

Maristela Denck Colman

**MICROPARTÍCULAS CONTENDO BROMETO DE  
IPRATRÓPIO PARA ADMINISTRAÇÃO VIA INALATÓRIA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
*IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestra em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto Silva

Coorientadora: Prof. Dra. Cassiana Mendes

Florianópolis  
2019

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

Colman, Maristela Denck  
MICROPARTÍCULAS CONTENDO BROMETO DE IPRATRÓPIO  
PARA ADMINISTRAÇÃO VIA INALATÓRIA :  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN  
VITRO / Maristela Denck Colman ; orientador,  
Marcos Antonio Segatto Silva, coorientadora,  
Cassiana Mendes, 2019. 140 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal  
de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Pulmonar. 3. Pó para inalação.  
4. Brometo de ipratrópio. 5. Avaliação in vitro.  
I. Silva, Marcos Antonio Segatto. II. Mendes,  
Cassiana . III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.  
IV. Título.

**MICROPARTÍCULAS CONTENDO BROMETO DE  
IPRATRÓPIO PARA ADMINISTRAÇÃO VIA INALATÓRIA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
*IN VITRO***

**POR**

**Maristela Denck Colman**

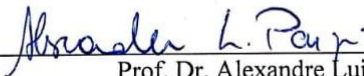
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Mestra” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia

Florianópolis, 22 de março de 2019.

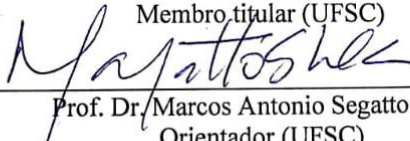
**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. Thiago Caon  
Membro titular (UFSC)



Prof. Dr. Alexandre Luis Parize  
Membro titular (UFSC)



Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto Silva  
Orientador (UFSC)



Prof.<sup>a</sup> Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Dedico este trabalho aos pacientes com enfermidades pulmonares crônicas, em especial ao meu avô Antônio Lacerda da Rocha (*in memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

À Força Universal pelos encontros, pelo caminho trilhado e pelos desafios calculados exatamente na medida de minhas capacidades, conduzindo-me tal evolução.

À minha mãe, Verginia, por todo seu esforço, paciência e esperança. Meu melhor exemplo de mulher guerreira e independente, seu amor me inspira a sempre fazer o melhor. Honrarei suas lutas!

Aos meus irmãos, Vanessa e Tiago, pela parceria, incentivo, tempo e amor dedicados. A toda minha família, em especial, Elaine, Nei e Ariel, pelo apoio de sul a centro-oeste.

Ao meu companheiro de aventuras e estradas, Rafael, que tornou tudo mais leve e divertido. Obrigada por fazer eu me sentir mais viva!

Ao professor Marcos, pela construção do trabalho desde a base e por aceitar me orientar. Levarei comigo muitos ensinamentos científicos e pessoais. Desafios e confiança materializaram-se nesse trabalho.

A minha Coori Cassi, por me deixar mais calma quando tudo parecia dar errado, por sempre dar luz às minhas indagações e por toda ajuda. Tenho certeza que não haveria pessoa melhor para esse papel.

*A profesora Maria Veronica, por aceptarme y transmitir sus conocimientos acerca de polvos inhalatorios. También agradezco a mis colegas de oficina o de lab en Argentina, me encantarán ver los partidos en comedor y las caminatas por la mañana en frío bahiense.*

Ao meu antigo orientador professor Egon, quem me iniciou no mundo da pesquisa e construiu em mim valores imensuráveis. À todos os professores que tive, especialmente na farmácia, Stella, Airton e Fernanda, que me inspiraram a prosseguir na academia.

Aos amigos do lab CQ, pelas discussões no café, pelas [des]construções pessoais e por toda ajuda. Em especial, às professoras Simone e Hellen, pelo apoio, estímulo e pelas risadas.

À Roberta e Maria, pelo incentivo nos experimentos e por nunca terem medido esforços para ajudar. Ao Giulio, pelo auxílio durante a maior parte do trabalho e por me ensinar a ensinar.

