e

hidrofluoralcenos), e da coordenação, por parte do paciente, entre o acionamento do dispositivo e a inspiração. Visto que o aerossol gerado possui alta velocidade, frequentemente é requerido o uso de espaçadores a fim de evitar a colisão das gotículas com a região orofaríngea (AULTON, 2005; DANIHER, ZHU, 2008; UNGARO et al., 2012).

Os nebulizadores também são utilizados para administração de fármacos pela via pulmonar a partir de soluções dos mesmos. Estes dispositivos podem liberar quantidades grandes de fármaco no ritmo normal de respiração, isto é, sem a necessidade de coordenação entre o acionamento do dispositivo e a inalação. Logo, seu uso é indicado para crianças, idosos e pacientes gravemente enfermos. Entretanto, são dispositivos de preço elevado, baixa portabilidade e consomem tempo do paciente (AULTON et al., 2005; DANIHER, ZHU, 2008).

2.3.2.2 Inaladores de pó seco (DPI)

Os inaladores de pós secos (DPIs) são particularmente interessante por serem livres de gases propelentes, portáteis, fáceis de operar e de baixo custo, além de promoverem a estabilidade da formulação que mantém-se na forma de um pó (HAMISHEHKAR et al., 2010). Tais dispositivos geram aerossóis a partir de pós secos inseridos no seu interior. Geralmente, o pó é colocado em cápsulas de gelatina dura ou blisters discoidais previamente carregados no dispositivo e são perfurados durante o acionamento. A liberação do pó ocorre em seguida, através da respiração do paciente e o fluxo turbulento de ar gerado por este promove a desagregação de agregados de fármaco e carreador (figura 7) (AULTON et al., 2005; ISLAM, GLADKI, 2008).

Os pós utilizados neste tipo de dispositivo são geralmente micronizados e caracterizam-se por elevada energia de superfície e baixa capacidade de fluxo. Dada sua natureza coesiva, alternativas foram desenvolvidas para desagregação das partículas. A mistura de partículas de fármaco à excipientes (do tipo carreadores como a lactose) de tamanho de partícula maior (30 a 60 μm), favorecem a liberação do fármaco pelo dispositivo de cedência e também promove a uniformidade no enchimento da cápsula durante o processo de produção da forma farmacêutica (CHAN, CHEW, 2003).

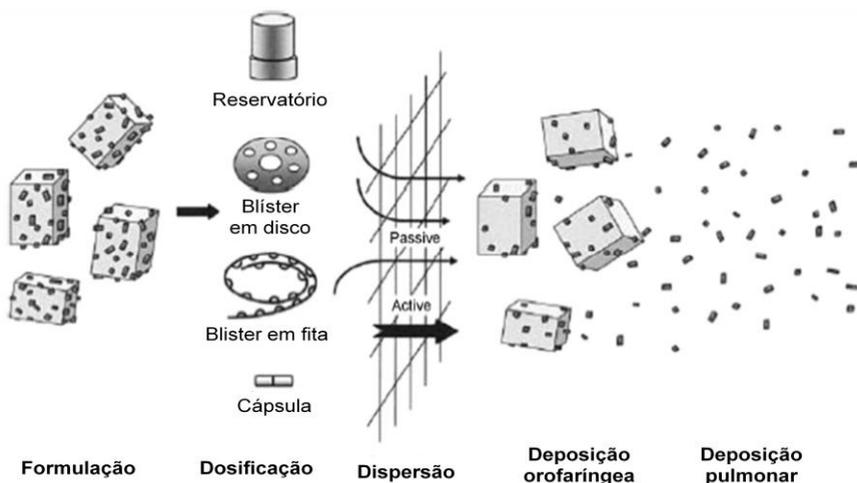


Figura 7. Funcionamento de um inalador de pó seco.

(Fonte: adaptado de PILCER, AMIGHI; 2010 *apud* TELKO, HICKEY, 2005).

A eficiente deposição pulmonar a partir de inaladores de pó seco requerem características físicas de partículas bem definidas, especialmente quanto ao tamanho de partícula, densidade e área superficial, já que estes fatores afetam diretamente o fluxo, manipulação e dispersibilidade do pó e, conseqüentemente, sua chance de deposição na região desejada dos pulmões (UNGARO et al., 2009). Açúcares como lactose, manitol, glicose e trealose são utilizados comercialmente como carreadores de fármacos em DPIs (PILCER, AMIGHI, 2010). Atualmente a lactose monoidratada ou anidra é o carreador mais utilizado neste tipo de dispositivo inalatório. Estima-se que apenas 20 ou 30% da dose disponível chegue aos pulmões nas formulações comerciais. Estudos com lactose amorfa sugerem que sua superfície altamente energética e irregular dificultem a desagregação do fármaco durante a inspiração e grande parte da dose permaneça retida na região orofaríngea, o que acarreta na baixa efetividade do sistema (PILCER, AMIGHI, 2010; TULI et al., 2012).

Outros tipos de carreadores têm sido estudados a fim de obter-se melhores características de superfície, como as

micropartículas lipídicas sólidas, nano- e micropartículas poliméricas (TULI et al., 2012; SILVA et al., 2013).

2.4 Sistemas microestruturados utilizados como carreadores de fármacos

Na indústria, a microencapsulação tem sido empregada no mascaramento de sabores e odores, aumento de estabilidade (proteção da luz, umidade, oxidação), minimização da irritação gástrica, administração de fármacos incompatíveis na mesma forma farmacêutica, melhoria das características de fluxo, além da obtenção de formas farmacêuticas de liberação modificada (SILVA et al., 2003).

Na área farmacêutica o termo “micropartícula” se refere a sistemas sólidos e esféricos de liberação de fármacos com tamanho micrométrico (1 a 1000 μm). Dependendo da técnica de preparação, são obtidas microesferas ou microcápsulas. As microcápsulas são sistemas vesiculares nos quais o fármaco está confinado em um núcleo geralmente oleoso envolto por uma membrana polimérica. As microesferas são sistemas matriciais onde o fármaco está dissolvido ou disperso em uma matriz lipídica ou polimérica (SILVA et al., 2003). Estudos propõem que a microencapsulação pode ser empregada tanto para fármacos hidrofóbicos, como a cisplatina, lidocaína, naltrexona e progesterona, como para fármacos hidrofílicos, como insulina, proteínas, peptídeos e vacinas (LI, ROUAUD, PONCELET, 2008).

As micropartículas podem ser utilizadas para veicular fármacos pela via parenteral, pulmonar, oral ou nasal, sendo capazes de promover a liberação controlada e sustentada do ativo encapsulado, além de protegê-lo da degradação e depuração fisiológica. Além disso, a modificação de sua superfície possibilita também vetorização a tecidos e células específicas (SILVA et al., 2003; FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005).

Várias técnicas podem ser utilizadas para obtenção de micropartículas. As principais são: emulsão/evaporação do solvente, nebulização (ou spray-drying), coacervação, extrusão/solidificação e polimerização. Além disso, parâmetros operacionais (velocidade de agitação, temperatura, volume, pressão), bem como a composição quali e quantitativa podem ter influência direta sobre as características finais das partículas (LI, ROUAUD, PONCELET, 2008).

2.4.1 Micropartículas poliméricas

Vários estudos têm demonstrado o potencial dos carreadores poliméricos na otimização do regime terapêutico. A vetorização de carreadores poliméricos pode permitir o controle da liberação do fármaco e a redução de administrações diárias, contribuindo para o controle de infecções locais crônicas, além de diminuir a incidência do fármaco na corrente sanguínea a fim de evitar a distribuição não-específica que resulta em efeitos colaterais. O carreador também oferece o potencial de associação de fármacos na mesma forma farmacêutica ou a combinação com adjuvantes funcionais (como promotores de absorção e agentes mucolíticos). Ainda, sugere-se que os carreadores poliméricos podem aumentar potencialmente o índice terapêutico de fármacos através do aumento de sua estabilidade durante o armazenamento da forma farmacêutica e também *in vivo*, além de possibilitar o aumento da quantidade de fármaco que chega ao sítio de ação e o prolongamento do tempo de residência *in situ*, estendendo o efeito farmacológico (UNGARO et al., 2012; VILOS, VELASQUEZ, 2012).

Micropartículas poliméricas são vantajosas para a administração pulmonar de fármacos, pois podem ser obtidas com características de aerossolização e deposição adequadas à liberação nos pulmões, no que diz respeito ao tamanho, densidade, porosidade e morfologia. Em especial, as micropartículas obtidas a partir de materiais poliméricos biodegradáveis representam uma estratégia bastante promissora, por serem sistemas bastante versáteis quanto ao tipo de molécula encapsulada, tamanho de partícula obtido, densidade, além de permitir o prolongamento da liberação, melhoria do fluxo e reprodutibilidade de dose. A administração deste sistema ocorre através da inalação das micropartículas na forma de pó seco, as quais são arrastadas pela corrente de ar inspirado com auxílio de um dispositivo similar aos comerciais (figura 8) (TULI et al., 2011). Após a deposição do carreador polimérico, há a liberação controlada do fármaco por difusão e/ou erosão do polímero (VILOS, VELASQUEZ, 2012).

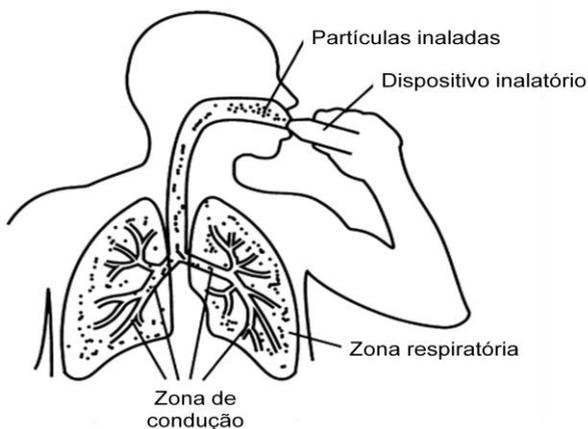


Figura 8. Administração pulmonar de fármacos através de DPI.
(Fonte: adaptado de DANIHER, ZHU, 2008).

Estudos têm mostrado que micropartículas porosas, caracterizadas por diâmetro geométrico alto ($> 5 \mu\text{m}$), baixa densidade ($< 0,4 \text{ g/mL}$) e baixo diâmetro aerodinâmico ($< 5 \mu\text{m}$), exibem perfis de deposição pulmonar ideais (YANG et al., 2009). Partículas de alta densidade ($> 1 \text{ g/mL}$) teriam que ter tamanho reduzido ($< 3 \mu\text{m}$) para atingir a mesma penetração pulmonar (KIM et al., 2012). Edwards e colaboradores (1998) avaliaram a influência de fatores como tamanho de partícula e densidade na otimização da eficiência de aerossóis para administração da insulina pela via pulmonar. Dois tipos de micropartículas constituídas de PLGA foram obtidos: pequenas e compactas (similares aos aerossóis convencionais) e grandes e porosas (partículas inovadoras), obtidas através das técnicas de emulsão simples e dupla, respectivamente. Ambas possuíam DAMM iguais a $2,15 \mu\text{m}$. A biodisponibilidade relativa após aerossolização das partículas na forma de pó seco aos pulmões de ratos foi avaliada. As partículas inovadoras demonstraram uma liberação de até 96 horas, com biodisponibilidade relativa de 87,5%, ou seja, 7 vezes superior àquela obtida pelas partículas de tamanho reduzido e sem poros, que apresentaram biodisponibilidade de 12% com liberação de 4 horas. Os autores atribuíram os resultados à (i) menor tendência de agregação das partículas de tamanhos maiores e de menor área de

contato inter-particular que, por sua vez, levou a uma menor quantidade de energia necessária para aerossolização durante a administração do medicamento, e à (ii) significativa redução da captura pelos macrófagos alveolares pelo tamanho superior de partículas. As partículas convencionais foram rapidamente fagocitadas, o que reduziu o seu potencial em controlar e sustentar a liberação da insulina. Neste segundo ensaio, após 48 horas da inalação, 17,5% dos macrófagos alveolares continham partículas pequenas e compactas no seu interior, enquanto que nos macrófagos dos ratos que tiveram a inalação das partículas grandes e porosas este valor foi de 4%.

As micropartículas poliméricas podem ser obtidas através de várias técnicas. A escolha da técnica depende da natureza do polímero, das características do fármaco, da duração da terapia e da via de administração, devendo esta também ser reprodutível, garantir a estabilidade do fármaco a ser encapsulado e permitir a obtenção de micropartículas de tamanho adequado, com alta eficiência de encapsulação e baixa concentração de solventes orgânicos no produto final (FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005; JAIN, 2000).

A emulsão/evaporação do solvente é uma técnica de obtenção de micropartículas bastante utilizada. Esta divide-se em emulsão simples ou dupla, e pode ser classificada em óleo em água (O/A), água em óleo (A/O), água em óleo em água (A/O/A), entre outras, dependendo da natureza das fases interna e externa (JAIN, 2000). Brevemente, na técnica de emulsão simples o/a o polímero é dissolvido em um solvente orgânico volátil onde o fármaco é também solubilizado (fase orgânica). Em seguida, esta solução é vertida em uma solução aquosa de maior volume contendo um surfactante (fase aquosa), sob agitação. As gotículas formadas solidificam à medida que o solvente é eliminado da fase interna da emulsão. Por fim, estas são lavadas, centrifugadas e liofilizadas até obtenção de um pó seco (WATTS, DAVIES, MELIA, 1990). As partículas obtidas neste processo são geralmente esféricas e compactas. Ainda, a técnica é pouco apropriada para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, que são particionados para a fase aquosa.

A técnica de dupla emulsão, geralmente empregada para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, como peptídeos e proteínas, também tem sido empregada como estratégia para a obtenção de

partículas porosas. Nesta técnica uma solução aquosa (fase aquosa interna) é adicionada a uma fase orgânica composta pelo polímero (fase oleosa) para formação de uma emulsão água em óleo (A/O). Essa emulsão é misturada a um volume maior de solução aquosa contendo surfactante hidrofílico (fase aquosa externa) a fim de se obter uma dupla emulsão (A/O/A). O solvente é evaporado e as partículas são centrifugadas, lavadas, filtradas e liofilizadas (JAIN, 2000; YANG, et al., 2000).

Várias técnicas são descritas na literatura para obtenção de partículas porosas, sendo as mais comuns a separação de fases, lixiviação de sais, e adição de agentes efervescentes e de indutores osmóticos. A formação de poros não somente permite a diminuição da densidade das partículas, mas também altera o perfil de liberação do fármaco, pois possibilita um maior intercâmbio do mesmo entre o meio interno e externo, modificando o seu gradiente de concentração, além de interferir na velocidade de degradação da matriz polimérica. Um esquema representativo dos métodos e mecanismos de formação de partículas porosas é mostrado na figura 9.

A separação de fases foi descrita por Giovagnoli e colaboradores (2007) para a obtenção de micropartículas porosas a partir do PLGA. Nesta técnica, uma solução aquosa do fármaco foi adicionada a uma solução do polímero em diclorometano e acetona. A emulsão primária (A/O) formada foi então injetada em uma solução aquosa de surfactante (PVA ou HPMC) sob agitação, formando uma dupla emulsão (A/O/A). Esta foi finalmente diluída em água e mantida sob agitação por 2 horas a fim de permitir a evaporação do solvente orgânico e diminuir a probabilidade de agregação entre as partículas em solidificação. A alta taxa de evaporação do solvente e extração da água da fase interna durante o endurecimento das micropartículas provocou a formação de poros e cavidades na matriz polimérica, reduzindo também a densidade das partículas (GIOVAGNOLI et al., 2007).

A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como um agente osmótico por Lee e colaboradores (2010) para a obtenção de micropartículas poliméricas porosas a partir do PLGA pela técnica da dupla emulsão. Neste caso, uma solução aquosa do BSA foi adicionada a uma solução polimérica em diclorometano e a mistura levada à agitação ultrasônica, formando uma emulsão primária A/O. Em seguida, a mistura foi adicionada a uma solução aquosa de

surfactante e submetida a homogeneização em alta velocidade, formando uma emulsão A/O/A. Presume-se que o BSA induza a osmose entre as fases aquosas interna e externa promovendo a penetração de água durante o processo de formação das partículas, deixando caminhos na matriz polimérica, e resultando na formação de poros uniformes na matriz. (LEE, et al., 2010).

Sais como cloreto de sódio também podem ser empregados como agentes porogênicos. Estes são dispersos na fase interna da emulsão e são lixiviados e dissolvidos na fase aquosa externa durante a formação das partículas, deixando poros na matriz polimérica. O cloreto de sódio pode agir ainda como agente osmótico, induzindo a entrada de água para o interior da partícula, atraída pelo maior gradiente de concentração (LEE, et al., 2010).

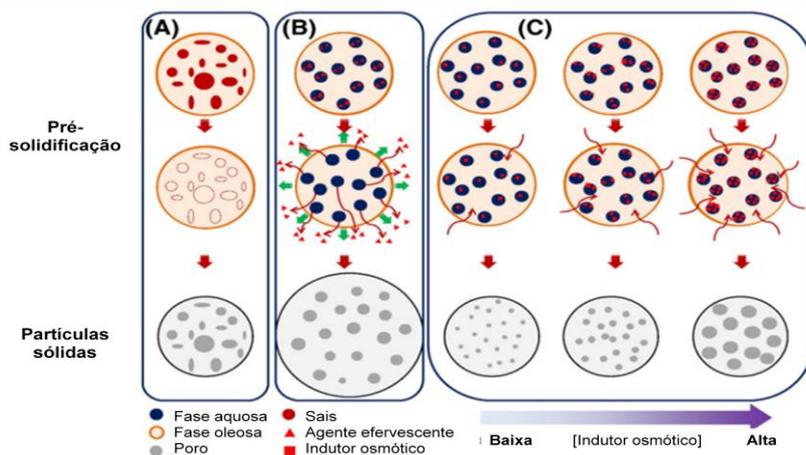


Figura 9. Formação de poros em micropartículas poliméricas. Em (A) lixiviação de sais; (B) formação de gás (agente efervescente); (C) indução osmótica. (Fonte: adaptado de LEE et al., 2010)

Partículas porosas também podem ser obtidas com a utilização de bicarbonato de amônio (ABC) como agente porogênico. Este sal é dissolvido na fase aquosa primária da formulação, quando a técnica de dupla emulsão é empregada. A formação de poros ocorre pela decomposição do bicarbonato de amônio com formação espontânea de gases dióxido de carbono e

amônia que escapam da matriz polimérica durante o período de extração do solvente, deixando cavidades nas partículas (KIM, CHUNG, PARK, 2006; YANG, et al., 2009).

Diversos estudos demonstram o emprego do ABC como agente porogênico na obtenção de micropartículas poliméricas porosas pela técnica da dupla emulsão. Oh e colaboradores (2011) obtiveram micropartículas de PLGA contendo o corticosteroide budesonida visando o tratamento da asma. A porosidade das partículas em estudo pôde ser controlada através da modificação da quantidade de ABC nas formulações, onde 0, 1,5 e 3,0% (m/V) foram empregados. A morfologia e o tamanho dos poros foram visivelmente afetados pela concentração crescente de ABC. Assim, a densidade e o diâmetro aerodinâmico das partículas porosas foram reduzidos em relação às partículas não porosas. Ensaio de liberação *in vitro* evidenciam a liberação controlada do fármaco por mais de 24 horas. Estudos *in vivo* em modelo murino de asma também foram conduzidos e demonstram com sucesso o efeito antiinflamatório do fármaco nos pulmões, com diminuição significativa de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar, além da diminuição da hiperresponsividade brônquica, em especial para as formulações contendo poros, que permaneceram por mais tempo no ambiente pulmonar. Resultados promissores foram encontrados também por Kim et al., 2012, na encapsulação da doxorubicina em micropartículas porosas constituídas de PLGA para o tratamento de câncer de pulmão, e Yoo et al., 2011, na encapsulação de antocianina para tratamento da DPOC em micropartículas porosas obtidas através da dupla emulsão.

2.5 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático sintético, de característica semicristalina. Seu baixo ponto de fusão, baixo custo de obtenção, capacidade de formação de blendas e boa biocompatibilidade têm estimulado sua aplicação no meio biomédico. A PCL pode ser obtida através de reações de polimerização por abertura de anel do monômero cíclico caprolactona (figura 10) em meio alcoólico contendo o catalisador octoato de estanho (WOODRUFF, HUTMACHER, 2010). É solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, benzeno e tolueno, sendo pouco solúvel em etanol e éter de petróleo. Possui

temperatura de transição vítrea em -60°C e de fusão entre 59 e 64°C (SINHA et al., 2004).

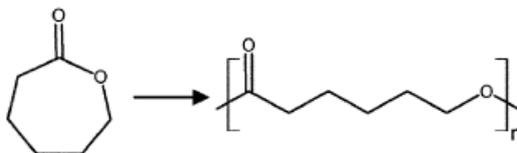


Figura 10. Reação de síntese do PCL.
(Fonte: ALBERTSSON, VARMA; 2003).

A PCL tem sido amplamente utilizada como matriz polimérica, no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos nano- e microestruturados, pois pertence a classe de polímeros biodegradáveis, juntamente com o poli(ácido-lático) (PLA), poli(ácido-glicólico) (PGA) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), que possuem um bom perfil de biocompatibilidade e biodegradabilidade (CHEN, WANG, 2000).

Os polímeros são considerados biodegradáveis quando sua degradação se dá pela ação ambiental, tanto por processos biocatalíticos (envolvendo bactérias, fungos, enzimas), quanto por processos químicos (hidrólise, oxidação, radiação UV) (EDLUND, ALBERTSSON, 2002). No caso da PCL, o rompimento das ligações éster da cadeia polimérica resultam em produtos de degradação compatíveis com meio fisiológico, como o ácido 6 – hidróxi capríco, que é eliminado via ciclo de Krebs (figura 11) (DHANVIJAY, SHERTUKDE, KALKAR, 2011).

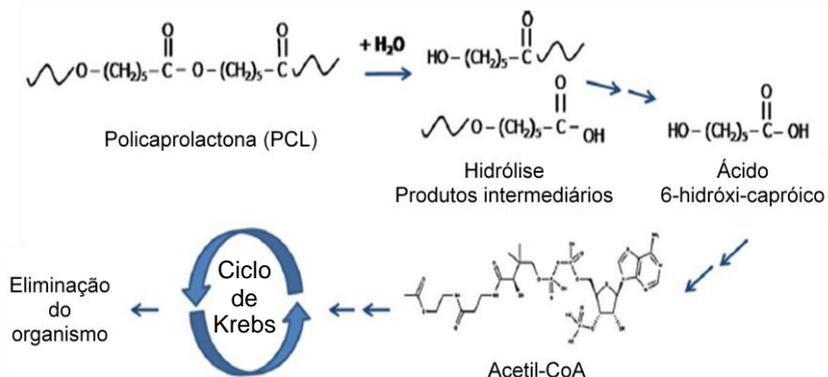


Figura 11. Processo de biodegradação do PCL.
(Fonte: WOODRUFF, HUTMACHER; 2010).