Às minhas farmacêuticas favoritas Daia, Lari, Leti e Lis, pelos conselhos e pela amizade à distância. Levo muito de vocês comigo.

Aos técnicos e alunos da Central de análises-EQA, LATESC, LCME e Central Crom, que me auxiliaram em algumas análises. A Karla e professor Giovanni Caramori pela docagem molecular. Ao apoio financeiro do CNPq. A UFSC e ao PPGFar pela oportunidade. A todos aqueles que acreditam e lutam pela pesquisa no Brasil.

E a todos que de alguma forma tornaram esse sonho possível.

*“Elevar cada vez más el nivel ideológico,  
político y cultural de la mujer, para  
ponerla en condiciones de jugar el papel  
que le corresponde como constructora de la  
nueva sociedad.”*

*(Vilma Espín)*

*“Para navegar contra a corrente são  
necessárias condições raras: espírito de  
aventura, coragem, perseverança e paixão.”*

*(Nise da Silveira)*





## RESUMO

O fármaco brometo de ipratrópio (BI) é broncodilatador muscarínico amplamente utilizado no tratamento de doenças pulmonares. Administrado na forma de solução para nebulização, o BI pode acarretar glaucoma, em pacientes predispostos. Atualmente não estão disponíveis no mercado apresentações de BI na forma de pó para inalação (DPI), com isso o presente estudo visou desenvolver micropartículas contendo BI, utilizando a metodologia de secagem por aspersão, em inglês *spray-drying* (SD). Para tanto, confirmou-se a identidade das matérias-primas e então, foi realizado um estudo de interação selecionando como carreadores  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD e QTS. Com os selecionados desenvolveu-se uma metodologia de superfície de resposta (MSR), obtendo dessa forma 32 amostras contendo apenas os carreadores. Com a análise de rendimento e tamanho de partícula, as variáveis foram ajustadas e o BI foi incorporado, obtendo assim, 16 formulações. A seleção das formulações mais promissoras foi realizada considerando tamanho de partícula, diâmetro aerodinâmico, composição, rendimento e doseamento de fármaco, sendo quatro formulações elegidas para os ensaios mais complexos. Além da caracterização no estado sólido, foi realizada a avaliação aerodinâmica por meio do *Next generation impactor* (NGI), a qual demonstrou que as quatro formulações atingem os pulmões, estimou-se ainda, predomínio de ação local. Quanto à deposição pulmonar, foi avaliada por ângulo de contato, indicando fácil deposição, sendo que todas as amostras apresentam caráter hidrofílico. A liberação do BI foi realizada em células de Franz com membranas de diálise celulósicas, onde todas as formulações apresentaram potencial de liberação modificada, sendo que as formulações contendo QTS apresentaram maior liberação de fármaco e de forma controlada e progressiva. Dentre as quatro formulações selecionadas, demonstraram-se mais promissoras F14 e F5, compostas por BI/ $\beta$ -CD e BI/QTS, respectivamente. De maneira geral, foi possível desenvolver formulações DPI de BI e elucidar interações entre os compostos, sendo os dados obtidos relevantes na elaboração de uma formulação comercial.

**Palavras-chave:** Pó para inalação. Via pulmonar. *Spray-drying*.

## ABSTRACT

The drug ipratropium bromide (BI) is a muscarinic bronchodilator widely used in the treatment of lung diseases. Administered as a solution for nebulization, BI may lead to glaucoma in predisposed patients. Currently, there is not a formulation of the drug ipratropium bromide (BI) in the form of powder for inhalation (DPI), so the present study aimed to develop microparticles containing BI, using the spray-drying (SD) methodology. For this, the identity of the raw materials was confirmed and an interaction study was carried out selecting  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD and QTS as carriers. With the selected ones, a response surface methodology (MSR) was developed, obtaining in this way 32 samples containing only the carriers. With the analysis of yield and particle size, the variables were adjusted and the BI was incorporated, thus obtaining 16 formulations. The selection of the most promising formulations were done considering particle size, aerodynamic diameter, composition, yield and drug dosage, then four formulations were chosen to continue with the more complex assays. In addition to the solid state characterization, the aerodynamic evaluation was performed by the Next generation impactor (NGI), which demonstrated that the four formulations reach the lungs, and also estimated a predominance of local action. Regarding the pulmonary deposition, it was evaluated by contact angle, indicating easy deposition, and all samples presented hydrophilic character. The release of BI was performed in Franz cells with cellulosic dialysis membranes, where all formulations had a modified release potential, and the formulations containing QTS presented higher drug release and with slow and progressive release profile. Among the four formulations selected, the most promising were F14 and F5, composed of BI/ $\beta$ -CD and BI/QTS, respectively. In general, it was possible to develop DPI formulations of BI and to elucidate interactions between the compounds, the data obtained were relevant in the elaboration of a commercial formulation.

**Keywords:** Dry powder inhaler. Pulmonary drug delivery. Spray-drying.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação anatômica do sistema respiratório e subdivisão em vias respiratórias e regiões. ....	29
Figura 2 - Mecanismos de deposição das partículas no sistema respiratório e etapas desde a deposição até a interação do fármaco com o receptor.....	31
Figura 3 - Dispositivos utilizados na administração de medicamentos pela via inalatória. ....	33
Figura 4 - Esquema do equipamento <i>spray-dryer</i> e cinética de formação das partículas.....	35
Figura 5 - Padrões de secagem da gotícula/partícula. ....	37
Figura 6 - Fórmula estrutural da lactose.....	40
Figura 7 - Estrutura química e conformação espacial das ciclodextrinas. ....	41
Figura 8 - Reação de desacetilação da quitina, formação de quitosana. ....	44
Figura 9 - Desagregação das partículas e formação do aerossol. ....	45
Figura 10 - Aparatos descritos pela Farmacopeia Europeia para avaliar a aerodinâmica de formulações inalatórias. ....	46
Figura 11 - Aparato E, ou <i>Next Generation Pharmaceutical Impactor</i> , descrito pela Farmacopeia Europeia.....	48
Figura 12 - Desenho esquemático do sistema de célula de Franz. ....	52
Figura 13 - Estrutura química do brometo de ipratrópio.....	53
Figura 14 - Transmissão de impulsos nervosos via nervo vago e bloqueio pelo brometo de ipratrópio (Ach representa o neurotransmissor acetilcolina). ....	54
Figura 15 - Curva obtida por calorimetria exploratória diferencial (A), curvas termogravimetria e termogravimetria derivada (B), espectro de infravermelho (C) e difratograma de raios-X de pó (D) do brometo de ipratrópio (BI) obtidas.....	71
Figura 16 - Curvas obtidas por calorimetria exploratória diferencial para os carreadores lactose (LAC), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), respectivas misturas físicas (1:1 m/m) e fármaco brometo de ipratrópio (BI) para análise comparativa. ....	73
Figura 17 - Perfis obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para os carreadores lactose (LAC), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e respectivas misturas, em comparação com o fármaco brometo de ipratrópio (BI). ....	75

Figura 18 - Fotomicrografias das matérias primas utilizadas. Sob aumentos de 2000x e 5000x para brometo de ipratrópio (BI), 1000x para lactose (LAC), 2000x para $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) equitosana (QTS).....	78
Figura 19 - Relação entre viscosidade específica e concentração quitosana, onde o eixo X é composto pelas concentrações de quitosana (QTS) e o eixo Y, pela razão entre viscosidade específica e concentração de QTS. ....	79
Figura 20 - Curvas resultantes do estudo de interação aplicando a teoria de Flory-Huggins e curvas de calorimetria exploratória diferencial das misturas fármaco:carreador em diferentes proporções, onde a porcentagem indicada é referente ao brometo de ipratrópio (BI). ....	80
Figura 21 - A: Curva de Calibração do BI, obtida no espectrofotômetro na região do ultravioleta. B: Diagrama de solubilidade de fases obtidos na interação de brometo de ipratrópio (BI) com $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). ....	82
Figura 22 - A: configuração mais estável do sistema LAC/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema LAC/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por <i>ball/stick</i> e fármaco <i>stick</i> . ....	85
Figura 23 - A: configuração mais estável do sistema $\beta$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema $\beta$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por <i>ball/stick</i> e fármaco <i>stick</i> .....	86
Figura 24 - A: configuração mais estável do sistema HP- $\beta$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema HP- $\beta$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por <i>ball/stick</i> e fármaco <i>stick</i> .....	87
Figura 25 - A: configuração mais estável do sistema QTS/BI, B: representação das três configurações mais estáveis. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por <i>ball/stick</i> e fármaco <i>stick</i> .....	88
Figura 26 - A: configuração mais estável do sistema $\alpha$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema $\alpha$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por <i>ball/stick</i> e fármaco <i>stick</i> . ....	89