Estudos demonstraram que a degradação da PCL ocorre em duas etapas: uma etapa hidrolítica seguida de uma etapa enzimática. Inicialmente, ocorre a hidratação do polímero com clivagem de ligações éster da cadeia polimérica por hidrólise e erosão da superfície em contato com fluidos biológicos, formando oligômeros. Estudos sugerem que esta hidrólise inicia nos domínios amorfos do polímero e que sua velocidade está relacionada com a massa molecular do polímero. Assim, uma maior massa molecular implica em um número maior de quebras de ligações éster afim de formar monômeros/oligômeros solúveis em água necessitando, dessa forma, de um maior período de tempo para erosão e degradação do polímero. A segunda etapa, enzimática, ocorre quando o polímero apresenta características cristalinas e baixa massa molecular (inferior a 5000 ou 3000 g/mol). Fragmentos poliméricos encontrados no interior de fagolisossomos de macrófagos e células gigantes evidenciaram a natureza intracelular da degradação polimérica neste estágio (WOODRUFF, HUTMACHER, 2010).

A escolha de um polímero adequado para desenvolvimento de sistemas microparticulados de liberação de fármacos é importante, visto que este regula a liberação do fármaco encapsulado. Devido a sua degradação lenta, a PCL tem sido utilizada em sistemas de liberação prolongada, implantes e suturas. Sugere-se que a PCL

passa pelas fases de hidratação, degradação, perda de massa, metabolização e reabsorção num período de até 18 meses.

Diversos trabalhos vêm sendo publicados demonstrando a capacidade de utilizar a PCL para encapsular diferentes fármacos, hidrofílicos e hidrofóbicos, como o taxol, clonazepam, saquinavir, docetaxel, vimblastina, insulina, entre outros, para administração oral e parenteral (PEREZ et al., 2000; KUMARI et al., 2010; RAVAL et al., 2011). Várias técnicas tem sido utilizadas para a preparação das micropartículas com PCL, entre elas estão a emulsão simples e dupla seguida da evaporação do solvente, secagem por nebulização (*spray drying*), difusão do solvente a quente, e novas técnicas empregando fluidos supercríticos (SINHA et al., 2004).

Além da versatilidade no que se refere à técnica de preparação, este polímero apresenta as características de biocompatibilidade adequadas para a obtenção de micropartículas para liberação pulmonar. Tuli e colaboradores (2011) desenvolveram micropartículas de PCL como alternativa à lactose utilizada comercialmente como carreador. As partículas foram obtidas através da técnica de emulsão/evaporação do solvente e recobertas com o fármaco (sulfato de salbutamol). Em comparação à lactose, o recobrimento das micropartículas com adjuvantes ternários, como o estearato de magnésio e a leucina, diminuíram a força de adesão entre as partículas e aumentaram significativamente a fração de partículas finas emitida, neutralizando a ação do PVA superficial que mantinha as moléculas de fármaco aderidas às mesmas, aumentando, assim, a sua desagregação e a deposição pulmonar (TULI et al., 2011). Outros trabalhos envolvendo o uso da PCL para preparação de micropartículas destinadas à liberação pulmonar não foram encontrados na literatura, evidenciando o caráter inovador da presente proposta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

Álcool polivinílico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Alizarina (Sigma Aldrich, EUA)

Azitromicina diidratada (Pharma Nostra, Brasil)

Bicarbonato de amônio (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil)

Cloreto de sódio (Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brasil)

Fosfato de sódio monobásico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Fosfato de potássio dibásico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Policaprolactona Mw = 10.000 g/mol (Sigma Aldrich, EUA)

Polietilenoglicol 400 (Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brasil)

Poloxamer 188, Copolímero tribloco polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (Lutrol F-68 NF®, BASF, Alemanha).

3.1.2 Solventes, soluções e reagentes

Ácido Clorídrico 35% (Biotec Reagentes Analíticos, LabMaster, Brasil)

Ácido Fosfórico 85% (Vetec Química Fina, Brasil)

Acetonitrila P. A. (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Diclorometano P. A. (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil)

Dimetilsulfóxido P. A. (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil)

Hidróxido de Sódio (Cromoline Química Fina Ltda, Brasil)

Metanol grau HPLC (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Tween 80 (LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil)

3.1.3 Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento ARE (Velp Scientifica, Itália)

Agitador magnético com aquecimento Schott SLR (Schott Instruments, Alemanha)

Agitador tipo vortex KMC-1300V (Vision Scientific CO Ltda, EUA)

Aparelho para determinação da densidade de compactação (Pharmatron, EUA).

Balança analítica AS2000 (Ohaus Corporation, EUA)

Banho de ultrassom USC 700 (Unique Indústria e comércio de produto eletrônicos Ltda, Brasil)
Calorímetro exploratório diferencial DSC-50 (Shimadzu, Japão)
Centrifuga 4K15 Sigma (Sigma, EUA)
Criostato Leica CM1850 UV (Leica Microsystems, Alemanha)
Dissolutor modelo 299 (Nova Ética, Brasil)
Difratômetro à laser Mastersizer 2000 (Malvern, Inglaterra)
Difratômetro de raios-X X'Pert PRO (PANalytical, EUA) equipado com detector X'Celerator.
Espectrofotômetro de absorção de luz na região do UV/Visível UV 1800 (Shimadzu, Japão)
Homogeneizador ultrassônico UP 200S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha)
Homogeneizador a alta velocidade Ultra-Turrax T25 Basic (Ika Werke, Alemanha)
Liofilizador LD1500 (Terroni Equipamentos Científicos Ltda, Brasil)
Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV (Jeol Ltd., EUA)
pHmetro Oakton WD-35613-00 (Oakton, EUA)
Picnômetro a hélio manual Multipycnometer (Quantachrome Instruments, EUA)
Recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica Microsystems, EUA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudos preliminares de formulação

3.2.1.1 Preparação das micropartículas de policaprolactona pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente

As micropartículas poliméricas foram obtidas pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente (YANG et al., 2009). Uma solução de azitromicina e policaprolactona em diclorometano (fase orgânica) foi adicionada a uma solução aquosa contendo o agente porogênico (fase aquosa₁). Esta mistura foi submetida a agitação ultrassônica durante 1 minuto (amplitude de 50 % e ciclo de 1,0) para formação da emulsão primária (A/O). Em seguida, esta emulsão foi vertida em uma solução aquosa de PVA (fase aquosa₂) sob agitação magnética para formação da emulsão A/O/A e diluída com 150 mL de água destilada. A dupla emulsão formada foi mantida sob agitação magnética *overnight* para completa remoção

do solvente orgânico e solidificação das micropartículas. Estas foram centrifugadas 2500 rpm por 30 minutos, lavadas três vezes com água destilada e liofilizadas até obtenção de um pó seco. As amostras foram mantidas em dessecador até os ensaios de caracterização.

3.2.1.1.1 Seleção do tipo de agente porogênico

Dois tipos de agentes porogênicos foram testados: o bicarbonato de amônio e o cloreto de sódio. No primeiro caso, uma solução de bicarbonato de amônio (ABC) 1% (m/V) foi utilizada como fase aquosa 1, em um volume de 1,4 mL ou 2,8 mL. Quando o cloreto de sódio foi testado, este foi adicionado em ambas as fases de modo a criar um efeito osmótico. As formulações testadas para a avaliação do tipo de agente porogênico encontram-se demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Composição das formulações testadas para seleção do volume e tipo de agente porogênico.

Amostra	Fase aquosa 1			Fase orgânica		Fase aquosa 2		
	ABC 1% (m/V, mL)	NaCl 0,5% (m/V, mL)	NaCl 5% (m/V, mL)	PCL (mg)	DCM (mL)	PVA 1% (m/V, mL)	PVA 1% NaCl 5% (m/V, mL)	PVA 1% NaCl 0,5% (m/V, mL)
EP1	1,4	-	-	450	50	75	-	-
EP2	2,8	-	-	450	50	75	-	-
EP3	1,4*	-	-	450	50	75	-	-
EP4	-	1,4*	-	450	50	-	75	-
EP5	-	-	1,4*	450	50	-	-	75

Na Tabela: EP: ensaio preliminar; ABC: bicarbonato de amônio; NaCl: Cloreto de sódio; PCL: policaprolactona; DCM: diclorometano; PVA: álcool polivinílico. *Poloxamer 0,3% (m/V) em EP 3, 4 e 5.

3.2.1.1.2 Avaliação da concentração de surfactante hidrofílico

O efeito da concentração de PVA sobre as características finais das partículas foi avaliado. A tabela 2 mostra a composição das formulações testadas neste caso.

Tabela 2. Composição das formulações de micropartículas poliméricas para avaliação do efeito da concentração de PVA.

Amostra	Fase aquosa 1 ABC 1% em Poloxamer 188 1% (mL)	Fase orgânica			Fase aquosa 2		pH
		PCL (mg)	DCM (mL)	Azitromicina (mg)	PVA		
					% (m/V)	(mL)	
EP6	1,5	250	50	-	1,0	75	9,0
EP7	1,5	250	50	75	1,0	75	9,0
EP8	1,5	250	50	75	0,75	75	9,0
EP9	1,5	250	50	75	0,50	75	9,0

Na Tabela: EP: ensaio preliminar; ABC: bicarbonato de amônio; PCL: policaprolactona; DCM: diclorometano; PVA: álcool polivinílico.

3.2.1.1.3 Avaliação da quantidade inicial de azitromicina

Quatro diferentes quantidades iniciais de azitromicina foram testadas a fim de obter o melhor efeito em relação ao teor e eficiência de encapsulação. Para isto, as formulações apresentadas na tabela 3 foram avaliadas.

Tabela 3. Composição das formulações de micropartículas poliméricas para avaliação do efeito da quantidade inicial de azitromicina.

Amostra	Fase aquosa 1 ABC 1% em Poloxamer 188 1% (mL)	Fase orgânica			Fase aquosa 2	
		PCL (mg)	DCM (mL)	Azitromicina (mg)	PVA 0,75% (mL)	pH
EP10	1,5	250	50	100	75	10
EP11	1,5	250	50	150	75	10
EP12	1,5	250	50	200	75	10
EP13	1,5	250	50	250	75	10
EP14	1,5	250	50	200	75	10

Na Tabela: EP: ensaio preliminar; ABC: bicarbonato de amônio; PCL: policaprolactona; DCM: diclorometano; PVA: álcool polivinílico.*EP14 com agitação da emulsão A/O/A em ultraturrax a 17.500 rpm por 30 segundos.

3.2.2 Estudo de formulação de micropartículas de policaprolactona por delineamento estatístico fatorial

3.2.2.1 Preparação das micropartículas porosas de policaprolactona pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente

As micropartículas poliméricas foram obtidas pela técnica de dupla emulsão (YANG et al., 2009). Uma solução contendo bicarbonato de amônio 1% (m/V) e Poloxamer 188 1% (m/V) (fase aquosa₁) foi adicionada a uma solução orgânica contendo 150 mg de azitromicina e 250 mg de policaprolactona em diclorometano (fase orgânica). Esta mistura foi submetida à agitação ultrassônica com amplitude de 50% e ciclo de 1,0 durante 1 minuto para formação da emulsão primária (A/O). Em seguida, esta emulsão foi vertida em 75,0 mL de uma solução aquosa de PVA (fase aquosa₂) sob agitação magnética para formação da emulsão A/O/A. Em seguida, a emulsão foi submetida à agitação a alta velocidade em aparelho Ultraturrax a 17.500 rpm durante 1 minuto. A dupla emulsão formada foi mantida sob agitação magnética *overnight* para completa remoção do solvente orgânico e solidificação das micropartículas. Estas foram centrifugadas a 2500 rpm por 30 minutos, lavadas três vezes com água destilada alcalinizada e liofilizadas até obtenção de um pó seco. As amostras foram mantidas em dessecador até os ensaios de caracterização. Um esquema representativo da metodologia empregada para formulação pode ser observado na figura 12.

Micropartículas brancas (sem fármaco) foram obtidas nas mesmas condições, suprimindo a azitromicina da fase orgânica.

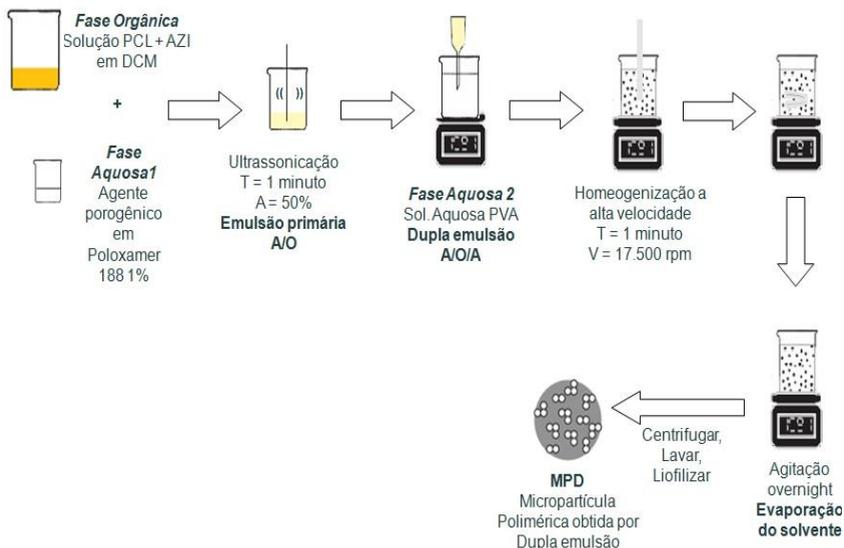


Figura 12. Representação gráfica da técnica de preparação das micropartículas poliméricas por dupla emulsão.

3.2.2.2 Planejamento fatorial

Uma análise fatorial foi realizada com o intuito de avaliar o efeito de variáveis de formulação sobre as características de teor e diâmetro aerodinâmico médio de massa (DAMM). O planejamento fatorial utilizado foi um delineamento com dois níveis e três fatores (2^3), do tipo completo, onde todas as possíveis combinações dos níveis foram utilizadas, resultando em 8 formulações, cada uma com duas replicatas. Os seguintes parâmetros de formulação foram avaliados: saturação da fase aquosa 2 com diclorometano (não ou sim), previamente à formulação, pH da fase aquosa 2 (pH 6 ou 10) e volume da fase orgânica (5 mL ou 25 mL). O planejamento fatorial foi realizado utilizando o software Statistica 7 (StatSoft Inc., Estados Unidos). Os fatores e níveis utilizados encontram-se descritos na tabela 4 e suas combinações possíveis são apresentadas na tabela 5. As 8 formulações resultantes estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 4. Variáveis independentes e seus níveis utilizados no delineamento fatorial 2³.

Fatores	Saturação da fase aquosa 2	pH da fase aquosa 2	Volume da fase orgânica (mL)
Nível (-1)	Não	6,0	5,0
Nível (+1)	Sim	10,0	25,0

Tabela 5. Delineamento fatorial 2³ utilizado para obtenção das micropartículas.

Amostra	Saturação da fase aquosa externa	pH da fase aquosa externa	Volume da fase orgânica
MPD 1	-1	-1	-1
MPD 2	1	-1	-1
MPD 3	-1	1	-1
MPD 4	1	1	-1
MPD 5	-1	-1	1
MPD 6	1	-1	1
MPD 7	-1	1	1
MPD 8	1	1	1

Tabela 6. Composição das formulações de micropartículas poliméricas preparadas pela técnica de dupla emulsão.

Amostra	Fase aquosa 1	Fase orgânica			Fase aquosa 2		
	ABC 1% em Poloxamer 188 1% (mL)	PCL (mg)	DCM (mL)	Azitromicina (mg)	PVA 0,75 % (mL)	pH	Sat.
MPD 1	0,5	250	5,0	150	75,0	6,0	Não
MPD 2	0,5	250	5,0	150	75,0	6,0	Sim
MPD 3	0,5	250	5,0	150	75,0	10,0	Não
MPD 4	0,5	250	5,0	150	75,0	10,0	Sim
MPD 5	0,5	250	25,0	150	75,0	6,0	Não
MPD 6	0,5	250	25,0	150	75,0	6,0	Sim
MPD 7	0,5	250	25,0	150	75,0	10,0	Não
MPD 8	0,5	250	25,0	150	75,0	10,0	Sim

Na Tabela: MPD: micropartículas poliméricas preparadas por dupla emulsão; ABC: bicarbonato de amônio; PCL: policaprolactona; DCM: diclorometano; PVA: álcool polivinílico; Sat: saturação da segunda fase aquosa com diclorometano.

3.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da azitromicina por espectroscopia de absorção no visível

O teor e eficiência de encapsulação da azitromicina nas micropartículas foram estimados após análise do fármaco por espectroscopia de absorção no visível, basendo-se na reação de complexação com a alizarina (1,2–diidroxi–9,10– antracenediona).

3.2.3.1 Otimização das condições de complexação entre a alizarina e a azitromicina em solução

O método analítico colorimétrico baseado na complexação da azitromicina com a alizarina foi investigado, buscando estabelecer as condições mais favoráveis para obtenção de uma coloração intensa e apropriada para a determinação quantitativa do fármaco em análise. O complexo foi caracterizado e a reação foi avaliada quanto à estequiometria e concentração de alizarina empregada, mecanismo e tempo de reação.

3.2.3.1.1 Avaliação da estequiometria da reação

O método de variação contínua (ou método de Job) foi empregado para determinar a estequiometria da reação de formação do complexo fármaco-ligante em solução metanólica por espectrofotometria de absorção no visível. Neste ensaio, foram preparadas misturas de soluções de fármaco e de ligante em que a concentração final das espécies permaneceu constante, variando apenas as frações molares entre estas, de forma compensatória. As soluções estoque foram preparadas previamente, sendo uma solução de alizarina 0,002M em dimetilsulfóxido (DMSO) e uma solução metanólica de azitromicina, na mesma concentração molar. Para o ensaio alíquotas da solução de azitromicina foram transferidas para balões volumétricos de 25,0 mL. Em seguida, alíquotas da solução de alizarina foram adicionadas, mantendo o volume final da mistura em 4,0 mL. A mistura foi submetida a sonicação e o volume foi completado a 25,0 mL com metanol, conforme tabela 7.

Tabela 7. Misturas feitas a partir de soluções estoque de azitromicina 0,002 M e alizarina 0,002M.

Fração molar Azitromicina	Solução de Azitromicina 0,002M (mL)	Solução de Alizarina 0,002M (mL)	Volume total da mistura (mL)	Volume total da solução (mL)
0,000	0,0	4,0	4,0	25,0
0,125	0,5	3,5	4,0	25,0
0,250	1,0	3,0	4,0	25,0
0,375	1,5	2,5	4,0	25,0
0,500	2,0	2,0	4,0	25,0
0,625	2,5	1,5	4,0	25,0
0,750	3,0	1,0	4,0	25,0
0,875	3,5	0,5	4,0	25,0
1,000	4,0	0,0	4,0	25,0

Após cinco minutos, a absorvância de cada solução foi lida em duplicata no comprimento de onda de 536 nm contra uma solução contendo somente alizarina diluída em metanol na mesma proporção, utilizada como branco. Gráficos absorvância *versus* fração molar de fármaco foram plotados, adicionando-se uma linha de tendência. A estequiometria foi dada pelo ponto em que a mistura apresenta o efeito máximo (maior absorvância). Este ponto de maior efeito foi utilizado também para selecionar a concentração de alizarina utilizada para os demais ensaios.

A lei de Lambert-Beer foi utilizada para o cálculo da absorvância molar do complexo azitromicina-alizarina nestas condições, conforme a equação 3.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad \text{Equação 3}$$

onde A é a absorvância, ε é a absorvância molar (dada em $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b é o caminho óptico (cm) e C é a concentração (mol/L).

3.2.3.1.2 Avaliação do tempo de reação

O tempo de reação foi avaliado sobre a absorvância do complexo formado em solução. Para isto, soluções estoque de

azitromicina 500 µg/mL em metanol e de alizarina 384 µg/mL em dimetilsulfóxido foram preparadas separadamente. Alíquotas da solução de azitromicina foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, aos quais foram adicionados 1,0 mL da solução de alizarina e o volume completado com metanol, a fim de se obter uma solução de concentração final igual a 60 µg/mL de azitromicina. A solução foi estocada em frascos âmbar e em tempos definidos (0,1; 1; 2; 3 e 4 horas) a absorvância do complexo formado foi lida em espectrofotômetro Shimadzu 1800 (Shimadzu, Japão) a 536 nm contra uma solução de alizarina 38,4 µg/mL como branco. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em concentração de azitromicina (µg/mL) versus tempo.

3.2.3.1.3 Caracterização do complexo azitromicina-alizarina por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em espectrofômetro Perkin Elmer FT-IR/NIR (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Cerca de 20 mg de azitromicina, alizarina ou o complexo obtido após ter sido levado a secura em temperatura ambiente foram avaliados em entre 4000 e 600 cm^{-1} .

3.2.3.2 Validação da metodologia analítica de quantificação da azitromicina por espectroscopia de absorção no visível

Buscando demonstrar que o método é apropriado para o fim que se destina, a metodologia de quantificação do fármaco foi validada para os parâmetros indicados pelo ICH Q-2B (2005): especificidade, linearidade, exatidão, precisão e determinação dos limites de detecção e quantificação.

3.2.3.2.1 Especificidade

Cerca de 50,0 mg de micropartículas brancas e contendo fármaco foram exatamente pesados e transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL. Em seguida, 1,0 mL de dimetilsulfóxido foi adicionado e o volume foi completado com metanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi coletado. Uma alíquota de sobrenadante foi transferida para um novo balão volumétrico de 10,0 mL contendo 1,0 mL da solução de alizarina 384 µg/mL em dimetilsulfóxido e o volume foi completado

com metanol. Espectros de varredura entre 300 e 900 nm foram então obtidos em espectrofotômetro de absorção Shimadzu UV 1800 (Shimadzu Co., Japão) usando uma solução de alizarina 38,4 µg/mL, diluída nas mesmas condições, como branco.

3.2.3.2.2 Linearidade, limites de detecção e de quantificação

Para avaliar a linearidade do método analítico desenvolvido, foram construídas três curvas de calibração do fármaco em três dias diferentes. Para isto, uma solução de azitromicina 1,0 mg/mL foi preparada pesando-se 25,0 mg de padrão e dissolvendo-o em 25 mL de metanol, observando a correção da massa molecular do fármaco que encontra-se na forma de diidrato. Uma solução reagente de alizarina 384 µg/mL foi preparada separadamente, pesando-se 19,2 mg de alizarina e transferindo-a para um balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com dimetilsulfóxido e a solução foi mantida em frasco âmbar até as análises.

Alíquotas da solução metanólica de azitromicina 1,0 mg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL de modo a obter soluções padrões nas concentrações 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 e 70,0 µg/mL. A estas soluções foi adicionado 1,0 mL da solução de alizarina e o volume foi completado com metanol. Em seguida, as soluções foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu UV 1800 (Shimadzu Co., Japão) a 536 nm, usando uma solução de alizarina 38,4 µg/mL com branco. A média das absorbâncias referentes a cada concentração foram utilizadas para construção de uma curva de calibração e a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados pela análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados conforme as equações 4 e 5, respectivamente:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S} \quad \text{Equação 4}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \quad \text{Equação 5}$$

onde LD é o limite de detecção e LQ é o limite de quantificação, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta e S é a inclinação da reta.