Figura 27 - A: configuração mais estável do sistema $\gamma$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema $\gamma$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por <i>ball/stick</i> e fármaco <i>stick</i> .	89
Figura 28 - Fotomicrografias das formulações obtidas por <i>spray-drying</i> sem a incorporação de fármaco. Na primeira linha as imagens encontram-se no aumento de 5000x, na segunda linha sob aumento de 1000x.	93
Figura 29 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações contendo BI.	94
Figura 30 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial do brometo de ipratrópio (BI) e das formulações finais, evidenciado por asterisco o início da $T_g$ . Sendo que, F4 é composta por BI e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD); F5, por BI e quitosana (QTS); F6, por BI, $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e QTS; e F14, por BI e HP- $\beta$ -CD.	101
Figura 31 - Curvas termogravimétricas e termogravimétricas derivadas obtidas para as formulações finais.	102
Figura 32 - Espectro FTIR do BI em comparação com os espectros FTIR obtidos para as formulações selecionadas.	103
Figura 33 - Difrátogramas de raios-X das matérias primas e das formulações finais.	104
Figura 34 - Distribuição da recuperação de fármaco na avaliação aerodinâmica <i>in vitro</i> das formulações finais.	109
Figura 35 - Ângulo de contato mensurado entre um e dez segundos para as formulações e BI, a direita de cada identificação das amostras as imagens capturas pela câmera, no momento em que a gota de água toca as pastilhas.	110
Figura 36 - Perfil de liberação do BI e das formulações, obtidos por ensaio em células de Franz.	112



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da caixa de <i>grid</i> para o <i>docking</i> molecular dos sistemas receptores/ligante. ....	61
Tabela 2 - Fatores e níveis utilizados na metodologia de superfície de resposta. ....	62
Tabela 3 - Condições utilizadas na obtenção das formulações ausentes de BI, determinadas por delineamento experimental. ....	63
Tabela 4 - Condições utilizadas na produção das formulações contendo BI e os respectivos carreadores. ....	64
Tabela 5 - Variáveis utilizadas no cálculo do parâmetro de solubilidade de Flory-Huggins. ....	78
Tabela 6 - Resultados da docagem molecular para os sistemas receptores/ligante. ....	83
Tabela 7 - Respostas obtidas para o delineamento experimental das formulações sem a incorporação do fármaco. ....	91
Tabela 8 - Rendimento e doseamento de fármaco das formulações desenvolvidas com BI. ....	96
Tabela 9 - Resultados de densidades <i>bulk</i> e <i>tapp</i> , índice de Carr, relação de Hausner e respectiva classificação quanto ao fluxo dos pós desenvolvidos. ....	97
Tabela 10 - Dados de tamanho de partícula obtidos para as formulações desenvolvidas. ....	99
Tabela 11 - Densidades reais obtidas por picnometria a gás. ....	105
Tabela 12 - Perfil aerodinâmico obtido por análise no NGI. ....	106
Tabela 13 - Fatores $f_1$ (de similaridade) e $f_2$ (de diferença) obtidos para os perfis de liberação de brometo de ipratrópio nas formulações. ....	113





## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do parâmetro de interação fármaco-carreador por Flory-Huggins.....	58
Equação 2 - Razão entre o volume da cadeia polimérica e o volume da molécula de fármaco.....	59
Equação 3 - Viscosidade específica.....	59
Equação 4 - Viscosidade intrínseca.....	59
Equação 5 - Rendimento de formulação obtida por <i>spray-drying</i> .....	63
Equação 6 - Razão de massa e volume para obter valores de densidade <i>bulk</i> e <i>tapp</i> .....	66
Equação 7 - Índice de Carr.....	66
Equação 8 - Relação de Hausner.....	66
Equação 9 - Parâmetro avaliativo para a distribuição de tamanhos de partículas, <i>Span</i> .....	67
Equação 10 - Diâmetro aerodinâmico.....	67
Equação 11 - Fração de fármaco emitida do dispositivo inalatório.....	68
Equação 12 - Fração de partículas finas calculada a partir da quantificação de fármaco nos estágios do NGL.....	68
Equação 13 - Fração respirável de fármaco.....	68
Equação 14 - Cálculo da diferença dos perfis de liberação de fármaco por fator $f_1$ .....	71
Equação 15 - Fator de similaridade entre os perfis de liberação de fármaco por $f_2$ .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach - Acetilcolina  
BI - Brometo de ipratrópio  
CD - Ciclodextrina  
CIF - Arquivo de informações cristalográficas  
D<sub>10</sub> - Diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 10%  
D<sub>50</sub> - Mediana da distribuição  
D<sub>90</sub> - Diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 90%  
Daer - Diâmetro aerodinâmico  
DAMM - Diâmetro aerodinâmico mássico médio  
Dm - Diâmetro médio  
DPG - Desvio padrão geométrico  
DPI - Dry powder inhaler pó para inalação (do inglês, *dry powder inhaler*)  
DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina  
DrTGA - Derivada termogravimétrica  
DRX - Difratometria de raios-X  
DSC - Calorimetria exploratória diferencial  
FE - Fração emitida  
FEV1 - Volume expiratório forçado em 1 segundo  
FPF - Fração de partículas finas  
FR - Fração respirável  
FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier  
FVC - capacidade vital forçada  
GAAF - General AMBER Force Field  
h - hora/s  
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose  
HP-β-CD - Hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
IA - Insumo ativo  
IC - Índice de Carr  
ICH - Conselho Internacional para Harmonização (*International Council for Harmonisation*)  
LAC - Lactose  
LCME-UFSC - Laboratório central de microscopia eletrônica  
MEF 50 - Média do débito expiratório em 50%  
MEF 75 - Média do débito expiratório em 75%  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
min - minutos  
MOC - Coletor microrifício  
MSR - Metodologia de superfície de resposta

NGI - Impactador em cascata (do inglês, *next generation impactor*)  
NPHs - Hidrogênios não polares  
PLA - Ácido polilático  
PLAPIQUI/CONICET  
PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)  
*pMDI* - inaladores dosimetrados pressurizados (*pressurized metered dose inhalers*)  
QTS - Quitosana  
 $r^2$  - Coeficiente de regressão linear  
RH - Relação de Hausner  
RMSD - Raiz do desvio quadrático médio (*root mean square deviation*)  
SD - secagem por aspersão (*Spray-drying*)  
 $T_g$  - Termogravimetria  
TGA - Termogravimetria  
USP - Farmacopeia dos Estados Unidos (*United States Pharmacopeia*)  
UV - Ultravioleta  
 $\alpha$ -CD - Alfa-ciclodextrina  
 $\beta$ -CD - Beta-ciclodextrina  
 $\gamma$ -CD - Gama-ciclodextrina