3.2.3.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da técnica da adição do padrão. Cerca de 50 mg de partículas contendo fármaco (formulação MPD 5) foram exatamente pesadas e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL. Alíquotas de uma solução metanólica de azitromicina 25 mg/mL foram adicionadas aos balões em concentrações de fármaco correspondentes a 35,0; 50,0 e 65,0 $\mu\text{g/mL}$ (níveis baixo, médio e alto, respectivamente). Em seguida, 1,0 mL de DMSO foi adicionado a cada um dos balões volumétricos e o volume final completado com metanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 2500 rpm. Alíquotas do sobrenadante foram então transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, aos quais foram adicionados 1,0 mL da solução de alizarina 384 $\mu\text{g/mL}$ e o volume completado com metanol. A absorvância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 536 nm contra uma solução de alizarina 38,4 $\mu\text{g/mL}$, diluída nas mesmas condições. Os resultados foram expressos em termos de recuperação de fármaco (%) e desvio padrão relativo (DPR%).

3.2.3.2.4 Precisão

Para avaliação da precisão do método, cerca de 50,0 mg de partículas contendo fármaco foram exatamente pesados e transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL aos quais foram adicionados 1,0 mL de dimetilsulfóxido e o volume foi completado com metanol. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e 1,0 mL da solução de alizarina 384 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionada a cada um dos balões e o volume foi completado com metanol. As absorvâncias das soluções foram então lidas em espectrofotômetro a 536 nm contra uma solução de alizarina 38,4 $\mu\text{g/mL}$, usada como branco. A repetibilidade (precisão intradia) do método foi avaliada pela análise de seis amostras mesmo dia. A precisão intermediária (precisão interdía) foi verificada pela análise de três amostras em três dias diferentes. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR%).

3.2.3.3 Determinação do teor de fármaco encapsulado e da eficiência de encapsulação nas micropartículas

Cerca de 50,0 mg de micropartículas foram exatamente pesadas e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL. Em cada um dos balões foi adicionado 1,0 mL de dimetilsulfóxido e o volume foi completado com metanol. A mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante contendo o fármaco foi coletado. Uma alíquota de sobrenadante foi então transferida para um novo balão volumétrico de 10,0 mL e 1,0 mL da solução de alizarina 384 µg/mL foi adicionada a cada um dos balões e o volume completado com metanol. A absorvância das soluções resultantes foi lida em espectrofotômetro de absorção Shimadzu UV 1800 (Shimadzu Co., Japão) a 536 nm, usando uma solução metanólica de alizarina 38,4 µg/mL como branco.

O teor de azitromicina foi expresso em mg de fármaco encapsulado por 100 mg de micropartículas e a eficiência de encapsulação (EE%) foram calculados conforme equações 6 e 7, respectivamente:

$$Teor = \left(\frac{C_{AZI}}{m} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

$$EE\% = \left(\frac{Teor}{AZI_{teórica}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 7}$$

onde C_{AZI} é a concentração de azitromicina obtida experimentalmente; m é a massa (g) de micropartículas e $AZI_{teórica}$ é a quantidade de azitromicina teoricamente encapsulada em 100 mg de micropartículas, considerando a massa inicialmente adicionada às formulações.

3.2.4 Caracterização físicoquímica das partículas

3.2.4.1 Avaliação da morfologia

A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio JEOL JSM-6390LV (Jeol, EUA) utilizando voltagem de 10 kV. As amostras liofilizadas foram fixadas em fita de carbono dupla face sobre suportes de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA).

Micrografias das partículas foram obtidas nos aumentos de 800, 1200 e 5000 vezes.

As micropartículas foram analisadas também quanto a sua microestrutura interna. Para isto, cortes de 5 µm de espessura feitos em criostato Leica CM 1850 UV (Leica Microsystems, Alemanha) após congelamento das amostras em matriz apropriada (Tissue-Tek) por 1 hora a -20°C. Os cortes foram cuidadosamente transferidos para suportes de alumínio, recobertos com fina camada de ouro e observados por MEV.

3.2.4.2 Determinação da densidade bruta e de compactação

A densidade bruta e de compactação foram avaliadas conforme descrito na Farmacopéia Européia IV (2002). Para isso, uma massa conhecida de partículas foi adicionada a uma proveta graduada e o volume inicial em repouso foi registrado. As micropartículas foram então submetidas a compactação por meio de 1250 batidas em aparelho de determinação da densidade de compactação (Pharmatron, EUA). A densidade aparente e de compactação (g/mL) foram então determinadas conforme as equações 8 e 9, respectivamente.

$$d_{aparente} = \frac{m}{v_1} \quad \text{Equação 8}$$

$$d_{compactação} = \frac{m}{v_2} \quad \text{Equação 9}$$

onde m é a massa de partículas pesadas para o ensaio (em gramas), v_1 é o volume inicial ocupado pelas micropartículas na proveta (em mL) e v_2 é o volume de pó ocupado na proveta após compactação (em mL).

3.2.4.3 Avaliação do fluxo

Neste trabalho, as propriedades de fluxo das micropartículas foram avaliadas através do índice de Carr (IC) ou índice de compressibilidade. Este expressa, em forma percentual, a capacidade de compactabilidade e compressibilidade de um pó ou granulado, conforme a seguinte equação:

$$IC = \frac{\rho_c - \rho_a}{\rho_c} \cdot 100 \quad \text{Equação 10}$$

onde ρ_c é a densidade de compactação e ρ_a é a densidade aparente de uma massa de partículas. Em seguida, o fluxo foi classificado conforme descrito na tabela 8 (AULTON, 2005; UNGARO et al., 2009).

Tabela 8. Classificação entre fluxo e Índice de Carr.

Fluxo	Índice de Carr (%)
Excelente	5 – 12
Bom	12 – 18
Razoável	18 – 21
Ruim/fluido	21 – 25
Ruim/coesivo	25 – 32
Muito ruim	32 – 38
Extremamente ruim	> 40

3.2.4.4 Determinação da densidade real (esquelética) das micropartículas

A densidade real (ou esquelética) das micropartículas foi determinada em picnômetro manual a hélio (Multypicnometer QuantaChrome Instruments, EUA). Este equipamento permite através da razão de pressões de hélio em duas células determinar o volume de uma determinada massa de material. Para isto, cerca de 500 mg de micropartículas foram pesados e inseridos em cápsula de 4,5 cm³ e o volume da amostra foi registrado. As análises foram feitas cinco vezes para cada amostra e a densidade esquelética média (g/mL) foi calculada.

3.2.4.5 Determinação do tamanho médio e distribuição granulométrica

O tamanho e distribuição granulométrica das micropartículas foram avaliados pela técnica de difração a laser em um equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido). Para análise, cerca de 20 mg de micropartículas liofilizadas foram resuspendidas em solução aquosa de Tween 80 a 0,5% (m/V) e sonicadas por 2,0 minutos anteriormente à análise. A distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de Fraunhofer e expressa em diâmetro (μm) por volume de partículas

acumulado em 10% (d_{10}), 50% (d_{50}) e 90% (d_{90}), assim como pelo diâmetro médio ($d_{4,3}$) e pelo valor de span. O valor de span expressa a polidispersão das partículas analisadas, segundo a equação 11:

$$span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad \text{Equação 11}$$

3.2.4.6 Determinação do diâmetro aerodinâmico mássico médio (DAMM):

O diâmetro aerodinâmico mássico médio foi determinado conforme descrito por Arnold et al., (2007), usando a seguinte equação:

$$DAMM = d_{geométrico} \cdot \left(\frac{\rho_{partícula}}{\rho_{ref} \cdot \gamma} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 12}$$

onde DAMM é o diâmetro aerodinâmico, $d_{geométrico}$ é o diâmetro geométrico, $\rho_{partícula}$ é a densidade esquelética das partículas, ρ_{ref} é a densidade de referência para a partícula (1g/mL) e γ é o fator de formato ($\gamma = 1$ se a partícula for esférica).

O software MPPD (*Multiple-Path Particle Dosimetry model* v2.11, ARA Inc., Estados Unidos) foi utilizado para simulação dos perfis de deposição das partículas nos pulmões. As frações depositadas por região (cabeça, traqueobronquial e pulmonar), além da região pulmonar (central ou periférica) foram estimadas utilizando os parâmetros respiratórios: modelo humano, colocado na posição ereta, de respiração pela boca (onde a boca é considerado como o único local de deposição na porção extratorácica), 5 movimentos respiratórios por minuto, volume tidal de 700 mL, com pausa de 2 segundos entre inalação e expiração do ar (KIM et al., 2008; SILVA et al., 2013).

3.2.4.7 Análise térmica

O comportamento térmico das micropartículas (brancas e com fármaco) e dos compostos puros (azitromicina e policaprolactona)

foram analisados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por termogravimetria (TG).

As análises de DSC foram realizadas utilizando um equipamento Shimadzu DSC-60 (Kyoto, Japão). Para isto, cerca de 2 mg das amostras foram exatamente pesados em cadinhos de alumínio, as quais foram mantidos abertos e submetidos ao aquecimento de 30°C até 250°C, numa razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Um cadinho de alumínio vazio foi utilizado como referência. As temperaturas de fusão foram obtidas a partir das curvas termoanalíticas, e a entalpia de fusão a partir da área do pico de fusão correspondente. A cristalinidade relativa do polímero na matriz das micropartículas foi calculada utilizando a equação 13.

$$CR \% = \frac{\Delta H_{MPD}}{\Delta H_{MP}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

onde CR% é a cristalinidade relativa do polímero constituinte da matriz das micropartículas, ΔH_{MPD} é a entalpia de fusão do polímero constituinte da matriz das micropartículas, excluindo-se a entalpia relativa ao fármaco encapsulado, e ΔH_{MP} é a entalpia de fusão do polímero puro, como matéria-prima (GUARINO et al., 2009).

As análises termogravimétricas da foram realizadas em termobalança Shimadzu TGA-50 (Kyoto, Japão) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min. Cerca de 2 mg de amostra foram utilizadas na análise em cadinho de platina. A razão de aquecimento utilizada foi de 10°C/min até 300°C.

3.2.4.8 Difração de Raios-X

Amostras em pó de matérias-primas (azitromicina e policaprolactona) e de micropartículas liofilizadas (brancas e com fármaco) foram analisadas quanto a seu perfil cristalino em difratômetro de Raios-X X'Pert PRO equipado com detector X'Celerator (PANanalytical, Holanda) e tubo de cobre (CuK α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), cujo fluxo é definido pela voltagem de 45 kV e intensidade de corrente de 40 mA. A configuração utilizada foi formada por tubo de cobre, fenda soller de 0,04 rad, fenda divergente de 1/4°, máscara de 10 mm, fenda anti-espalhamento de 1/2°, porta amostra, fenda antiespalhamento 5 mm, fenda soller de

0,04 rad, filtro de níquel, e detector X'CeLerator. As amostras foram apropriadamente adicionadas a um porta amostra e analisadas a temperatura ambiente nos ângulos (2θ) de 4° a 50° com passo de $0,03^\circ/\text{segundo}$.

Estas análises foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos, no Laboratório de Difração de Raios-X (LDRX) da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.4.9 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos utilizando um equipamento FT-IR/NIR Spectrometer PerkinElmer (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Cerca de 20 mg dos componentes puros e das micropartículas liofilizadas foram analisados e as leituras das amostras foram efetuadas entre 4000 e 600 cm^{-1} .

3.2.5 Avaliação do perfil de liberação da azitromicina a partir das micropartículas

3.2.5.1 Avaliação da solubilidade da azitromicina em tampão fosfato

A solubilidade da azitromicina em tampão fosfato $0,05\text{M}$ pH $7,4$, meio escolhido para o ensaio de liberação, foi determinada. Para isto, 10 mL de tampão foram adicionados a frascos âmbar contendo azitromicina em excesso. As misturas foram mantidas em temperatura ambiente sob agitação magnética e após 48 horas foram centrifugadas por 30 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE, conforme metodologia previamente validada. A solubilidade do fármaco foi expressa em mg de azitromicina por mL de tampão fosfato.

3.2.5.2 Otimização de metodologia analítica para quantificação da azitromicina em tampão fosfato por CLAE

A azitromicina liberada das micropartículas no ensaio de dissolução *in vitro* foi quantificada por CLAE, baseada na metodologia indicada por Ghari e colaboradores (2013). A metodologia analítica foi otimizada utilizando-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos), acoplado a detector UV/Vis ajustado para 210 nm , bomba binária e amostrador automatizado. A fase estacionária

utilizada foi uma coluna em fase reversa C18 Phenomenex (Torrence, CA) Hyperclone (150 mm x 4,6 mm; 5 µm). A fase móvel empregada foi uma mistura (80:20 v/v) de metanol:tampão fosfato 0,02 M com pH ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio. A eluição foi feita isocraticamente a 25 °C com fluxo de 1,2 mL/min e o volume injetado foi 10 µL.

3.2.5.2.1 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Para avaliação da linearidade do método, curvas padrão foram construídas em três dias diferentes. Para isto, uma solução padrão de azitromicina 250,0 µg/mL em tampão fosfato 0,05M pH 7,4 foi diluída no mesmo solvente a fim de obter soluções nas concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 40,0; 80,0; 150,0 e 250,0 µg/mL. As soluções foram analisadas por CLAE e a média das áreas dos picos referentes a cada concentração de azitromicina foram utilizadas para construção de uma curva de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados pela análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados conforme descrito em 3.4.1.2.2.

3.2.5.3 Ensaio de liberação

O perfil de liberação da azitromicina encapsulada nas micropartículas foi determinado pela técnica de difusão através de membrana de diálise em aparelho dissolutor Nova Ética 299 acoplado ao aparato USP II (pá) contendo 250 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4, mantido sob agitação constante a 75 rpm a 37°C (UNGARO et al., 2009). Em intervalos de tempo pré-determinados alíquotas do meio de liberação foram retiradas e analisadas por CLAE, conforme metodologia analítica previamente validada. Após cada coleta, o volume removido foi repostado com tampão fresco. A partir dos resultados, curvas de percentual de azitromicina liberada *versus* tempo foram construídas e o modelo de liberação foi caracterizado. Ainda, a eficiência de dissolução (ED%) foi estimada através da equação 14.

$$ED\% = \frac{ASC}{Área_r} \cdot 100 \quad \text{Equação 14}$$

onde ASC é a área determinada pelo perfil de dissolução, Área_r é a área do retângulo (entre abscissa e ordenada utilizados para traçar o perfil de dissolução).

3.2.6 Análise estatística

As diferentes formulações testadas foram avaliadas estatisticamente quanto ao tamanho, densidade e teor de fármaco e também quanto a velocidade de liberação através da análise da variância (ANOVA) com auxílio do software STATISTICA7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação das micropartículas poliméricas contendo azitromicina para liberação pulmonar

4.1.1 Estudos preliminares de formulação

Diversas técnicas têm sido empregadas para a obtenção de sistemas microestruturados poliméricos visando a liberação pulmonar de fármacos. Como exemplos, podemos citar o *spray-drying* e a dupla emulsão (YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Estas técnicas permitem o controle de características físicas importantes para uma maior eficiência do aerossol farmacêutico. No contexto da administração pulmonar de fármacos, sabe-se que partículas de diâmetro próximo a 10 μm , baixa densidade e boas características de fluxo são bastante desejadas, a fim de promover a aerossolização e deposição adequadas do sistema de liberação nos pulmões (ARNOLD et al., 2007; UNGARO et al., 2009). Neste trabalho, a técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente foi empregada para obtenção de micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina para liberação pulmonar. Quando esta técnica é usada, a formação das microesferas pode ser influenciada por diversos fatores, sendo que a estrutura final e a composição das partículas são resultantes de uma complexa contribuição das características físicas e físico-químicas do polímero, fármaco, solvente e agentes emulsificantes. Ainda, visando a administração pulmonar, a utilização de agentes formadores de poros tem sido amplamente testada, visto que tal estratégia permite a redução da densidade das partículas e obtenção de pós com características adequadas e aerossolização. Neste sentido, várias formulações foram inicialmente testadas buscando estudar os fatores mais importantes que afetam as características finais das partículas. Assim, a quantidade inicial de fármaco e de PCL adicionados à formulação foi testada, bem como a concentração de surfactante hidrofílico na fase aquosa externa. O cloreto de sódio (NaCl) e o bicarbonato de amônio (ABC) foram testados como agentes porogênicos. As micropartículas foram caracterizadas quanto à morfologia, tamanho e teor de fármaco.

Micropartículas brancas (sem fármaco) foram inicialmente preparadas para avaliar o efeito do tipo de agente porogênico sobre as características finais das mesmas. O bicarbonato de amônio (ABC) 1% (m/V) foi utilizado como agente porogênico nas

formulações EP1, EP2 e EP3. O ABC atua como agente efervescente, levando à formação de gás no interior das partículas e à formação de canalículos (poros) ao ser eliminado da matriz polimérica. O cloreto de sódio, por sua vez, agiria como um agente indutor de osmose, promovendo a migração da água do local de menor concentração para o de maior concentração (Nasr et al., 2011). Este composto foi testado nas formulações EP4 e EP5. Os resultados de tamanho de partícula são apresentados na Tabela 9. As micrografias obtidas para estas formulações podem ser visualizadas nas figuras 13 e 14.

As partículas apresentavam-se na forma de um pó seco, bastante fino e homogêneo, de coloração branca. Para as formulações EP1 e EP2 foram obtidas micropartículas esféricas e ovaladas, de superfície bastante lisa (figura 13). Os tamanhos médios de partícula foram 22,23 μm e 38,20 μm para EP1 e EP2, respectivamente.

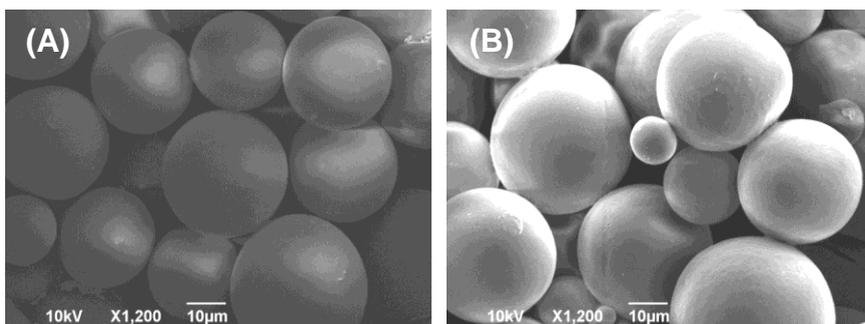


Figura 13. Fotomicrografias das formulações preliminares (A) EP1 e (B) EP2.

Para as formulações posteriores, a adição de um surfactante à fase aquosa primária foi avaliada, buscando a estabilização da emulsão primária durante a formulação. Logo, a combinação entre span 80 e tween 80 foi testada a 0,2% (m/V), porém partículas de formato irregular foram obtidas (dados não mostrados). Em seguida, o poloxamer 188 foi adicionado a 0,3% (m/V) e bons resultados foram obtidos. Coccoli e colaboradores (2007) demonstraram que quando micropartículas de PCL são preparadas pela mesma técnica, a utilização de maiores concentrações de surfactante hidrofílico na fase aquosa primária evitou a coalescência das

cavidades formadas internamente, levando à obtenção de uma microestrutura interna com poros menores.

Micropartículas esféricas foram obtidas para as formulações EP 3 a 5, indicando que a adição do surfactante à fase aquosa mais interna promoveu a manutenção da emulsão primária. Entretanto, partículas “ocas” com poucos poros foram visualmente obtidas para as formulações EP3 e EP5 (figura 14A e 14C), enquanto que em EP 4, preparadas com NaCl em baixa concentração na fase aquosa primária, a característica “oca” não foi observada (figura 14B). O tamanho médio destas micropartículas variou de 30 μm a 54 μm , o que é considerado elevado para uma administração pulmonar (tabela 9).

Tabela 9. Tamanho geométrico médio das formulações brancas para avaliação do tipo de agente porogênico.

Amostra	$d_{10\%}$ (μm)	$d_{50\%}$ (μm)	$d_{90\%}$ (μm)	Span	$d_{4,3}$ (μm)
EP 1	10,46 ($\pm 2,26$)	19,13 ($\pm 1,71$)	36,04 ($\pm 1,92$)	1,36 ($\pm 0,33$)	22,23 ($\pm 0,98$)
EP 2	15,74 ($\pm 7,24$)	27,02 ($\pm 10,84$)	40,54 ($\pm 24,24$)	1,29 ($\pm 0,59$)	38,20 ($\pm 0,91$)
EP 3	18,63 ($\pm 2,15$)	41,29 ($\pm 10,96$)	84,10 ($\pm 29,47$)	1,54 ($\pm 0,33$)	54,61 ($\pm 0,21$)
EP 4	17,23 ($\pm 0,96$)	26,99 ($\pm 3,65$)	44,12 ($\pm 11,68$)	0,98 ($\pm 0,26$)	30,01 ($\pm 6,43$)
EP 5	18,75 ($\pm 5,16$)	41,16 ($\pm 15,39$)	83,84 ($\pm 25,75$)	1,60 ($\pm 0,12$)	46,80 ($\pm 15,37$)

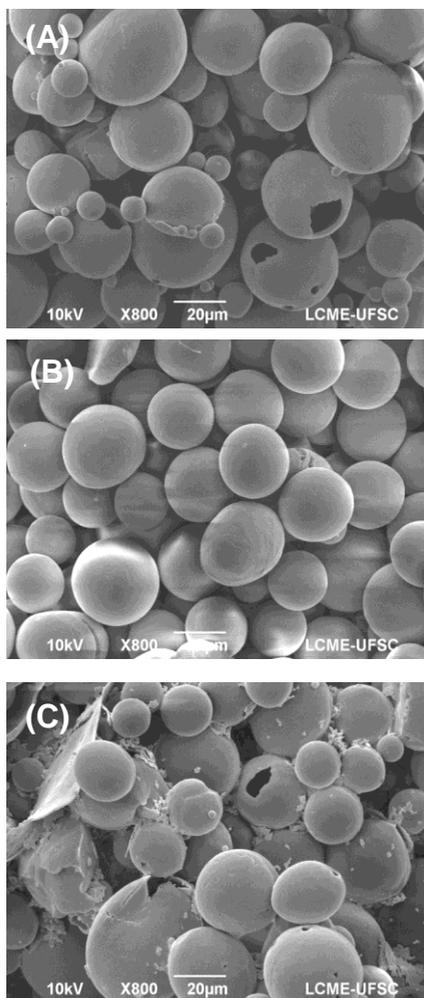


Figura 14. Avaliação do tipo de agente porogênico utilizado na fase aquosa 1: (A) EP 3 com ABC 1%; (B) EP 4 com NaCl 0,5%; (C) EP 5 com NaCl 5%.

Visando reduzir o tamanho das partículas, a quantidade de PCL adicionada à formulação foi então modificada. Para isto, a formulação EP 6 foi testada, reduzindo a quantidade inicial de 450 para 250 mg de PCL. Além disso, o poloxamer 188 foi aumentado de 0,3% (m/V) para 1% (m/V) para verificar se a coalescência das gotículas mais internas poderia ser evitada, conforme já verificado por Coccoli e colaboradores (2002). Como resultado, partículas esféricas, de superfície lisa e com tamanhos médios menores a 32,75 μm foram obtidas. A necessidade de diluição das formulações também foi avaliada. A adição final de água destilada à formulação, após a formação da dupla emulsão, foi usada com o intuito de diminuir a probabilidade de coalescência entre as gotículas e de facilitar a difusão do solvente orgânico da fase orgânica para a fase aquosa secundária. Entretanto, pouca influência foi observada quando passou-se a suprimir a diluição final da formulação.

A fim de obter partículas com melhor dispersibilidade, a concentração de surfactante hidrofílico foi testada, sendo usado as concentrações de 1,0%, 0,75% e 0,5% (m/V) nas amostras EP 7, 8 e 9, respectivamente. O pH da fase aquosa secundária também foi alterado, buscando reduzir a solubilidade do fármaco nesta fase, o que poderia aumentar a eficiência de encapsulação. Os resultados de tamanho de partícula são apresentados na tabela 10 e as fotomicrografias das partículas são exibidas na figura 15. Os melhores resultados foram obtidos quando a concentração de PVA 0,75% (EP 8) foi empregada. Para esta concentração de surfactante hidrofílico, os pós apresentaram-se fluídos, com aspecto leve, e tamanho de partícula médio de 37,83 μm .

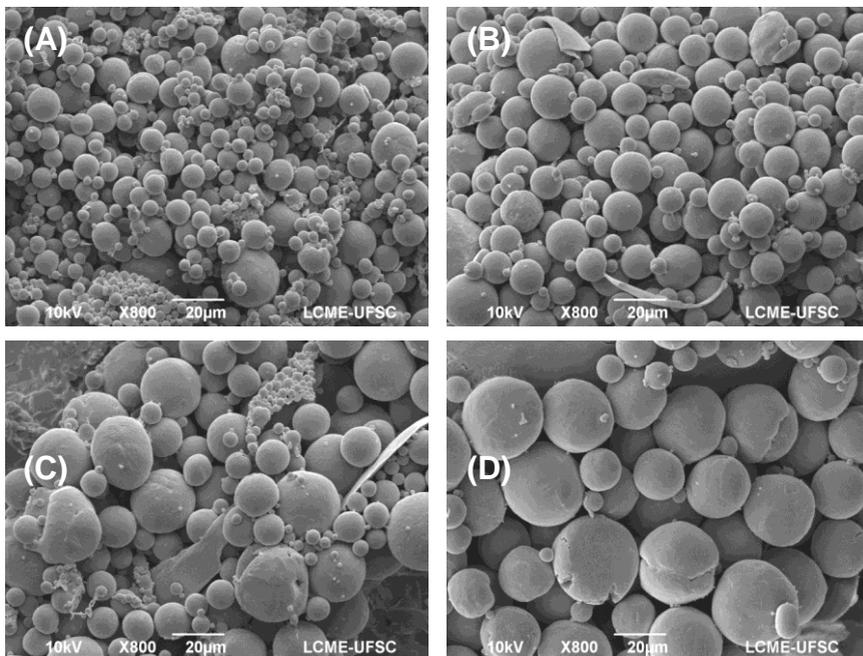


Figura 15. Fotomicrografias dos ensaios preliminares (A) EP 6, (B) EP 7, (C) EP 8, (D) EP 9 para avaliação da concentração de surfactante hidrofílico.

Tabela 10. Tamanho geométrico médio das formulações iniciais, avaliando a concentração de surfactante hidrofílico.

Amostra	$d_{10\%}$ (μm)	$d_{50\%}$ (μm)	$d_{90\%}$ (μm)	Span	$d_{4,3}$ (μm)	Teor (m/m, %)
EP 6	4,61 ($\pm 2,55$)	20,14 ($\pm 9,11$)	78,77 ($\pm 32,34$)	3,73 ($\pm 0,21$)	36,32 ($\pm 9,89$)	-
EP 7	7,53 ($\pm 3,38$)	28,34 ($\pm 11,78$)	92,23 ($\pm 17,91$)	3,72 ($\pm 0,45$)	55,14 ($\pm 11,66$)	0,145 ($\pm 0,018$)
EP 8	5,45 ($\pm 3,66$)	19,07 ($\pm 6,98$)	70,61 ($\pm 10,04$)	3,89 ($\pm 1,93$)	37,83 ($\pm 5,86$)	0,005 ($\pm 0,001$)
EP 9	19,48 ($\pm 4,70$)	67,12 ($\pm 22,72$)	187,80 ($\pm 72,76$)	3,27 ($\pm 0,57$)	87,83 ($\pm 30,33$)	0,229 ($\pm 0,009$)

*EP 6 é branca

O teor de azitromicina nas formulações com pH alterado para 9 foram baixos, o que levou ao aumento da concentração inicial do fármaco nas formulações e também do pH da fase aquosa secundária, de 9 para 10. As formulações EP 10, 11, 12 e 13 foram preparadas com 100, 150, 200 e 250 mg de azitromicina, respectivamente, com o propósito de aumentar o teor de fármaco encapsulado. Os resultados de tamanho e teor de fármaco são mostrados na tabela 11. As fotomicrografias obtidas por MEV encontram-se na figura 16.

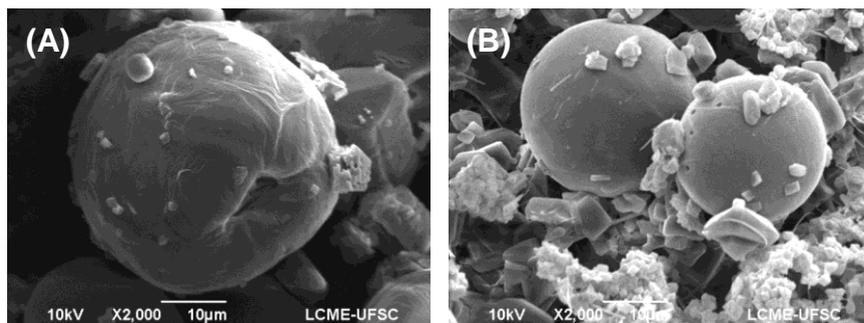


Figura 16. Fotomicrografias das amostras (A) EP 11 com 150 mg de azitromicina e (B) EP 13 com 250 mg de azitromicina.

Tabela 11. Tamanho geométrico médio das formulações iniciais avaliando a quantidade de fármaco adicionado.

Amostra	$d_{10\%}$ (μm)	$d_{50\%}$ (μm)	$d_{90\%}$ (μm)	Span	$d_{4,3}$ (μm)	Teor (m/m, %)
EP 10	12,33 ($\pm 1,20$)	34,86 ($\pm 2,76$)	189,89 ($\pm 27,97$)	5,08 ($\pm 0,36$)	73,84 ($\pm 6,92$)	3,71 ($\pm 0,39$)
EP 11	15,98 ($\pm 1,90$)	55,59 ($\pm 5,56$)	161,67 ($\pm 13,06$)	2,64 ($\pm 0,38$)	77,87 ($\pm 2,51$)	17,69 ($\pm 1,36$)
EP 12	16,06 ($\pm 2,29$)	56,90 ($\pm 2,82$)	156,21 ($\pm 19,17$)	2,48 ($\pm 0,50$)	77,40 ($\pm 6,47$)	45,63 ($\pm 3,89$)
EP 13	6,65 ($\pm 2,63$)	59,19 ($\pm 2,96$)	313,11 ($\pm 89,58$)	5,15 ($\pm 1,21$)	119,28 ($\pm 24,77$)	52,52 ($\pm 1,28$)
EP 14	1,58 ($\pm 0,17$)	13,11 ($\pm 13,38$)	46,47 ($\pm 16,12$)	5,85 ($\pm 4,76$)	21,57 ($\pm 8,10$)	10,58 ($\pm 0,84$)

*EP 14 é igual à 12, porém a emulsão A/O/A é submetida a ultraturrax por 30 seg.

Na figura 16 é possível observar a presença de cristais de fármaco na superfície das partículas, proporcionalmente à quantidade de azitromicina adicionada à formulação. Embora o teor das amostras EP 12 e 13 tenha sido superior, é possível visualizar nas fotomicrografias que este corresponde à um excesso de azitromicina na amostra (figura 16B), e não de fármaco efetivamente encapsulado. Desta forma, a quantidade inicial de 150 mg de azitromicina pareceu ser mais adequada (EP 11). O tamanho médio das partículas e o teor de fármaco nesta formulação foram 77,87 μm e 17,69% (m/m), respectivamente.

Apesar dos resultados anteriores, o tamanho elevado das partículas ainda foi considerado incompatível com a via pulmonar. Assim, novos testes com uma segunda agitação ultrassônica da dupla emulsão A/O/A e aumento da potência foram realizados. Entretanto, emulsões instáveis ou amostras com várias populações de partículas foram obtidas (dados não mostrados).

Vários trabalhos descrevem a influência da velocidade de agitação sobre o tamanho de partícula. A variação da velocidade de agitação de centenas para milhares de rotações por minuto pode resultar na obtenção de micro- e nanopartículas, já que o aumento na velocidade provê maior energia para dispersar as duas fases imiscíveis e formar a emulsão, produzindo gotículas menores de óleo na água, reduzindo o tamanho final das partículas (BALMAYOR et al., 2009). Assim, o efeito da agitação foi novamente avaliado, mas desta vez usando homogeneização da dupla emulsão em Ultraturrax a 17.500 rpm por 30 segundos. As partículas apresentam-se esféricas ou ovaladas e com superfície lisa (figura 17). O tamanho foi bastante reduzido, com valor médio de 21,57 μm (tabela 11).

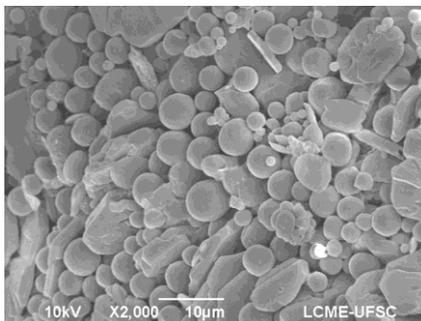


Figura 17. Fotomicrografia da formulação EP 14.

Logo, a homogeneização a alta velocidade com ultraturrax foi adotada, ao final da emulsão A/O/A, para homogeneização e diminuição do tamanho das gotículas. A partir destes resultados, um delineamento estatístico fatorial foi realizado a fim de avaliar o efeito de alguns fatores sobre as características finais das partículas. Os resultados são descritos a seguir.

4.2 Estudo de formulação de micropartículas de policaprolactona por delineamento estatístico fatorial

Com base nos resultados iniciais, um delineamento estatístico fatorial do tipo 2^3 foi proposto a fim de avaliar o efeito de fatores sobre o diâmetro geométrico, diâmetro aerodinâmico mássico e teor de fármaco encapsulado, quando as micropartículas foram preparadas pela técnica de dupla/emulsão evaporação do solvente, conforme descrito em 3.2.2.1. Os fatores estudados foram saturação e pH da segunda fase externa aquosa e volume da fase orgânica. O teor do fármaco foi avaliado por espectroscopia de absorção no visível após complexação da azitromicina com alizarina. Os resultados de desenvolvimento e validação do método analítico são descritos a seguir.

4.2.1 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da azitromicina por espectrofotometria de absorção no visível

Neste trabalho, a eficiência de encapsulação e o teor de fármaco nas partículas foram determinados através da análise espectrofotométrica após sua complexação. Visto que os métodos farmacopeicos recomendados nem sempre se adequam à todas as amostras analisadas, ou requerem muito tempo e necessitam de

equipamentos que não estão disponíveis no laboratório, uma metodologia simples, sensível e seletiva foi proposta a partir da reação da azitromicina em solução com a alizarina, formando um complexo de transferência de carga.

Tais complexos de transferência de carga caracterizam-se pela associação entre duas ou mais moléculas, ou por diferentes partes de uma grande molécula, onde uma fração de carga eletrônica é transferida entre as entidades moleculares. Estes complexos são descritos como uma interação entre aceptores e doadores de elétrons (ácidos e bases de Lewis, respectivamente) para formar compostos moleculares que variam de “frouxos” a estáveis com formação de uma classe especial de absorção espectral intensa característica do composto molecular A-B, e não existente para A ou B puros. A atração eletrostática resultante é que promove a estabilização do complexo molecular, sendo muito mais fraca que uma ligação covalente, criada somente pela transição eletrônica para um estado excitado. Ainda em relação às ligações covalentes, a molécula doadora e a receptora encontram-se numa maior distância e o equilíbrio envolvido na formação de complexos moleculares se estabelece rapidamente, já que o sistema possui baixa energia de ativação. Complexos estáveis são formados na condição de baixo potencial de ionização da base e alta eletroafinidade do ácido, havendo a formação de complexos ressonantes sem ligação química ou a formação de ânions radicalares a partir de estruturas dativas (FARIAS, SANTOS, 1992; MULLINKEN, 1952). Paula e colaboradores (2010b) descrevem que complexos moleculares de transferência de carga são formados em solventes apolares. Já em solventes polares há a predominância de ânions radicalares coloridos.

A alizarina (1,2-diidroxi-9,10-antracenediona) (figura 18) é um corante vermelho-alaranjado sintetizado industrialmente, cuja fórmula é $C_{14}H_8O_4$. Tem sido utilizada em estudos histoquímicos, na identificação de depósitos de cálcio e em química analítica, agindo como ligante em reações colorimétricas. Derivados antracênicos, como a alizarina e a quinalizarina, já foram utilizados como cromóforos na quantificação espectrofotométrica da cefalexina (PAULA, ALMEIDA, CASSELA, 2010b), piroxicam e tenoxicam (AMIN, 2002), nefopam, mebeverina, cloridrato de fenilpropanolamina (SHAMA, AMIN, 2004) e da azitromicina (PAULA, ALMEIDA, CASSELA, 2010a). Assim, sugere-se que este

composto seja aplicável como cromóforo na presença de agentes doadores de elétrons, como compostos contendo grupamentos amina (JELINSKI, CYSEWSKI, MAKAREWICZ, 2013).

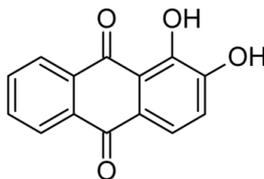
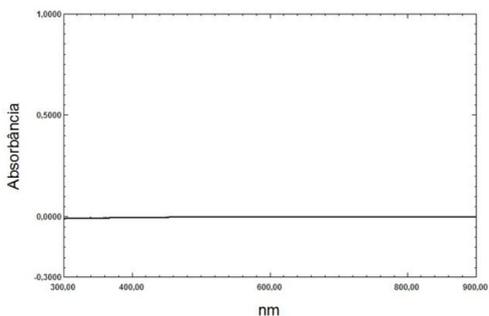


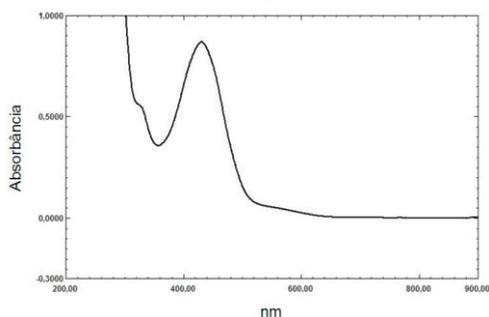
Figura 18. Estrutura química da alizarina.

4.2.1.1 Otimização das condições de complexação e caracterização do complexo

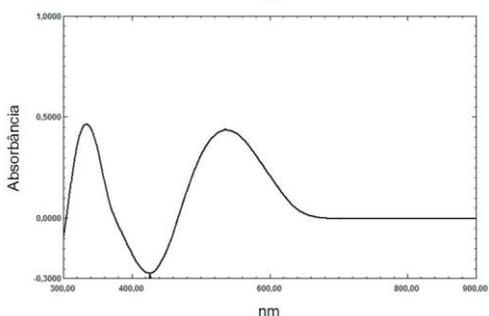
Segundo Jelinski, Cysewski e Makarewicz (2013) a alizarina pode existir em três formas: uma forma protonada e duas desprotonadas (mono- e diânion). A forma neutra (protonada) apresenta um máximo de absorção em 430 nm e coloração amarelada, enquanto que a forma monoaniônica caracteriza-se por um máximo em 530 nm e coloração avermelhada. Experimentalmente foi possível observar que o espectro de absorção no UV/Vis de uma solução de alizarina apresenta uma banda bem definida com máximo de absorbância em 430 nm (figura 19B) enquanto que o espectro da solução metanólica de azitromicina (figura 19A) não apresenta nenhuma banda característica na faixa analisada (300 a 900 nm). A adição da alizarina à solução de azitromicina leva instantaneamente à mudança de cor da solução, com aparecimento de uma coloração avermelhada relativa ao aparecimento do complexo binário, com máximo de absorção em 536 nm (figura 19C). A banda característica da alizarina é suprimida do espectro, não havendo interferência na quantificação do complexo. Neste caso, sugere-se que a azitromicina atua como um doador de elétrons, levando à formação do monoânion de alizarina de coloração vermelha. Desta forma, a formação de um complexo colorido em solução poderia ser vantajosamente utilizada para quantificação da azitromicina nas micropartículas, no comprimento de onda de 536 nm.



(A)



(B)



(C)

Figura 19. Espectros de varredura obtidos a partir (A) solução padrão de azitromicina 70 µg/mL; (B) solução padrão de alizarina 38,4 µg/mL e (C) complexo alizarina-azitromicina formado em solução.

4.2.1.1.1 Avaliação da estequiometria da reação

A estequiometria da reação foi avaliada utilizando o método de Job, conforme descrito em 3.4.1.1.1. O gráfico de absorbância versus fração molar de azitromicina pode ser observado na figura 20. A parábola resultante representa a função polinomial quadrática

de ajuste $y = -1,92x^2 + 1,88x + 0,022$, com coeficiente de correlação de 0,993, representando a resposta do complexo fármaco-ligante.

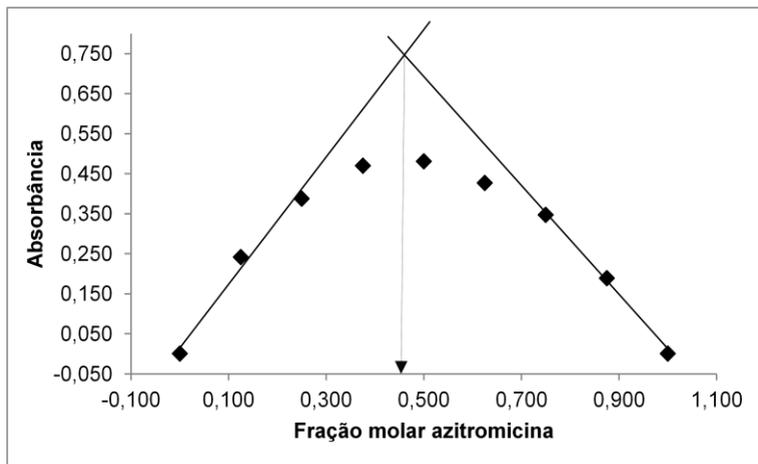


Figura 20. Diagrama de Job obtido para a determinação da estequiometria da reação de complexação entre a azitromicina e alizarina.

De acordo com a figura 20, pode-se observar que o ponto de máxima absorbância ocorreu com aproximadamente 0,5 de fração molar de azitromicina, indicando que a estequiometria do complexo azitromicina-alizarina é de 1:1. A absorvidade molar do complexo formado, calculada conforme equação 3, foi de $3,19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.1.1.2 Avaliação do tempo de reação

O efeito do tempo de reação sobre a intensidade de absorção do complexo azitromicina-alizarina, avaliado conforme descrito em 3.2.3.1.2, é mostrado na figura 21. Os resultados demonstraram pequenas variações nas leituras da absorbância, para uma concentração teórica de azitromicina de $60 \mu\text{g/mL}$, com DPR igual a 2,44%. Assim, o tempo de reação não pareceu afetar a formação do complexo, e este foi estabelecido em 5 minutos para os ensaios posteriores.

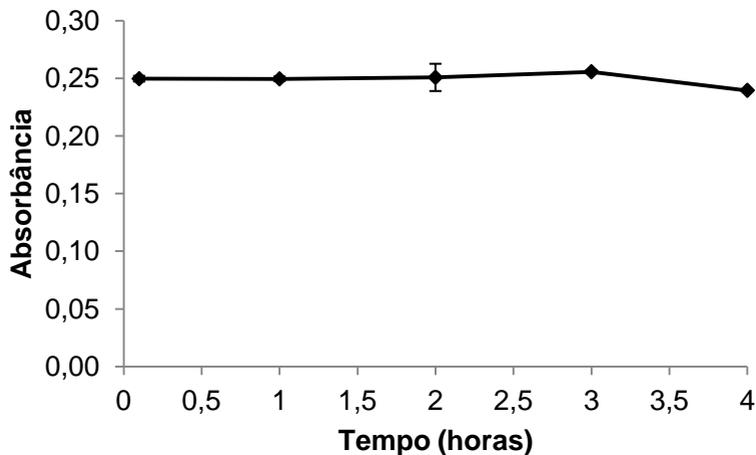


Figura 21. Valores de absorbância do complexo azitromicina-alizarina em função do tempo de reação.

4.2.1.1.3 Caracterização do complexo azitromicina-alizarina por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de absorção no infravermelho para o fármaco, a alizarina e o complexo formado em solução são mostrados na figura 22.

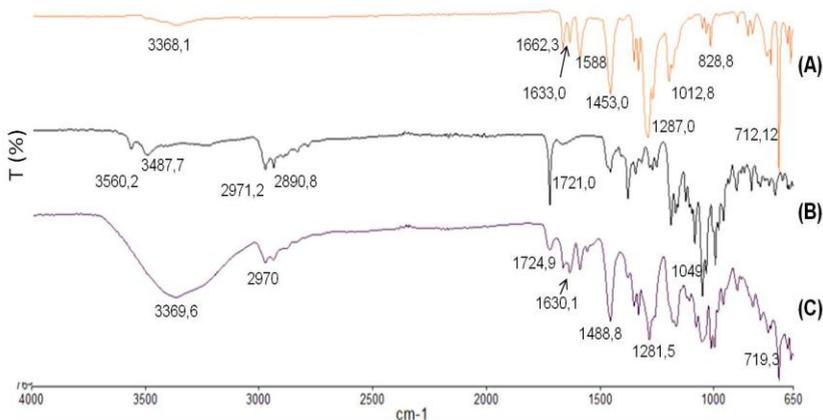


Figura 22. Espectros de FT-IR da (A) alizarina, (B) azitromicina e (C) complexo alizarina-azitromicina 1:1.

O espectro de FT-IR da alizarina exibe bandas atribuídas ao estiramento das ligações O-H próximas a $3368,1 \text{ cm}^{-1}$, ligações C=C dos grupamentos aromáticos em $1453,0$; $1588,8$; $1633,0 \text{ cm}^{-1}$ e ligações C-H referentes aos anéis aromáticos em $712,1$ e $660,64 \text{ cm}^{-1}$. Em $1662,3 \text{ cm}^{-1}$ ocorre o pico atribuído ao estiramento C=O do grupamento quinona (figura 22A). A azitromicina apresenta as bandas características do fármaco, correspondentes ao estiramento de ligações C-H dos grupamentos metila presentes no anel macrocíclico e nos açúcares em $2971,2$ e $2890,8 \text{ cm}^{-1}$, e O-H em $3560,2$ e $3487,7 \text{ cm}^{-1}$. A banda correspondente ao estiramento C=O presente na estrutura macrocíclica da azitromicina pode ser visualizada em 1721 cm^{-1} (figura 22B).

A deformação das bandas próximas à 3500 cm^{-1} , com formação de uma banda larga relativa às ligações OH pode ser observada no espectro obtido após análise do complexo. Além disso, as bandas relativas às carbonilas também foram deslocadas. Assim, pode-se sugerir que as deformações das bandas correspondentes aos grupamentos C=O e O-H estão relacionadas à formação do monoânion colorido, pois o recebimento do elétron poderia levar a uma ressonância no grupamento quinona e desestabilizar o OH do grupamento fenólico vizinho.

4.2.1.2 Validação da metodologia de espectroscopia de absorção no visível a partir da reação de complexação em solução

4.2.1.2.1 Especificidade

A figura 23 apresenta os espectros de absorção no UV/Vis obtidos após análise das micropartículas brancas e contendo azitromicina, conforme descrito em 3.2.3.2.1. O método foi considerado específico para a quantificação da azitromicina após complexação com a alizarina em solução, uma vez que os componentes da formulação não exibiram absorção de luz no comprimento de onda de 536 nm.

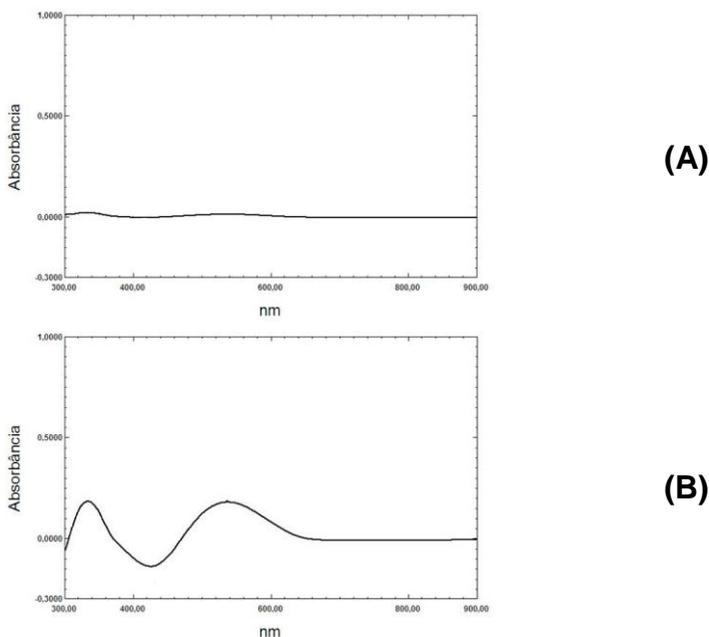


Figura 23. Espectros de absorção no UV/Vis obtidos após análise de micropartículas de policaprolactona (A) brancas e (B) contendo azitromicina.

4.2.1.2.2 Linearidade

Tendo como base os dados obtidos no diagrama de job (figura 20), uma curva de calibração foi contruída mantendo-se a concentração de alizarina fixa em 38,4 $\mu\text{g/mL}$ e variando-se a concentração de azitromicina. Na avaliação da faixa de concentração do analito a ser usada, os resultados mostraram que em concentrações acima de 70 $\mu\text{g/mL}$, o intervalo de confiança do intercepto da curva analítica deixa de incluir o valor zero e que em concentrações mais elevadas ocorre a perda de linearidade do método. A linearidade do método foi verificada na faixa de concentração de azitromicina entre 20,0 e 70,0 $\mu\text{g/mL}$ (figura 24). A equação da reta, obtida pelo método dos mínimos quadrados, correspondeu a $y = 0,004x + 0,008$ e o coeficiente de correlação foi de 0,993.

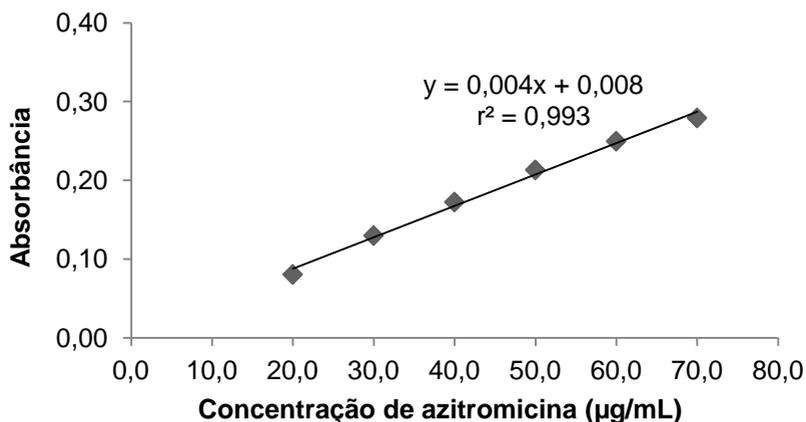


Figura 24. Curva de calibração média obtida para quantificação da azitromicina, após complexação com a alizarina.

A análise da variância confirmou a linearidade do método ($F_{\text{calculado}} 601,73 > F_{\text{crítico}} 1,63 \times 10^{-5}$, $\alpha = 0,05$). A ausência de erro sistemático constante também foi verificada, uma vez que os valores do intervalo de confiança do intercepto incluíram o valor zero (IC = - 7,355 a 3,901, $\alpha = 0,05$). Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram 1,32 e 4,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente,

indicando que o método analítico foi suficientemente sensível para determinar o teor de azitromicina nas micropartículas.

4.2.1.2.3 Exatidão

A exatidão foi determinada após contaminação das micropartículas contendo azitromicina (formulação MPD 5) com uma solução padrão do fármaco, conforme descrito em 3.2.3.2.3. Valores de recuperação entre 97,86 a 100,68% foram obtidos, evidenciando a exatidão do método.

Tabela 12. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão do método analítico.

Conc. teórica adicionada da solução padrão (µg/mL)	Conc. teórica padrão + fármaco encapsulado (µg/mL)	Conc. experimental I (µg/mL)	Média recuperação (%)	DPR (%)
35,0	41,82	42,04 (±1,16)	100,68 (±3,30)	3,28
50,0	56,81	56,20 (±0,57)	98,79 (±1,13)	1,15
65,0	71,81	70,42 (±1,55)	97,86 (±2,39)	2,44

*Conc é concentração

4.2.1.2.4 Precisão

A repetibilidade do método (precisão intradia) foi avaliada após análise das soluções obtidas após extração da azitromicina das micropartículas (formulação MPD 5) e complexação com alizarina, por espectroscopia de absorção no visível a 536 nm (n = 6) (tabela 13). Para análise da precisão intermediária (precisão interdia), três amostras foram analisadas nas mesmas condições em três dias diferentes (tabela 14). O método foi considerado preciso, pois os valores de desvio padrão relativo (DPR%) foram ≤ 5,0 %.

Tabela 13. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intradia do método para quantificação da azitromicina nas micropartículas .

Repetição	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média ($\pm\text{DP}$)	DPR%
1	47,78		
2	46,48		
3	45,05	46,77 ($\pm 0,97$)	2,08
4	47,35		
5	47,32		
6	46,65		

Tabela 14. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão interdia.

	Concentração ($\pm\text{DP}$) ($\mu\text{g/mL}$)	Média ($\pm\text{DP}$)	DPR%
Dia 1	46,43 ($\pm 1,36$)		
Dia 2	46,18 ($\pm 1,50$)	46,46 ($\pm 1,21$)	2,61
Dia 3	46,76 ($\pm 1,25$)		

4.2.1.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação da azitromicina nas micropartículas

A tabela 15 apresenta os valores de eficiência de encapsulação (EE%) e teor de azitromicina (% m/m) obtidos quando a técnica de dupla emulsão foi empregada para obtenção das micropartículas, usando o delineamento fatorial 2^3 .

Tabela 15. Eficiência de encapsulação (EE%) e teor de azitromicina nas micropartículas.

Amostra	Fatores estudados			Teor (%, m/m) (\pm DP)	EE% (\pm DP)
	Saturação FA ₂	pH FA ₂	Volume fase orgânica		
MPD 1	Não	6,0	5,0	16,92(\pm 0,38) ^a	45,11 (\pm 1,01)
MPD 2	Sim	6,0	5,0	10,57 (\pm 3,30) ^b	28,18 (\pm 8,81)
MPD 3	Não	10,0	5,0	23,07 (\pm 0,31)	61,51 (\pm 0,83)
MPD 4	Sim	10,0	5,0	5,77 (\pm 1,97) ^c	15,37 (\pm 5,25)
MPD 5	Não	6,0	25,0	13,13 (\pm 2,36) ^{a,b}	35,01 (\pm 6,29)
MPD 6	Sim	6,0	25,0	3,50 (\pm 0,61) ^{c,d}	9,34 (\pm 1,62)
MPD 7	Não	10,0	25,0	7,66 (\pm 0,30) ^{b,c,d,e}	20,42 (\pm 0,81)
MPD 8	Sim	10,0	25,0	4,32 (\pm 0,37) ^{c,d,e}	11,53 (\pm 0,99)

FA₂: segunda fase aquosa da dupla emulsão.

No teor, letras iguais atestam que não há diferença significativa entre os valores ($\alpha = 0,05$)

Os valores de teor encontrados para as amostras variaram entre 3,50% e 23,06% (m/m), enquanto que os valores de EE% variaram entre 9,34 e 61,51%. Tais diferenças refletem a grande influência de parâmetros de formulação sobre as características finais das partículas. A ANOVA (tabela 16) mostrou que, dentre os fatores estudados, somente a saturação da segunda fase aquosa e o volume da fase orgânica afetaram significativamente o teor de fármaco encapsulado. A interação ocorreu entre os fatores 2 e 3 (pH e volume da fase orgânica) e 1 e 3 (saturação e volume da fase orgânica, assim como entre os três fatores estudados ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, $\alpha = 0,05$). Para verificar em quais níveis ocorreu diferença estatística, a diferença mínima significativa (d.m.s) entre as médias foi calculada usando o teste de Tukey, conforme equação abaixo:

$$d.m.s = q \times \sqrt{\frac{QMR}{n}} \quad \text{Equação 15}$$

onde QMR é o quadrado médio do resíduo, n é o número de repetições de cada tratamento e q é o valor tabelado para nível de significância de 5%.

Neste caso, o valor de d.m.s calculado foi de 4,60 para q igual a 4,90. Comparando os valores da tabela 15 é possível verificar que a saturação da segunda fase aquosa reduziu significativamente o teor de fármaco encapsulado, exceto quando o pH foi igual a 10 e o volume da fase orgânica foi 25 mL (MPD 7 *versus* MPD 8). O aumento do volume da fase orgânica de 5 mL para 25 mL reduziu o teor quando o pH da fase externa foi mantido em 6 com saturação (MPD 2 *versus* MPD 6) e em pH 10 sem saturação (MPD 3 *versus* MPD 7). O efeito do pH sobre o teor de fármaco só não foi significativo quando a saturação da fase aquosa foi realizada e o volume da fase orgânica foi de 25 mL (MPD 6 *versus* 8). Isto pode estar relacionado ao fato de a azitromicina se apresentar predominantemente na forma não ionizada em pH 10 ($pK_a = 8,80$), que exibe menor solubilidade aquosa sendo, portanto, menos particionada em direção a fase externa da dupla emulsão. Entretanto, o pH parece ter exercido menor efeito sobre o teor de fármaco do que a saturação e o volume da fase orgânica.

Tabela 16. Análise da variância realizada no estudo do efeito dos fatores de formulação sobre o teor de fármaco encapsulado.

<i>Fator</i>	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>Valor de p</i>	<i>F_{crítico}</i>
1	Saturação	502,615	1	502,615	189,776	2×10^{-10}	4,494
2	pH	4,099	1	4,099	1,548	0,2313	4,494
3	Volume	287,791	1	287,791	108,662	2×10^{-7}	4,494
1x2	Saturação x pH	8,126	1	8,126	3,068	0,0989	4,494
1x3	Saturação x Volume	42,846	1	42,846	16,178	0,0009	4,494
2x3	pH x Volume	13,487	1	13,487	5,093	0,0383	4,494
1x2x3	Saturação x pH x Volume	111,508	1	111,508	42,103	7×10^{-6}	4,494
Resíduo		42,375	16	2,649			
Total		1012,85	23				

O diagrama de Pareto (figura 25) confirmou os efeitos dos fatores saturação da fase aquosa secundária e volume de fase orgânica como sendo maiores e estatisticamente significativos sobre o teor ($p < 0,05$). A equação de ajuste proposta para determinação do teor de azitromicina nas micropartículas é mostrada abaixo. O coeficiente de correlação para a equação encontrada foi 0,9582.

$$\text{teor}(x,y,z) = -4,57x - 0,41y - 3,46z - 0,59xy + 1,34xz - 0,75yz + 2,16xyz + 10,62 \quad \text{Equação 16}$$

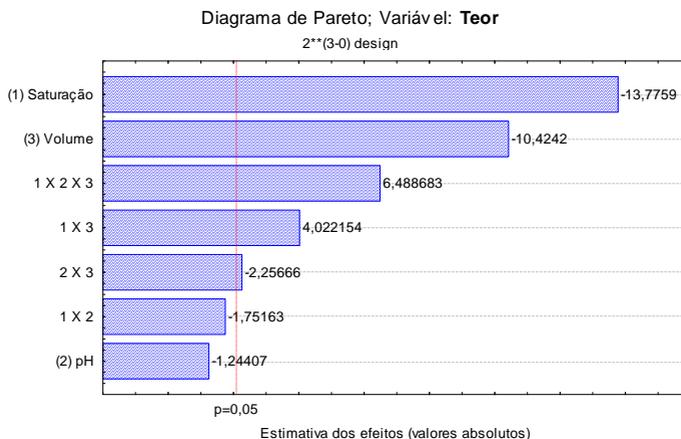


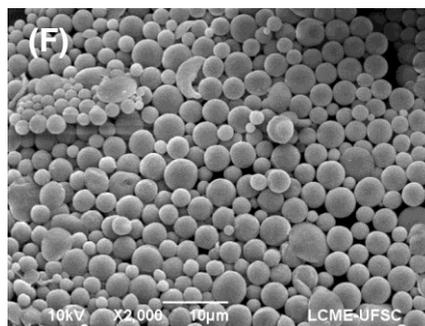
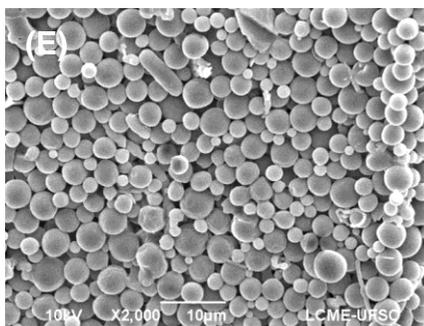
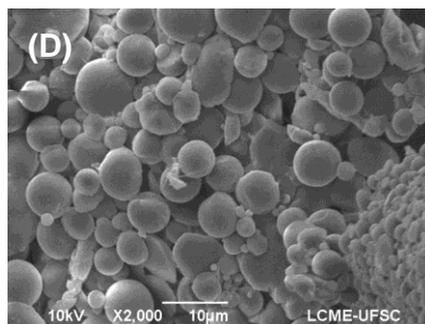
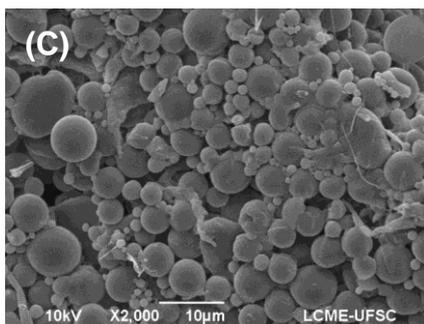
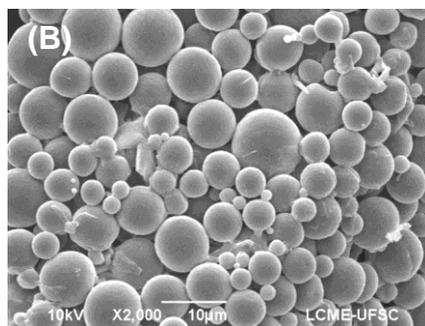
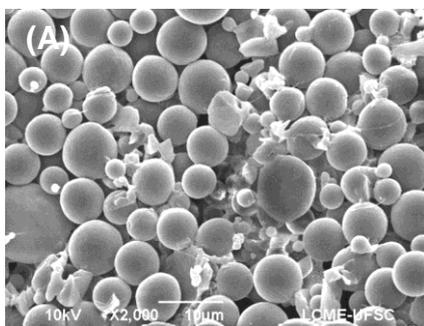
Figura 25. Diagrama de Pareto com estimativa de efeitos para o teor de azitromicina nas micropartículas.

Assim, de acordo com os resultados, os valores de teor e eficiência de encapsulação da azitromicina foram especialmente elevados para a amostra MPD 3, preparada com menor volume de fase orgânica (5 mL), sem a saturação da fase aquosa secundária, mas com pH ajustado a 10. O menor teor de azitromicina foi obtido como maior volume de fase orgânica, pH 6,0 e saturação da fase aquosa secundária. Tais resultados podem ser relacionados ao efeito de partição do fármaco entre ambas as fases.

4.2.2 Caracterização físico-química das micropartículas

4.2.2.1 Avaliação da morfologia

As fotomicrografias das micropartículas contendo azitromicina e brancas (sem fármaco) podem ser visualizadas nas figuras 26 e 27, respectivamente. As micrografias exibiram partículas com tamanho variando entre 1 e 20 μm , com formato esférico ou levemente ovalado e superfície lisa.



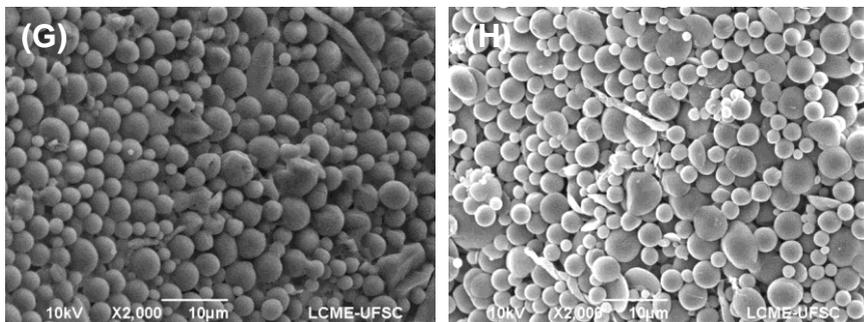


Figura 26. Fotomicrografias das micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina com aumento de 2000 vezes. (A) MPD 1; (B) MPD 2; (C) MPD 3; (D) MPD 4; (E) MPD 5; (F) MPD 6; (G) MPD 7 e (H) MPD 8.

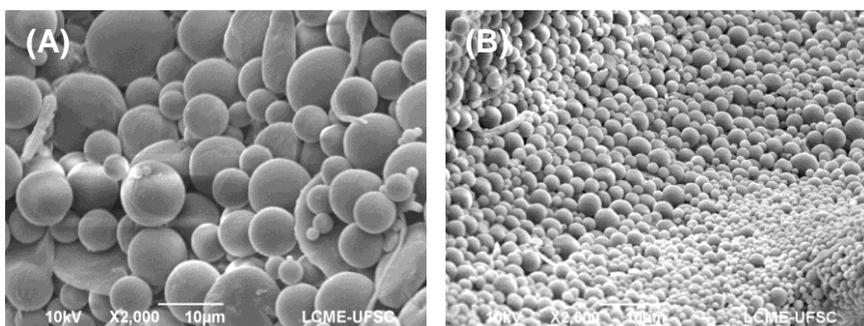


Figura 27. Fotomicrografias das micropartículas de policaprolactona brancas com aumento de 2000 vezes. (A) MPD 1 e (B) MPD 5.

É visualmente perceptível que as amostras formuladas com um maior volume de fase orgânica (25 mL, MPD 5 a 7) apresentaram tamanhos menores e uma distribuição mais homogênea em relação àquelas formuladas com menor volume (5 mL, MPD 1 a 4). O mesmo pode ser observado para as amostras brancas. A modificação do pH e a saturação da fase aquosa não pareceram alterar a morfologia das partículas. As amostras contendo azitromicina apresentaram apenas alguns cristais finos de fármaco depositados em seu exterior. Estes cristais podem ser observados em aumentos maiores que 5000 vezes (figura 28).

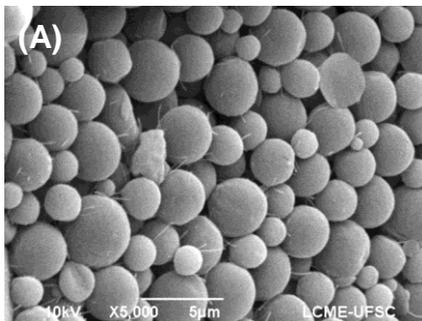


Figura 28. Fotomicrografia das micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina com aumento de 5000 vezes. Formulação MPD 6.

A técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente foi empregada para a obtenção das micropartículas com o intuito de promover a formação de poros, o que levaria à diminuição da densidade do pó e à melhoria das características de aerossolização das mesmas. No entanto, as partículas exibiram superfície lisa sem poros superficiais. Assim, a técnica de criosecção foi utilizada para avaliar a morfologia interna das mesmas. As micropartículas foram congeladas e seccionadas em criostato, na espessura de 5 μm . Por esta técnica foi possível verificar que algumas partículas eram ocas (figuras 29 A e B) e não compactas. Este efeito pode ser relacionado à falta da estabilidade da primeira emulsão. A saída da fase aquosa contendo o bicarbonato de amônio provocou, portanto, a formação deste tipo de estrutura. Entretanto, devido ao tamanho reduzido das partículas, a estrutura interna das mesmas não pode ser observada em todas as amostras.

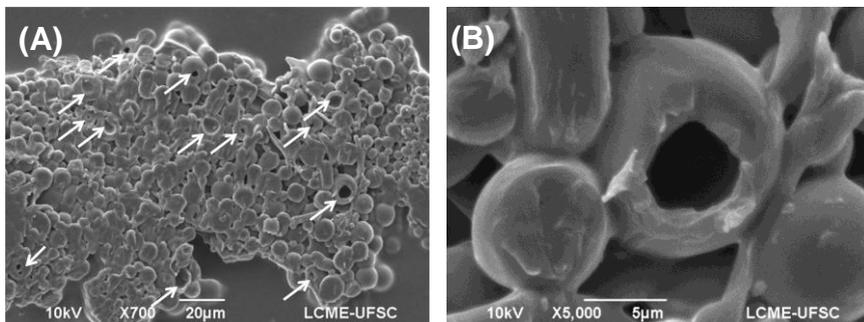


Figura 29. Fotomicrografia da formulação MPD 1 branca após criosecção, nos aumentos de (A) 700 e (B) 5000 vezes.

4.2.2.2 Determinação da densidade bruta, de compactação e esquelética (real)

Conforme mostrado na tabela 17, os valores de densidade aparente e de compactação das micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina variaram de 0,114 g/mL a 0,164 g/mL e de 0,131g/mL a 0,177 g/mL, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Oh e colaboradores (2011). Estes autores obtiveram micropartículas de PLGA contendo budesonida pela técnica de dupla emulsão A/O/A, empregando o agente porogênico bicarbonato de amônio nas concentrações de 1,5 e 3,0 % (m/V). As densidades brutas encontradas foram 0,12 e 0,07 g/mL, respectivamente. Estudos têm demonstrado que partículas consideradas relativamente grandes para administração pulmonar ($d > 5 \mu\text{m}$), mas apresentando densidade aparente baixa ($< 0,4 \text{ mg/mL}$) podem ser inaladas e atingir os pulmões (EDWARDS et al.,1997). Assim, a técnica de dupla emulsão permitiu, neste caso, obter partículas com valores de densidade adequados para administração nos pulmões.

Tabela 17. Valores de densidade aparente, de compactação e esquelética (real) das micropartículas.

Amostra	Densidade aparente (\pmDP) (g/mL)	Densidade de compactação (\pmDP) (g/mL)	Densidade esquelética (\pm DP) (g/mL)
MPD 1	0,155 (\pm 0,005)	0,166 (\pm 0,004)	1,074 (\pm 0,005)
MPD 2	0,153 (\pm 0,005)	0,164 (\pm 0,004)	1,165 (\pm 0,160)
MPD 3	0,121 (\pm 0,005)	0,136 (\pm 0,005)	1,027 (\pm 0,019)
MPD 4	0,164 (\pm 0,009)	0,177 (\pm 0,005)	1,107 (\pm 0,007)
MPD 5	0,125 (\pm 0,003)	0,141 (\pm 0,002)	1,284 (\pm 0,011)
MPD 6	0,134 (\pm 0,006)	0,156 (\pm 0,003)	1,131 (\pm 0,005)
MPD 7	0,114 (\pm 0,002)	0,131 (\pm 0,001)	1,118 (\pm 0,011)
MPD 8	0,131 (\pm 0,003)	0,147 (\pm 0,004)	1,397 (\pm 0,005)

A densidade esquelética ou real das micropartículas foi determinada pela técnica de picnometria a gás, conforme descrito em 3.2.4.3. A picnometria a gás é uma técnica útil para verificação do volume real, pois baseia-se no princípio de deslocamento de fluidos de Arquimedes e na expansão de gases ideais, conhecida como lei de Boyle. Neste experimento, o gás Hélio é infundido no equipamento como fluido de deslocamento que, devido a sua pequena dimensão atômica, é capaz de penetrar nos poros finos da amostra, próximos a 0,2 nm, a fim de determinar o volume do sólido sob análise. Os valores fornecidos pelo aparelho são então utilizados para estimar a densidade real do material de massa conhecida (Quantachrome, 2013).

As micropartículas apresentaram valores de densidade esquelética entre 1,027 g/mL e 1,397 g/mL (tabela 17), sendo que os resultados sugerem uma tendência ao aumento da densidade esquelética nas amostras preparadas com fase orgânica de maior volume. Este resultado pode estar relacionado à diferença na relação de volume entre a fase aquosa primária e a fase orgânica, afetando o grau de dispersão da emulsão primária (0,5 mL/25 mL e 0,5 mL/5 mL) e, portanto, a estrutura interna da partículas. Além disso, o maior volume de fase orgânica na formulação reduziria a velocidade de eliminação do solvente, o que poderia resultar em maior tempo para a cristalização do polímero e solidificação das partículas. Esta maior organização da PCL na matriz polimérica

levaria à formação de partículas mais compactas, explicando, assim, os valores de densidade esquelética obtidos.

4.2.2.3 Avaliação do fluxo

As propriedades de fluxo de pós são bastante importantes na produção de formas sólidas, com destaque na adequação de operações como mistura, compressão, preenchimento de cápsulas, transporte, entre outras (SARRAGUÇA et al., 2010). Li e colaboradores (2004) descreveram que a fluxabilidade é influenciada não somente pelo tamanho e distribuição granulométrica das partículas, mas também pela forma da partícula, textura, energia superficial, composição química e teor de umidade dos pós. Ainda, é importante considerar as possíveis interações interparticulares causadas por forças do tipo van der Waals, interações eletrostáticas e atração capilar, que por sua vez, são dependentes das características dos pós. Partículas grandes tendem a ser mais influenciadas pela inércia e gravidade do que por forças interparticulares, possuindo melhor fluxo. Por outro lado, partículas menores que 10 µm geralmente apresentam propriedades adesivas, com interações interparticulares proporcionais à força gravitacional.

No contexto de administração pulmonar de fármacos, o fluxo é particularmente importante no que tange à capacidade de desaglomeração e aerossolização dos pós nas vias aéreas, até a eficiente deposição nos pulmões. A fração respirável, isto é, a fração de partículas que chega efetivamente aos pulmões, está diretamente relacionada à capacidade de desaglomeração (VANBEVER et al., 1999). Neste trabalho o índice de Carr (IC), ou índice de compressibilidade, foi calculado para avaliar as propriedades de fluxo das micropartículas, conforme descrito em 3.2.4.4. A tabela 18 apresenta os valores de IC obtidos e a classificação dos pós quanto à fluidez.

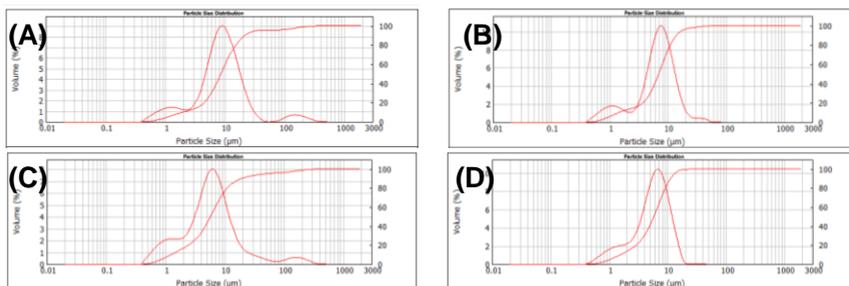
Tabela 18. Índice de Carr e características de fluidez do pó.

Amostra	IC % (\pm DP)	Fluidez
MPD 1	6,64 (\pm 1,47)	Excelente
MPD 2	6,46 (\pm 1,43)	Excelente
MPD 3	10,97 (\pm 2,44)	Excelente
MPD 4	7,35 (\pm 3,94)	Excelente
MPD 5	11,18 (\pm 1,14)	Excelente
MPD 6	14,35 (\pm 2,86)	Bom
MPD 7	13,55 (\pm 1,26)	Bom
MPD 8	11,43 (\pm 1,13)	Excelente

Os valores de IC obtidos para as micropartículas variaram entre 6,64% e 14,35%, indicando que as mesmas apresentam fluxo bom ou excelente. Provavelmente as características das partículas, como forma esférica e hidrofobicidade, contribuíram para os valores de fluxo obtidos.

4.2.2.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

Na figura 30 podem ser observados os gráficos de distribuição de tamanhos das micropartículas poliméricas. A tabela 19 apresenta os valores de $d_{10\%}$, $d_{50\%}$ e $d_{90\%}$, que representam os diâmetros de partícula correspondentes a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada, respectivamente, assim como os valores de diâmetro médio ($d_{4,3}$) e span.



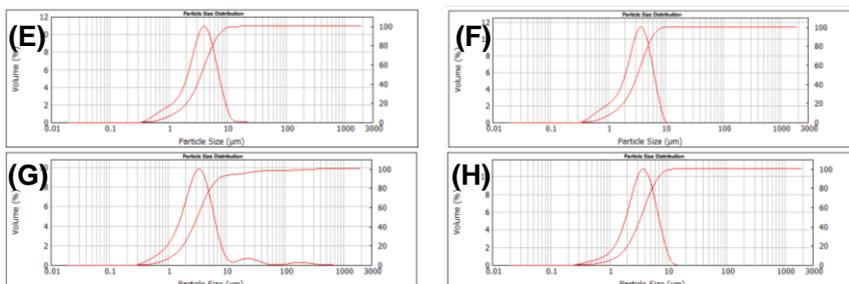


Figura 30. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula das micropartículas poliméricas contendo azitromicina: (A) MPD 1; (B) MPD 2; (C) MPD 3; (D) MPD 4; (E) MPD 5; (F) MPD 6; (G) MPD 7; (H) MPD 8.

Tabela 19. Diâmetros geométricos médios das micropartículas poliméricas obtidos pela técnica de difração a laser.

Amostra	$d_{10\%}$ $\pm DP$ (μm)	$d_{50\%}$ $\pm DP$ (μm)	$d_{90\%}$ $\pm DP$ (μm)	Span $\pm DP$	$d_{4,3}$ $\pm DP$ (μm)
MPD 1	1,76 ($\pm 0,33$)	7,95 ($\pm 0,68$)	19,75 ($\pm 5,08$)	2,25 ($\pm 0,51$)	11,98 ($\pm 4,46$)
MPD 2	1,93 ($\pm 0,60$)	8,08 ($\pm 1,33$)	35,88 ($\pm 19,82$)	4,13 ($\pm 2,37$)	15,43 ($\pm 6,72$)
MPD 3	1,30 ($\pm 0,05$)	5,76 ($\pm 0,26$)	13,25 ($\pm 0,65$)	2,08 ($\pm 0,03$)	7,06 ($\pm 0,43$)
MPD 4	1,66 ($\pm 0,14$)	5,91 ($\pm 0,15$)	12,08 ($\pm 0,80$)	1,76 ($\pm 0,07$)	6,63 ($\pm 0,39$)
MPD 5	1,32 ($\pm 0,10$)	3,64 ($\pm 0,18$)	7,13 ($\pm 0,24$)	1,60 ($\pm 0,07$)	4,08 ($\pm 0,16$)
MPD 6	1,27 ($\pm 0,23$)	3,61 ($\pm 0,48$)	7,20 ($\pm 1,26$)	1,64 ($\pm 0,16$)	4,04 ($\pm 0,61$)
MPD 7	1,46 ($\pm 0,28$)	3,72 ($\pm 0,65$)	9,10 ($\pm 1,77$)	2,01 ($\pm 0,09$)	7,19 ($\pm 1,86$)
MPD 8	1,39 ($\pm 0,19$)	3,54 ($\pm 0,19$)	7,19 ($\pm 1,13$)	1,63 ($\pm 0,19$)	4,15 ($\pm 0,72$)

Como pode ser observado na tabela, as micropartículas apresentaram valores de $d_{50\%}$ variando entre 3,54 μm e 8,08 μm e valores de diâmetro médio ($d_{4,3}$) variando entre 4,04 μm e 15,43 μm . Com exceção da formulação 2 (MPD 2), os valores de span

indicaram a presença de uma distribuição granulométrica razoavelmente homogênea. As amostras preparadas com um volume menor de fase orgânica, para uma mesma massa de PCL, demonstraram maiores tamanhos de partícula, sendo que os maiores tamanhos foram obtidos nas amostras preparadas quando o pH da fase externa foi igual a 6,0. A viscosidade da fase orgânica obtida com maior concentração de polímero pode ter sido responsável por este aumento de tamanho de partícula. O efeito da concentração de polímero sobre o tamanho de partícula foi também verificado por Balmayor e colaboradores (2009) na obtenção de micropartículas contendo dexametasona a partir de blends de amido de milho e policaprolactona. Segundo os autores, a viscosidade da formulação foi diretamente proporcional à concentração de polímero. Em concentrações poliméricas altas houve um aumento significativo da viscosidade da fase orgânica, resultando no aumento do tamanho das gotículas formadas durante a emulsificação, e levando, conseqüentemente, a um aumento do tamanho final das partículas.

4.2.2.5 Determinação do diâmetro aerodinâmico mássico médio

Os valores de diâmetro aerodinâmico médio (DAMM) foram calculados conforme o item 3.2.4.7. Os valores podem ser visualizados na tabela 20.

Tabela 20. Diâmetro aerodinâmico médio das micropartículas de PCL.

Amostra	Fatores estudados			DAMM ± DP (µm)
	Saturação FA ₂	pH FA ₂	Volume fase orgânica	
MPD 1	Não	6,0	5,0	6,43 (±2,39) ^{a,b}
MPD 2	Sim	6,0	5,0	8,99 (±3,92) ^a
MPD 3	Não	10,0	5,0	3,63 (±0,22) ^{b,c}
MPD 4	Sim	10,0	5,0	3,67 (±0,22) ^{b,c}
MPD 5	Não	6,0	25,0	2,62 (±0,10) ^{b,c}
MPD 6	Sim	6,0	25,0	2,29 (±0,35) ^{b,c}
MPD 7	Não	10,0	25,0	4,02 (±1,04) ^{b,c}
MPD 8	Sim	10,0	25,0	2,90 (±0,50) ^{b,c}

As micropartículas apresentaram DAMM variando entre 2,29 μm e 8,99 μm . A ANOVA (tabela 21) evidenciou que, dentre os fatores estudados, o pH da fase aquosa 2 e volume da fase orgânica afetaram significativamente os valores de DAMM, sendo verificada também a interação entre os mesmos ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, $\alpha = 0,05$). Para verificar em quais níveis ocorreu diferença estatística, a diferença mínima significativa (d.m.s) entre as médias foi calculada usando o teste de Tukey (ver equação 15).

Neste caso, o valor de d.m.s calculado foi de 4,76 para q igual a 4,90. Comparando os valores da tabela 20 é possível verificar que a saturação da segunda fase aquosa não afetou o DAMM. O aumento do volume da fase orgânica de 5 mL para 25 mL reduziu o DAMM somente quando o pH da fase externa foi mantido em 6 com saturação (MPD 2 *versus* MPD 6). O efeito do pH sobre o DAMM das partículas só foi significativo quando a saturação da fase aquosa foi realizada e o volume da fase orgânica foi de 5 mL (MPD 2 *versus* 4).

Tabela 21. Análise da variância realizada no estudo do efeito dos fatores de formulação sobre o DAMM.

Fator	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	$F_{\text{calculado}}$	Valor de p	$F_{\text{crítico}}$
1	Saturação	0,4952	1	0,4952	0,1751	0,6812	4,494
2	pH	14,0117	1	14,0117	4,9545	0,0407	4,494
3	Volume	44,4993	1	44,4993	15,7350	0,0012	4,494
1x2	Saturação x pH	4,1267	1	4,1267	1,4592	0,2446	4,494
1x3	Saturação x Volume	6,1663	1	6,1663	2,1804	0,1592	4,494
2x3	pH x Volume	38,5852	1	1,1201	13,6437	0,0020	4,494
1x2x3	Saturação x pH x Volume	1,1202	1	1,12013	0,3961	0,5380	4,494
Resíduo		45,2489	16	2,82805			
Total		154,2533	23				

O diagrama de Pareto (figura 31) confirmou os efeitos dos fatores volume da fase orgânica e pH, assim com da interação entre os mesmos como sendo estatisticamente significativos sobre o

DAMM ($p < 0,05$). Entretanto, o maior efeito foi observado com a alteração do volume da fase orgânica. A equação de ajuste proposta para determinação do DAMM das micropartículas é mostrada abaixo. O coeficiente de correlação para a equação encontrada foi 0,7067.

$$\text{DAMM}(x,y,z) = 0,14x - 0,76y - 1,36z - 0,41xy - 0,51xz + 1,27yz + 0,22xyz + 4,32 \quad \text{Equação 17}$$

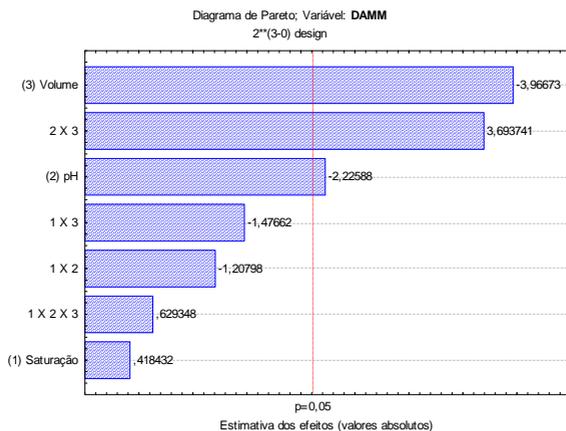


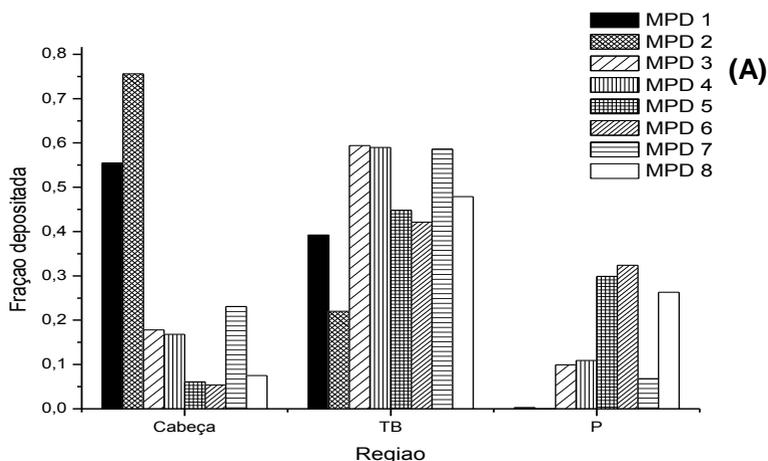
Figura 31. Diagrama de Pareto exibindo os efeitos dos fatores estudados sobre o DAMM ($p < 0,05$).

A deposição de aerossóis farmacêuticos nas vias aéreas depende diretamente do tamanho e da densidade das partículas. Exceto para as formulações 1 e 2 (MPD 1 e MDP 2), partículas com DAMM menores que 5 μm foram obtidas, indicando que as mesmas apresentam boas propriedades de aerossolização. Em especial, as partículas MPD 5 e MPD 8, preparadas com maior volume de fase orgânica apresentaram baixos valores de DAMM, apesar de terem apresentado os maiores valores de densidade esquelética (ver tabela 17). Isto ressalta a importância deste parâmetro de formulação sobre as propriedades de aerossolização dos pós, quando a técnica de dupla emulsão é empregada para a preparação de micropartículas.

A deposição de partículas nas vias aéreas pode ser determinada experimentalmente, através de técnicas de impactação

em cascata. Estes aparelhos consistem em uma série de jatos de ar progressivamente mais finos e de pratos coletores que permitem o fracionamento do aerossol de acordo com o seu DAMM, à medida que este é forçado a passar pelo aparelho (AULTON et al., 2005). As partículas maiores e mais densas permanecem nas regiões superiores do aparelho e as mais leves acompanham o fluxo de ar, sendo cada um dos estágios do impactador correspondendo a uma região do trato respiratório. Atualmente, existem modelos matemáticos que estimam a deposição dos aerossóis nas vias respiratórias, constituindo uma alternativa aos impactadores e outros aparelhos, que nem sempre estão disponíveis em escala laboratorial. O MPPD (*Multiple-Path Particle Dosimetry model v2.11*) utilizado neste trabalho é um modelo matemático que pode ser utilizado para estimar a deposição e remoção de partículas inaladas, tanto em humanos como em ratos. O programa calcula o perfil de deposição de aerossóis de vários tamanhos, desde partículas ultrafinas ($0,01\mu\text{m}$) até grosseiras ($20\ \mu\text{m}$), considerando os mecanismos de deposição por difusão, sedimentação e impactação dentro das vias aéreas.

Os resultados da simulação da deposição das partículas por região (cabeça, traqueobronquial e pulmonar) encontram-se demonstrados na figura 32.



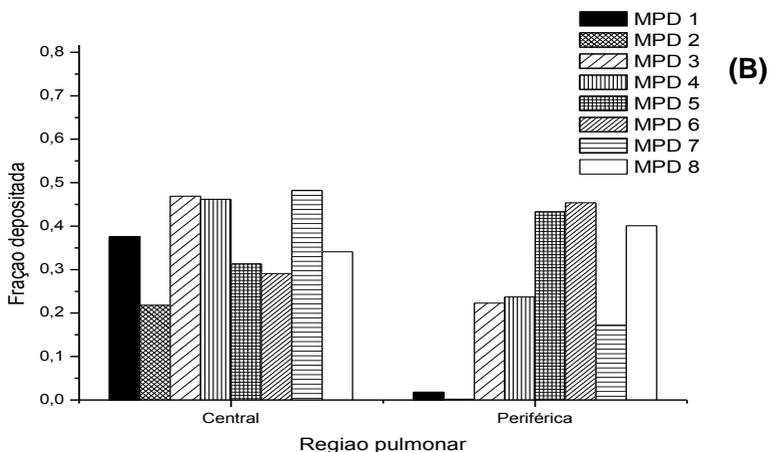


Figura 32. Estimativa de deposição das micropartículas por região, obtida através do software MPPD v2.11. (A) Fração depositada na cabeça e regiões traqueobronquial (TB) e pulmonar (P), (B) Fração depositada na região pulmonar central e periférica.

Na figura 32 é possível observar uma diferença bastante pronunciada nos perfis de deposição das diferentes formulações. As formulações com DAMM mais elevados, acima de $6\ \mu\text{m}$ (MPD 1 e 2) exibiram grandes frações depositadas na porção extratorácica, e frações muito pequenas na região pulmonar. As formulações com valores de DAMM próximos de $4\ \mu\text{m}$ (MPD 3, 4 e 7) exibiram maiores níveis de deposição na região traqueobronquial, enquanto que as formulações de DAMM próximos de $2\ \mu\text{m}$ (MPD 5, 6 e 8) apresentaram frações alcançando as regiões mais profundas dos pulmões (bronquíolos e alvéolos). Estas micropartículas exibem potencial para alcançar a deposição nas porções periféricas dos pulmões, além das porções centrais. A formulação MPD 3, cujo teor foi o mais elevado, certamente terá maior fração depositada na região central do pulmão, entretanto, alcançará também a porção periférica. As frações que atingem a região traqueobronquial e pulmonar correspondem à fração respirável dos aerossóis farmacêuticos. Assim, espera-se a maior eficácia terapêutica das formulações 3 a 8, e em especial das formulações MPD 3 e MPD 5

que apresentaram maior teor de fármaco encapsulado (ver tabela 15).

4.2.2.6 Análise térmica

O comportamento térmico das formulações em determinadas condições fornece valiosas informações sobre o estado físico das nano- e micropartículas, auxiliando no entendimento das interações entre fármaco e matriz polimérica e dos perfis de liberação do fármaco (MOGHADDAM et al., 2013; NATARAJAN et al., 2010). A figura 32 apresenta as curvas termoanalíticas obtidas por DSC da azitromicina, policaprolactona, da mistura física de fármaco e polímero e das micropartículas. Os parâmetros termoanalíticos obtidos após análise das curvas de DSC estão demonstrados na tabela 22.

Conforme pode ser observado na figura 33A, a azitromicina exibiu dois eventos endotérmicos: uma endoterma ampla com pico entre 57 a 102°C, correspondente à perda de água de cristalização da molécula, e uma endoterma a 122,9° C correspondente à fusão do fármaco. O evento endotérmico com pico situado em 62,18° C, correspondente à fusão da PCL, pode ser visualizado na curva termoanalítica obtida para o polímero puro (figura 33B) e para a mistura física (figura 33C). Quando as micropartículas contendo ou não o fármaco foram analisadas, somente o evento correspondente à fusão do polímero foi observado em cerca de 55° C (figura 33D e E), ou seja, com um deslocamento de cerca de 7° C para temperaturas mais baixas. Este resultado sugere a presença de interações entre surfactante e polímero na matriz, que levaram ao deslocamento do evento de fusão da PCL.

O evento de fusão do fármaco não pôde ser visualizado nas curvas de DSC das micropartículas, sugerindo que o mesmo esteja dissolvido na matriz polimérica ou que não tenha sido possível detectá-lo, devido à sua menor concentração em relação ao polímero (MOGHADDAM et al., 2013; JEONG, LEE, CHO, 2003).

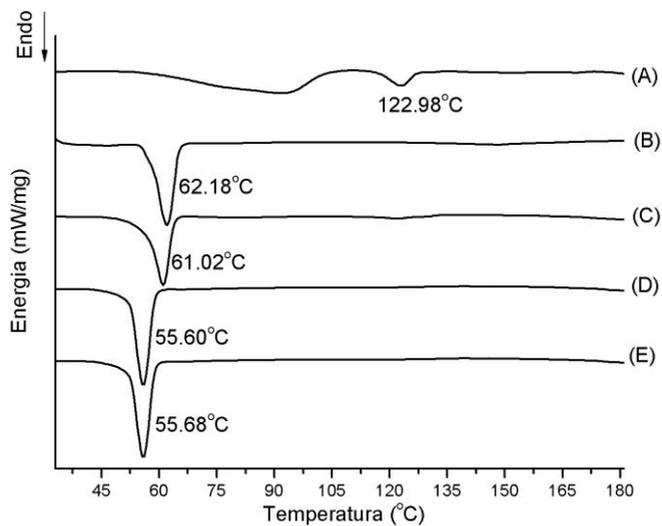


Figura 33. Termogramas da (A) Azitromicina diidratada; (B) PCL; (C) Mistura física fármaco: polímero (1:5); (D) MPD 1 branca; (E) MPD 1 contendo azitromicina.

Tabela 22. Parâmetros termoanalíticos obtidos das curvas de DSC após análise das amostras de matérias-primas e formulações.

Amostra	Temperatura de fusão (°C)	Entalpia de fusão (J/g)	Cristalinidade relativa (%)
Azitromicina	122,98	-12,99	-
Policaprolactona	62,18	-70,55	100,0
Mistura física 1:5	61,02	-51,77	91,7
MPD 1	55,68	-64,98	110,9
MPD 2	56,40	-59,70	94,6
MPD 3	54,42	-50,98	93,8
MPD 4	55,28	-59,39	89,3
MPD 5	55,28	-69,85	114,0
MPD 6	55,74	-62,50	91,8
MPD 7	55,92	-66,04	101,4
MPD 8	55,23	-68,85	101,9
MPD 1 branca	55,60	-64,61	91,6
MPD 5 branca	55,49	-66,83	94,7

As entalpias dos eventos correspondentes à fusão do polímero nas micropartículas preparadas com azitromicina situaram-se entre 50,98 J/g e 69,85 J/g. Os valores de cristalinidade relativa, estimados em relação ao valor de ΔH obtido para o polímero puro, indicaram que a técnica de dupla emulsão não causou alteração no grau de cristalinidade da PCL nas micropartículas.

As entalpias dos eventos de fusão da PCL nas formulações encontraram-se entre 50,98 e 69,85 J/g. Os valores de cristalinidade relativa (tabela 23) mostraram que os procedimentos empregados na preparação das micropartículas não alteraram a cristalinidade do polímero.

As curvas obtidas na análise termogravimétrica do fármaco, do polímero e das micropartículas são mostradas na figura 34. A perda de massa entre 65° C e 110° C, correspondente à perda de água de cristalização da azitromicina, pode ser visualizada na figura 34A. A azitromicina e a PCL sofreram perda de massa em decorrência da degradação a partir de 220° C e 250° C, respectivamente (figura 34A e B).

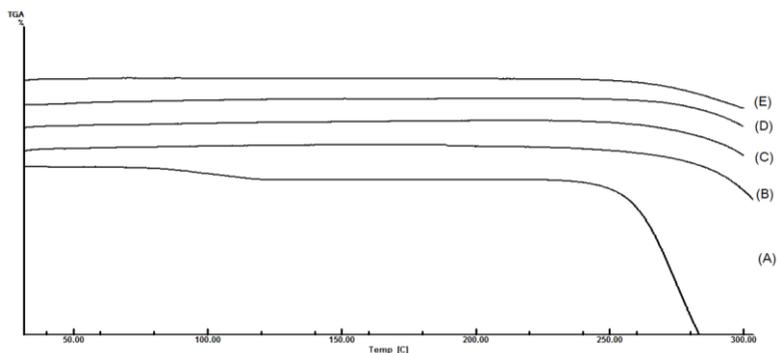


Figura 34. Curvas de TGA, para (A) Azitromicina diidratada, (B) PCL, (C) Mistura física, (D) MPD 1 branca, (E) MPD 1.

4.2.2.7 Difração de raios-X

A figura 35 apresenta o perfil cristalino da azitromicina e da PCL, das microparticulas contendo azitromicina (MPD 1 a 8) e da formulação MPD 1 branca (sem fármaco).

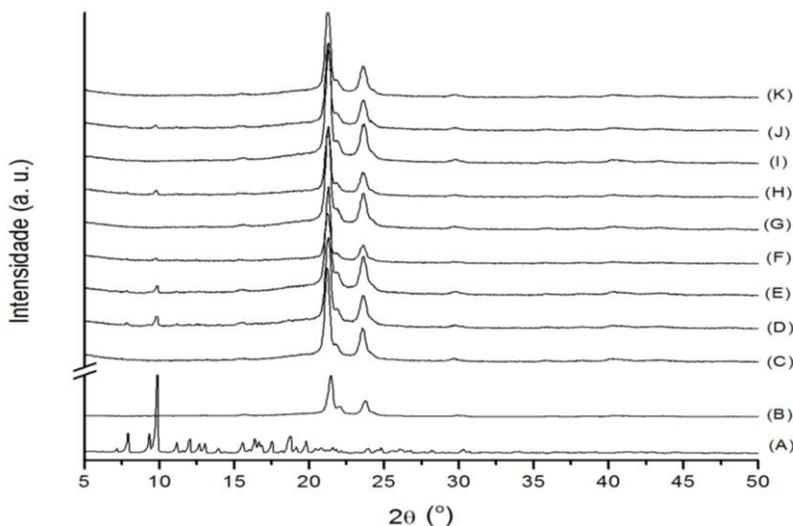


Figura 35. Perfil de reflexão das amostras (A) Azitromicina diidratada, (B) PCL, (C) MPD 1 branca e (D) MPD 1, (E) MPD 2, (F) MPD 3, (G) MPD 4, (H) MPD 5, (I) MPD 6, (J) MPD 7 e (K) MPD 8.

O perfil de reflexão da azitromicina exibiu características de alta cristalinidade, com pico característico em 2θ igual $9,58^\circ$. A PCL exibiu o perfil de um polímero semicristalino, com picos em 2θ igual a $21,44^\circ$ e $23,85^\circ$. Todas as amostras analisadas, incluindo as micropartículas brancas, apresentaram perfis de cristalinidade similares à PCL (matéria-prima). Entretanto, as amostras MPD 1, 2, 3, 5 e 7 apresentaram também o pico característico da azitromicina, próximo de $9,58^\circ$, indicando que pelo menos uma fração de fármaco encontra-se na forma cristalina nestas formulações. Estes resultados corroboram a fotomicrografia mostrada na figura 28, onde pequenos cristais de azitromicina puderam ser visualizados na superfície da partícula.

4.2.2.8 Espectroscopia no Infravermelho

A figura 36 apresenta os espectros no infravermelho das matérias-primas (azitromicina e PCL), da mistura física de fármaco e polímero, e das micropartículas.

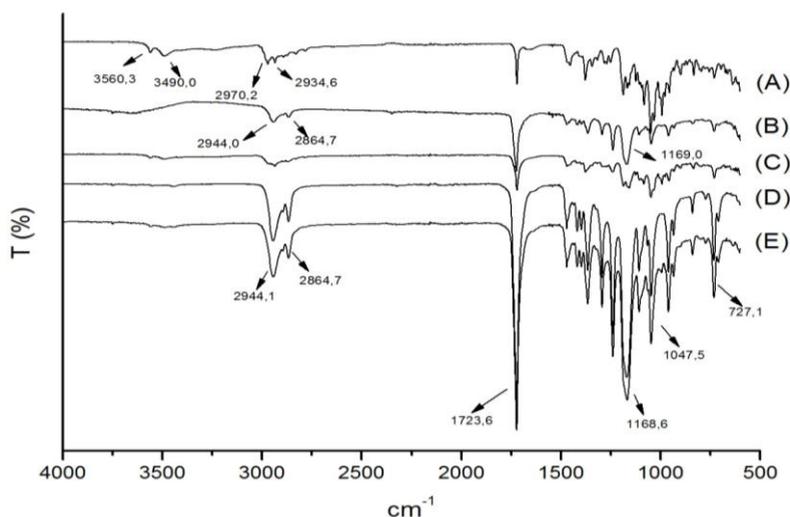


Figura 36. Espectros de FT-IR obtidos para (A) azitromicina diidratada, (B) PCL; (C) mistura física; (D) MPD 1 branca e (E) MPD 5 contendo fármaco.

Como mostrado na figura 36, a azitromicina exibiu bandas características de sua estrutura química, como o estiramento –OH em 3560,3 e 3490 cm^{-1} , e –CH em 2970,2 e 2934,6 cm^{-1} . A banda referente ao estiramento C=O da azitromicina ocorreu em 1723,6 cm^{-1} , estando esta sobreposta à banda referente ao estiramento C=O da PCL. O espectro da PCL pura exibiu ainda bandas em 2864,7 e 2944 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas às ligações C-H dos carbonos saturados, e em 1168,6 e 1047,5 cm^{-1} , relativas às ligações éster C-C(=O)-O. As micropartículas exibiram os mesmos picos característicos das matérias-primas, não se podendo assim aferir a presença de interações entre fármaco e polímero por FT-IR.

4.2.2.9 Avaliação do perfil de liberação in vitro da azitromicina

4.2.2.9.1 Solubilidade da azitromicina em tampão fosfato pH 7,4

A solubilidade da azitromicina em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 encontrada experimentalmente foi de $3,77 \pm 0,34$ mg/mL, enquanto que em água pura a solubilidade é bastante inferior ($67,78 \pm 20,34$ $\mu\text{g/mL}$). Assim, de modo a atender a condição *sink* exigida para o ensaio de liberação, uma quantidade de micropartículas correspondente a 25 mg de fármaco foi adicionada em 250 mL de tampão fosfato pH 7,4, resultando em uma concentração máxima de 100 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina no meio.

4.2.2.9.2 Otimização da metodologia analítica para quantificação da azitromicina em tampão fosfato pH 7,4 por CLAE

Na figura 37 é possível visualizar os cromatogramas correspondentes ao meio de dissolução puro e de uma solução padrão de azitromicina em tampão fosfato pH 7,4, obtidos após análise por CLAE. A azitromicina exibiu tempo de retenção de 7,46 minutos. A curva de calibração média obtida após análise das soluções padrões de azitromicina por CLAE em três dias consecutivos é apresentada na figura 38.

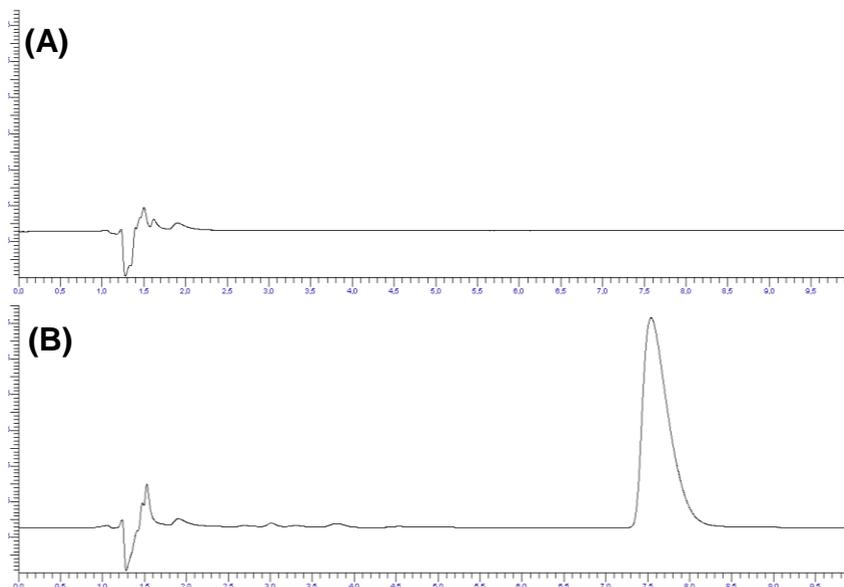


Figura 37. Cromatogramas referentes ao (A) PBS e à (B) azitromicina, respectivamente.

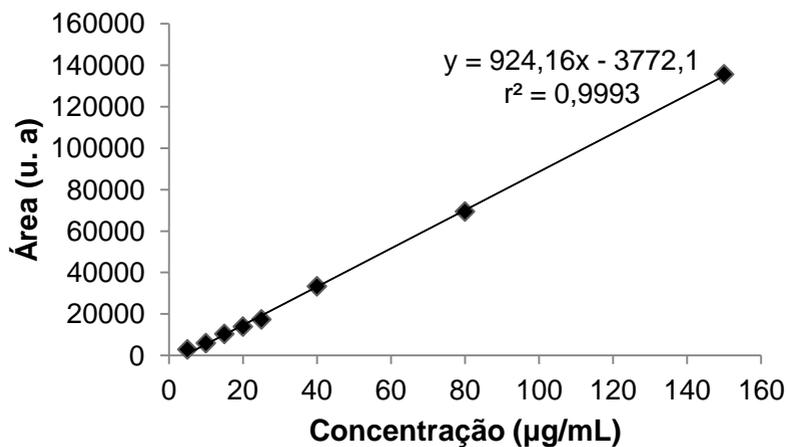
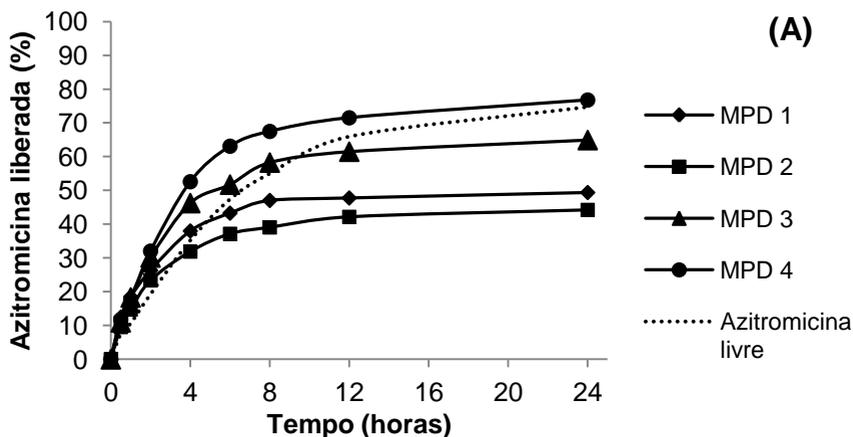


Figura 38. Curva de calibração da azitromicina em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 após análises por CLAE.

A equação da reta encontrada foi $y = 924,16x - 3772,1$, com coeficiente de correlação igual a 0,9993. A análise da regressão evidenciou a linearidade do método nas concentrações testadas ($F_{\text{calculado}} 8605,915 > F_{\text{crítico}} 1,06 \times 10^{-6}$). Os limites de quantificação e de detecção encontrados foram iguais a 5,54 $\mu\text{g/mL}$ e 1,83 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

4.2.2.9.3 Perfil de liberação da azitromicina

Os perfis de liberação da azitromicina a partir das micropartículas poliméricas em tampão fosfato pH 7,4 são apresentados na figura 39. Os valores de eficiência de dissolução, estimados conforme 3.2.5.3, são mostrados na tabela 24.



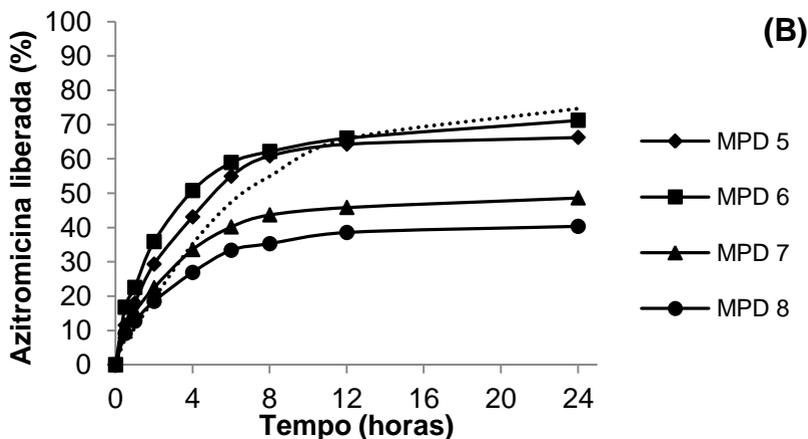


Figura 39. Perfis de liberação da azitromicina a partir das micropartículas de PCL. Em (A) são mostrados os perfis das amostras MPD 1 a 4 e em (B) das amostras MPD 5 a 8.

Tabela 23. Resultados da eficiência de dissolução das micropartículas.

Amostra	Eficiência de dissolução (%)
Azitromicina	56,05 ($\pm 1,38$)
MPD 1	42,18 ($\pm 1,05$)
MPD 2	37,99 ($\pm 0,62$)
MPD 3	55,20 ($\pm 2,83$)
MPD 4	63,95 ($\pm 3,85$)
MPD 5	57,00 ($\pm 2,11$)
MPD 6	60,52 ($\pm 1,67$)
MPD 7	41,20 ($\pm 0,74$)
MPD 8	34,08 ($\pm 1,25$)

As micropartículas permitiram uma liberação prolongada da azitromicina, por mais de 24 horas, tendo alcançado um platô de liberação a partir de 12 horas para todas as formulações. Entretanto, os valores de eficiência de dissolução variaram entre 34,08% e 63,95%, sendo que os maiores valores foram obtidos para as formulações MPD 4 e MPD 6. O perfil de dissolução da azitromicina livre foi testado a fim de verificar o efeito da membrana de diálise sobre a liberação, uma vez que esta atua como uma

barreira para a difusão do fármaco em direção ao meio. A azitromicina foi adicionada na forma de uma dispersão sólida e por esta razão mostrou ser lentamente dissolvida. Assim, os maiores valores de eficiência de dissolução encontrados para MPD 4 e 6 podem estar relacionados à ausência de cristais de fármaco nas partículas, como mostrado por DRX (ver figura 35). Por outro lado, algumas das formulações testadas exibiram menores velocidades de dissolução em relação ao fármaco livre, mostrando o efeito da matriz polimérica sobre o perfil de liberação da azitromicina. Outros fatores como localização do fármaco na matriz polimérica, estrutura interna das partículas e tamanho também podem ter contribuído para a obtenção de tais perfis de liberação.

Três mecanismos podem governar a liberação de fármacos a partir de polímeros biodegradáveis: difusão Fickiana, difusão por poros na matriz e liberação relacionada à erosão do polímero, que dependem das propriedades do polímero, do fármaco e do sistema carreador como um todo (JEONG, LEE, CHO 2003). Fotomicrografias das partículas obtidas após ensaio de liberação são mostradas na figura 40. Após 24 horas de liberação as partículas mantiveram-se intactas (sem perda de massa), indicando que a liberação ocorreu por processos de dissolução e/ou difusão do fármaco através da matriz polimérica.

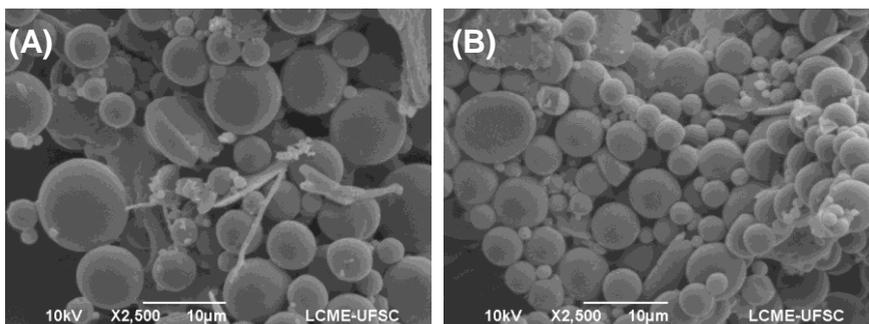


Figura 40. Fotomicrografias realizadas após o ensaio de dissolução (A) MPD 1 e (B) MPD 3.

A fim de caracterizar o modelo de transporte do fármaco, os modelos cinéticos de liberação de zero e primeira ordens, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas e Baker-Lonsdale foram aplicados a todos os perfis de liberação (RODRIGUES, SILVA

2005). Aquele que mais se ajustou aos perfis obtidos foi o de Higuchi, aplicado para a liberação de até 8 horas. Este modelo é geralmente utilizado para analisar o mecanismo de liberação de difusão de fármacos de acordo com a primeira lei de Fick, sendo então dependente da raiz quadrada do tempo (RODRIGUES, SILVA 2005). O valor de k (constante cinética) e o r (coeficiente de correlação) encontrados encontram-se na tabela 24.

$$f_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 18}$$

onde f_t é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo t , K_H é a constante de liberação de Higuchi.

Tabela 24. Parâmetros cinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo de Higuchi.

Amostra	k	r^2
MPD 1	0,4498	0,9913
MPD 2	0,5219	0,9847
MPD 3	0,3498	0,9760
MPD 4	0,2901	0,9814
MPD 5	0,3398	0,9938
MPD 6	0,3310	0,9875
MPD 7	0,4759	0,9948
MPD 8	0,5921	0,9948

Os resultados obtidos parecem estar de acordo com dados da literatura. Segundo um estudo publicado por Wang e colaboradores (2009) o mecanismo de liberação das microsferas preparadas a partir da PCL é comumente a difusão do fármaco através da matriz polimérica, sendo que a distribuição do fármaco na matriz é importante, pois as moléculas que ficam próximas à superfície das partículas tendem a sofrer difusão mais rapidamente. Coccoli e colaboradores (2007) também postularam a importância da microestrutura interna das partículas na regulação da liberação do fármaco encapsulado. Destaca-se que a liberação lenta da azitromicina *in vivo* pode apresentar efeito biológico prolongado. Entretanto, a velocidade de liberação pode ser aumentada devido à contribuição enzimática para degradação da PCL (PÉREZ et al., 2000).

5 CONCLUSÕES

- Micropartículas de policaprolactona contendo azitromicina foram obtidas com sucesso por meio da técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente (A/O/A).

- O método analítico de espectrofotometria de absorção no visível após complexação do fármaco com alizarina mostrou ser sensível, específico, preciso e exato para determinação da azitromicina nas micropartículas.

- As micropartículas obtidas constituíram em um pó branco, bastante fino, com teor de azitromicina variando entre 3,5 e 23,1 % (m/m), e eficiência de encapsulação entre 9,4 e 61,5%, dependendo da formulação testada. O delineamento estatístico fatorial 2^3 mostrou que a saturação da fase aquosa secundária e o volume de fase orgânica afetaram significativamente o teor de fármaco encapsulado. A interação foi observada entre os fatores 1 (saturação da fase aquosa) e 3 (volume da fase orgânica), 2 (pH) e 3 (volume da fase orgânica) e entre os três fatores estudados. Entretanto, os maiores efeitos foram verificados quando a saturação da fase aquosa e o volume da fase orgânica foram testados.

- As densidades aparente e compactada apresentaram valores bastante reduzidos, abaixo de 0,2 g/mL, e o fluxo das micropartículas foi classificado, segundo índice de Carr, como sendo bom ou excelente.

- As fotomicrografias obtidas por MEV exibiram partículas esféricas e de superfície lisa, sem poros aparentes. O corte das partículas após congelamento revelou, ainda, a estrutura interna “oca”, que justificou os baixos valores de densidade aparente das mesmas.

- O diâmetro geométrico médio das partículas variou de 4,0 a 15,4 μm , e baixos valores de span foram obtidos. As micropartículas formuladas com menor volume de fase orgânica (para uma mesma massa de polímero) apresentaram maiores tamanhos, indicando que a maior viscosidade da mesma foi responsável pelo aumento do diâmetro médio das micropartículas.

- O DAMM foi calculado após determinação da densidade esquelética das partículas por picnometria a hélio. Os valores médios de DAMM variaram entre 2,3 a 8,9 μm . O delineamento estatístico fatorial mostrou que os valores de DAMM foram afetados unicamente pelo volume da fase orgânica e pH da fase aquosa secundária, ocorrendo interação entre estes dois fatores. Entretanto,

o maior efeito foi observado com a alteração do volume da fase orgânica.

- Segundo simulação em software MPPD (v2.11), as amostras MPD 5, 6 e 8 apresentaram as maiores frações de partículas depositadas em regiões mais profundas dos pulmões. As formulações de DAMM superiores (MPD 1 e 2) ficariam mais retidas em regiões extratorácicas, como a boca e garganta.

- A análise térmica das formulações indicou a existência de interações entre surfactante e polímero. Ainda, o pico correspondente à fusão do fármaco não pode ser observado, sugerindo que este se encontra dissolvido na matriz polimérica ou, ainda, que o fármaco não pode ser detectado em decorrência da sua menor concentração em relação ao polímero nas formulações. Por outro lado, nos difratogramas obtidos após análise por DRX foi possível visualizar reflexões correspondentes à azitromicina em algumas formulações, indicando que uma fração do fármaco encontra-se no estado sólido nas partículas.

- Uma metodologia analítica de CLAE foi desenvolvida para quantificação da azitromicina em tampão fosfato pH 7,4. Os ensaios de liberação revelaram que a azitromicina é lentamente liberada a partir das micropartículas, por mais de 24 horas, alcançando um platô de liberação a partir de 12 horas para todas as formulações. Entretanto, os valores de eficiência de dissolução variaram entre 34,08% e 63,95%, sendo que os maiores valores foram obtidos para as formulações MPD 4 e MPD 6, em que não foram observados reflexões da azitromicina por DRX, sugerindo que o estado físico do fármaco afetou a liberação.

- O modelo cinético de Higuchi foi o que mais se ajustou aos perfis de liberação indicando que a liberação da azitromicina ocorre por difusão da matriz polimérica.

- Assim, o conjunto de resultados mostrou que o sistema desenvolvido para liberação pulmonar da azitromicina visando o tratamento da PAC é promissor, especialmente, as formulações MPD 3 e 5, que apresentaram teores de azitromicina interessantes e boa penetração pulmonar. Como perspectivas futuras, espera-se testar a toxicidade e a eficácia *in vitro* e *in vivo* das micropartículas.

6 BIBLIOGRAFIA

ALBERTSSON, A-C.; VARMA, I. K. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1466-1486, 2003.

ALVARES, J. R.; ALMEIDA, S. C. G.; GUERRA, M. L. L. S.; BRANDILEONE, M. C. C. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 6, p. 495-502, 2009.

ARNOLD, M. M.; GORMAN, E. M.; SCHIEBER, L. J.; MUNSON, E. J.; BERKLAND, C. NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 121, p. 100–109, 2007.

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

AZH DARZADEH, M.; LOTFIPOUR, F.; ZAKERI-MILANI, P.; MOHAMMADI, G.; VALIZADEH, H. Anti-bacterial performance of azithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system against different gram-negative and grampositive bacteria. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 17-24, 2012.

BAE, S. E., SON, J. S., PARK, K., HAN, D. K. Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 37–43, 2009.

BALMAYOR, E.R.; TUZLAKOGLU, K.; AZEVEDO, H.S., REIS, R.L. Preparation and characterization of starch-poly-ε-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1035-1045, 2008.

BARANDA, F.; GÓMEZ, A.; GÓMEZ, B. Antibioterapia inhalada en otras enfermedades respiratorias. **Archivos de Bronconeumología**, v. 47, n. 6, p. 24-29, 2011.

BEBAWY, L. I.; KELANI, K. E.; FATTAH, L. A.; AHMAD, A. K. S. Study of 7,7',8,8'-tetracyanoquinodimethane charge transfer

complexes with some lone-pair-donating drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 86, p. 1030–1033, 1997.

BLASI, F.; ALIBERTI, S.; TARSIA, P. Clinical applications of azithromycin microspheres in respiratory tract infections. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 551-559, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde/SE/Datasus – Sistema de Informações Hospitalares do SUS – SIH/SUS. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def> >. Acesso em 12/02/2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 44/2009, de 17 de agosto de 2009 – Dispõe sobre Boas Práticas Farmacêuticas para o controle sanitário do funcionamento, da dispensação e da comercialização de produtos e da prestação de serviços farmacêuticos em farmácias e drogarias e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/180809_rdc_44.pdf> Acesso em: 28/01/2010.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

CHAN, H-K.; CHEW, N. Y. K. Novel alternative methods for the delivery of drugs for the treatment of asthma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 793–805, 2003.

CHEN, D. R., BEI, J. Z., WANG, S. G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 67, p. 455 – 459, 2000.

COCCOLI, V.; LUCIANI, A.; ORSI, S.; GUARINO, V.; CAUSA, F.; NETTI, P. A. Engineering of poly (ϵ -caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, p. 1703–1711, 2008.

DANIHER, D. I.; ZHU, J. Dry powder platform for pulmonary drug delivery. **Particuology**, v. 6, p. 225–238, 2008.

DHANVIJAY, P. U.; SHERTUKDE, V. V.; KALKAR, A. K. Isothermal and Nonisothermal Crystallization Kinetics of Poly(ϵ -Caprolactone). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 1333–1343, 2012.

DUDDU, S. P.; SISK, S. A.; WALTER, Y. H.; TARARA, T. E.; TRIMBLE, K. R.; CLARK, A. R.; ELDON, M. A.; ELTON, R. C.; PICKFORD, M.; HIRST, P. H.; NEWMAN, S. P.; WEERS, J. G. Improved Lung Delivery from a Passive Dry Powder Inhaler Using an Engineered PulmoSphere Powder. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 5, 2002.

EDLUND, U.; ALBERTSSON, A.-C. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, 2001.

EDWARDS, D. A.; BEN-JEBRIA, A.; LANGER, R. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, p. 379-385, 1998.

EDWARDS, D. A.; HANES, J.; CAPONETTI, G.; HRKACH, J.; BEN-JEBRIA, A.; ESKEW, M. L.; MINTZES, J.; DEEVER, D.; LOTAN, N.; LANGER, R. Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, **Science**, v. 276, 1997.

European Pharmacopoeia, 4th ed., Strasbourg: Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia, 2002.

FELMINGHAM, D., FARRELL, D. J., REINERT, R. R., MORRISSEY, I. Antibacterial resistance among children with community-acquired respiratory tract infections. **Journal of Infection**, v. 48, p. 39-55, 2004.

GANDHI, R.; PILLAI, O.; THILAGAVATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, B.; KAUL, C. L.; PANCHAGNULA, R.; Characterization of Azithromycin hydrates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 175–184, 2002.

GHARI, T.; KOBARFARD, F.; MORTAZAVI, S. A. Development of a Simple RP-HPLC-UV Method for Determination of Azithromycin in

Bulk and Pharmaceutical Dosage forms as an Alternative to the USP Method. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p.57-63, 2013.

GIOVAGNOLI, S., BLASI, P., SCHOUBBEN, A., ROSSI, C., RICCI, M. Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, p. 103–111, 2007.

GUARINO, V.; TADDEI P.; DI FOGGIA, M.; FAGNANO, C.; CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L. The Influence of Hydroxyapatite Particles on In Vitro Degradation Behavior of Poly ε-Caprolactone–Based Composite Scaffolds. **Tissue engineering: Part A**, v. 15, n. 11, 2009.

HAMISHEHKAR, H.; EMAMI, J.; NAJAFABADI, A. R.; GILANI, K.; MINAIYAN, M.; MAHDAVI, H.; NOKHODCHI, A. 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**, v. 389, p. 74–85, 2010.

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. "Farmacologia", 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

HASSAN, M. S.; LAU, R. W. M. Effect of Particle Shape on Dry Particle Inhalation: Study of Flowability, Aerosolization, and Deposition Properties. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, 2009.

HEYDER, J. Deposition of Inhaled Particles in the human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, p. 315-320, 2004.

HICKEY, A. J.; LU, D.; ASHLEY, E. D.; STOUT, J. Inhaled Azithromycin Therapy. **Journal of aerosol medicine**, v. 19, n. 1, p. 54-60, 2006.

HOPKINS, S. Clinical Toleration and Safety of Azithromycin. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3A, 1991.

HUANG, W.; LIU, X. J.; ZHAO, F. L. Spectrophotometric determination of azithromycin by charge transfer reaction. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v. 26, n. 5, p. 913-916, 2006.

HUSSAIN, M.; MADL, P.; KHAN, A. Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases. Part-I. **theHealth**, v. 2, n. 2, p. 51-59, 2011.

ISLAM, N.; GLADKI, E. Dry powder inhalers (DPIs)—A review of device reliability and innovation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 1-11, 2008.

JEONG, J-C.; LEE, J.; CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 249– 258, 2003.

JONES, R. N; JACOBS, M. R.; SADER, H. S. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 197–204, 2010.

KELANI, K.; BEBAWY, L. I.; ABDEL-FATTAH, L.; AHMAD A. S. Spectrophotometric Determination of Some n-Donating Drugs Using DDQ. **Analytical Letters**, v. 30, n. 10, 1997.

KIM, H. K., CHUNG, H. J., PARK, T. G. Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone. **Journal of Controlled Release**, v. 112, p. 167–174, 2006.

KIM, Y. H.; SHING, K. S. Supercritical fluid-micronized ipratropium bromide for pulmonary drug delivery. **Powder Technology**, v. 182, p. 25–32, 2008.

KIM, I.; BYEON, H. J.; KIM, T. H.; LEE, E. S.; OH, K. T.; SHIN, B. S.; LEE, K. C.; YOUN, Y. S. Doxorubicin-loaded highly porous large PLGA microparticles as a sustained release inhalation system for the

treatment of metastatic lung cancer. **Biomaterials**, v. 33, p. 5574-5583, 2012.

KIM, Y. H.; SHING, K. S. Supercritical fluid-micronized ipratropium bromide for pulmonary drug delivery. **Powder Technology**, v. 182, p. 25–32, 2008.

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; KRENZLIN, S.; SIEPMANN, J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 198-206, 2006.

KORSMEYER, R. W.; GUMY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KWON, M. J.; BAE, J. H.; KIM, J. J.; NA, K.; LEE, E. S. Long acting porous microparticle for pulmonary protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, p. 5-9, 2007.

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

LAVOIE, F.; BLAIS, L.; CASTILLOUX, A. M.; SCALERA, A.; LELORIER, J. Effectiveness and cost-effectiveness of antibiotic treatments for community acquired pneumonia (CAP) and acute exacerbations of chronic bronchitis (AECB). **Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 2, 2005.

LEE, J.; OH, Y. J.; LEE, S. K.; LEE, K.Y. Facile control of porous structures of polymer microspheres using an osmotic agent for pulmonary delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 1, p. 61-67, 2010.

LI, Q.; RUDOLPH, V.; WEIGL, B.; EARL, E. Interparticle van der Waals force in powder flowability and compactibility. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 77–93, 2004.

LI, X.; CHANG, S.; DU, G.; LI, Y.; GONG, J.; YANG, M.; WEI, Z. Encapsulation of azithromycin into polymeric microspheres by reduced pressure-solvent evaporation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, p. 79– 88, 2012.

LODE, H.; BORNER, K.; KOEPPE, P.; SCHABERG, T. Azithromycin—review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, Suppl. C, p. 1-8, 1995.

MANDELL, L. A.; WUNDERINK, A. R. G.; ANZUETO, A.; BARTLETT, A. G.; CAMPBELL, G. D.; DEAN, N. C.; DOWELL, S. F.; FILE, T. M. JR.; MUSER, D. M.; NIEDERMAN, M. S.; TORRES, A.; WHITNEY, C. G. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p.S27–72, 2007.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2005.

MOGHADDAM, P. H.; RAMEZANI, V.; ESFANDI, E.; VATANARA, A.; NABI-MEIBODI, M.; DARABI, M.; GILANI, K.; NAJAFABADI, A. R. Development of a nano–micro carrier system for sustained pulmonary delivery of clarithromycin. **Powder Technology**, v. 239, 478–483, 2013.

MOHAMMADI, G.; NOKHODCHI, A.; BARZEGAR-JALALI, M.; LOTFIPOUR, F.; ADIBKIAK, K.; EHYAEI, N.; VALIZADEH, H. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 39– 44, 2011.

MUSANTE, C. J.; SCHROETER, J. D.; ROSATI, J. A.; CROWDER, T. M.; HICKEY, A. J.; MARTONEN, T. B. Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 7, 2002.

NAIR, G. B.; NIEDERMAN, M. S. Community-Acquired Pneumonia: An Unfinished Battle. **Medical Clinics of North America**, v. 95, p. 1143–1161, 2011.

NAIR, L.; LAURENCINA, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762–798, 2007.

NATARAJAN, V.; KRITHICA, N.; MADHAN, B.; SEHGAL, P. K. Formulation and Evaluation of Quercetin Polycaprolactone Microspheres for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 195–205, 2011.

OH, Y. J.; LEE, J.; SEO, J. Y.; RHIM, T.; KIM, S-H.; YOON, H. J.; LEE, K. Y. Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model. **Journal of Controlled Release**, n. 150, p. 56–62, 2011.

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

PAULA, C. E. R.; ALMEIDA, V. G. K; CASSELLA, R. J. Novel spectrophotometric method for the determination of azithromycin in pharmaceutical formulations based on its charge transfer reaction with quinalizarin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1664-1671, 2010a.

PAULA, C. E. R.; ALMEIDA, V. G. K.; CASSELLA, R. J. Determinação espectrofotométrica de cefalexina em formulações farmacêuticas explorando a sua reação de transferência de carga com a quinalizarina. **Quimica Nova**, v. 33, n. 4, p. 914-919, 2010b.

PÉREZ, M. H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A., UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 429–438, 2000.

PILCER, G.; AMIGHI, K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, p. 1-19, 2010.

PORTUGAL. MINISTERIO DA SAUDE. **Farmacopeia Portuguesa VII**: edição oficial. Lisboa: Infarmed, 2002. Lisboa: 1474 p.

RAVAL, J. P.; NAIK, D. R.; AMIN, K. A.; PATEL, P. S. Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2011.

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Revista Colombiana de Ciências Químicas Farmacêuticas**, v. 34, n. 1, 2005.

RUDAN I, BOSCHI-PINTO C, BILOGLAV Z, MULHOLLAND K, CAMPBELL H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, p. 408-416, 2008.

RUDAN, I.; EL ARIFEEN, S.; BHUTTA, Z. A.; BLACK, R. E.; BROOKS, A. Setting research priorities to reduce global mortality from childhood pneumonia by 2015. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 9, 2011.

RUDAN, I.; O'BRIEN, K. L.; NAIR, H.; LIU, LI.; THEODORATOU, E.; QAZI, S.; LUKŠIĆ, I.; WALKER, C. L. F.; BLACK, R. E.; CAMPBELL, H. on behalf of Child Health Epidemiology Reference Group (CHERG). Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. **Journal of Global Health**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2013.

RUUSKANEN, O.; LAHTI E.; JENNINGS L. C.; MURDOCH, D. R. Viral pneumonia. **Lancet**, n. 377, p. 1264–175, 2011.

SARRAGUÇA, M. C.; CRUZ, A. V.; SOARES, S. O.; AMARAL, H. R.; COSTA, P. C.; LOPES, J. A. Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 484–492, 2010.

SILVA, L. F. C.; KASTEN, G.; CAMPOS, C. E. M.; CHINELATTO, A. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of quercetin-loaded solid lipid microparticles for pulmonary delivery. **Powder technology**, v. 239, p. 183-192, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes para Pneumonias Adquiridas na Comunidade (PAC) em Pediatria. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33 (Suppl 1), p. S31-S50, 2007.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SUHAGIA, B. N.; RATHOD, I. S.; PATEL, H. M.; DOSHI, K. R. Determination of azithromycin in pharmaceutical dosage forms by spectrophotometric method. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 2, p. 242-245, 2006.

SULTANA, A.; ARAYNE, M. S.; HUSSAIN, F.; FATIMA, A. Degradation studies of azithromycin and its spectrophotometric determination in pharmaceutical dosage forms. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.19, n. 2, p. 94-98, 2006

SWEETMAN, S. C. (ed.) *Martindale, The complete drug reference*. The Pharmaceutical Press, London (2009) 207-209.

TAYLOR, G.; KELLAWAY, I. Pulmonary drug delivery. In: Hillery, A., Lloyd, A., Swarbrick, J. (Eds.). *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*. New York; Taylor & Francis: 2001, p. 269-300.

TIMOUMI, S.; MANGIN, D.; PECZALSKI, R.; ZAGROUBA, F.; ANDRIEU, J. Stability and thermophysical properties of azithromycin dehydrate. **Arabian Journal of Chemistry**, 2010.

TOGAMI, K.; CHONO, S.; MORIMOTO, K. Distribution characteristics of clarithromycin and azithromycin, macrolide antimicrobial agents used for treatment of respiratory infections, in lung epithelial lining fluid and alveolar macrophages. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 32, p. 389–397, 2011.

TORANO, J. S.; GUCHELAAR, H. J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 720, p. 89–97, 1998.

TULI, R. A.; DARGAVILLE, T. R.; GEORGE, G. A.; ISLAM, N. Polycaprolactone Microspheres as Carriers for Dry Powder Inhalers: Effect of Surface Coating on Aerosolization of Salbutamol Sulfate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, 2012.

UNGARO, F.; BIANCA, R. E. V.; GIOVINO, C.; MIRO, A.; SORRENTINO, R.; QUAGLIA, F.; LA ROTONDA, M. I. Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs. **Journal of Controlled Release**, v. 135, p. 25–34, 2009.

UNGARO, F.; D' ANGELO, I.; MIRO, A.; LA ROTONDA, M. I.; QUAGLIA, F. Engineered PLGA nano- and micro-carriers for

pulmonary delivery: challenges and promises. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 1217–1235, 2012.

UNICEF/WHO, *Pneumonia: The forgotten killer of children*, New York, 2006. 40 pg. Disponível em <http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9280640489/en/index.html>. Acesso em 09/11/2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007. In: USP/NF 30/ 25. The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, p. 1472.

VANBEVER, R.; MINTZES, J. D.; WANG, J.; NICE, J.; CHEN, D.; BATYCKY, R.; LANGER, T.; EDWARDS, D. A. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 11, p. 1735-1742, 1999.

WANG, H.; CHEN, M.; XUA, Y.; SUN, H.; YANG, Q.; HU, Y.; CAO, B.; CHU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, R.; YU, Y.; SUN, Z.; ZHUO, C.; NI, Y.; HU, B.; TAN, T. B.; HSUEH, P-R.; WANG, J-H.; KO, W-C.; CHEN, I-H.; WAHJONO, H. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens associated with community-acquired respiratory tract infections in Asia: report from the Community-Acquired Respiratory Tract Infection Pathogen Surveillance (CARTIPS) study, 2009–2010. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 376–383, 2011.

WANG, X.; WANG, Y.; WEI, K.; ZHAO, N.; ZHANG, S.; CHEN, J. Drug distribution within poly(e-caprolactone) microspheres and in vitro release. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 209, p. 348–354, 2009.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C.D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WOLKERS, P. C. B.; MANTESE, O. C.; PAULA, A.; ALMEIDA, V. V. P.; AGUIAR, P. A. D. F.; ALVARES, J. R.; ALMEIDA, S. C. G.; BRANDILEONE, M. C. C. New susceptibility breakpoints in

antimicrobial resistance rates of invasive pneumococcal strains. **Jornal de Pediatria**, v. 85, p. 421-425, 2009.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

YANG, Y-Y.; CHUNG, T-S.; BAI, X-L.; CHAN, W-K. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 2223-2236, 2000.

YANG, Y.; BAJAJ, N.; XU, P.; OHN, K.; TSIFANSKY, M. D.; YEO, Y. Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 10, p. 1947-1953, 2009.

YEH, H. C.; PHALEN, R. F.; RAABE, O. G. Factors influencing the deposition of inhaled particles. **Environment Health Perspectives**, v. 15, p. 147-156, 1976.

YOO, N. Y.; YOUN, Y. S.; OH, N. M.; OH, K. T.; LEE, D-K.; CHA, K-H.; OH, H. T.; LEE, E. S. Antioxidant encapsulated porous poly(lactide-co-glycolide) microparticles for developing long acting inhalation system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 419– 424, 2011.

ZHANG, Z.; ZHU, Y.; YANG, X.; LI, C. Preparation of azithromycin microcapsules by a layer-by-layer self-assembly approach and release behaviors of azithromycin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 362, p. 135–139, 2010.