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS	28
1.1.1 Objetivo geral	28
1.1.2 Objetivos específicos	28
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>29</b>
2.1 ANATO-FISIOLOGIA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	29
2.2 DIRECIONAMENTO DAS PARTÍCULAS PELO SISTEMA RESPIRATÓRIO	30
2.3 PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR	32
2.3.1 <i>Spray-drying</i> (SD)	35
2.3.1.1 Variáveis críticas do processo de SD	38
2.4 CARREADORES APLICADOS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>DPIs</i>	39
2.4.1 Lactose	40
2.4.2 Ciclodextrinas	41
2.4.3 Quitosana	43
2.5 AVALIAÇÃO DA AERODINÂMICA	45
2.7 BROMETO DE IPRATRÓPIO	52
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
3.1 MATERIAIS	57
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MATÉRIAS PRIMAS	57
3.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	58
3.4 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES	60
3.5 DOCAGEM MOLECULAR	60
3.6 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	62
3.7 SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES FINAIS	66
3.8 CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DAS MICROPARTÍCULAS	67

3.9 PERFIL AERODINÂMICO	68
3.10 AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO E LIBERAÇÃO	69
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS E ESTUDO DE INTERAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	70
4.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES	82
4.3 DOCAGEM MOLECULAR	83
4.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	91
4.5 SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES FINAIS	97
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS MICROPARTÍCULAS	100
4.7 PERFIL AERODINÂMICO	105
4.8 AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO E LIBERAÇÃO	110
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE QUANTIFICAÇÃO DE BI</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE B - CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO E RESPOSTAS OBTIDAS PARA AS FORMULAÇÕES CONTENDO APENAS OS CARREADORES</b>	<b>137</b>
<b>APÊNDICE C - CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO E RESPOSTAS OBTIDAS PARA AS FORMULAÇÕES CONTENDO O FÁRMACO, AVALIAÇÃO DA DENSIDADE E TAMANHO DE PARTÍCULA</b>	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As medicações direcionadas a via pulmonar necessitam de características morfológicas e constitucionais específicas para alcançar o sítio de ação. Quando se trata de um pó para inalação isso se torna ainda mais relevante, visto que não há gás propelente e nem solução nebulizadora que direcione e impulsione a formulação aos pulmões. A morfologia do pó juntamente com a pressão inalatória exercida pelo paciente, devem ser capazes de dirigir a medicação ao sítio de interesse, onde o fármaco, muitas vezes complexado ou inserido em matrizes poliméricas, deve ser depositado e liberado para que haja efeito terapêutico (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

A fim de garantir que a medicação de interesse alcance a porção pulmonar requerida, é necessário realizar um estudo referente à aerodinâmica da formulação, para tanto, são utilizados aparatos específicos pelos quais é possível avaliar o perfil aerodinâmico da medicação e prever como será a orientação e deposição no organismo do paciente (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001).

Ademais, se faz necessária a caracterização físico-química desses sólidos. Realizada por meio de técnicas experimentais, as quais permitem a análise de interações entre os compostos, estabilidade térmica, identidade cristalográfica dos compostos e formulações, dentre outros resultados obtidos (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

O brometo de ipratrópio (BI) é um derivado atropínico, que apresenta a vantagem de produzir broncodilatação local, sem efeitos sistêmicos relevantes. No mercado estão disponíveis apenas formulações em aerossol ou soluções nebulizadoras desse fármaco, sendo essa última a forma mais utilizada. Alguns trabalhos apresentam formulações contendo BI na forma de pó para inalação, porém nenhum faz um estudo amplo acerca das partículas desenvolvidas, sendo sempre direcionados a uma área da ciência (TAYLOR, Michael K; HICKEY; VANOORT, 2006; VINJAMURI; HAWARE; STAGNER, 2016).

Quando em contato com os olhos, sob uso crônico, o BI pode causar glaucoma em indivíduos pré-dispostos à doença. Por isso, além da redução de efeitos colaterais, a forma farmacêutica pó para inalação é de fácil manuseio e transporte, comparada as soluções para nebulização, apresenta início de ação mais rápido e pode manter o efeito terapêutico por horas (KOLA et al., 2017; OKSUZ et al., 2007).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver por *spray-drying* micropartículas direcionadas à via inalatória, utilizando como princípio ativo brometo de ipratrópio, caracterizar as formulações promissoras quanto ao estado sólido, aerodinâmica, liberação e deposição.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o fármaco e os excipientes por meio de metodologias de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios-X (DRX);
- Avaliar as interações entre os compostos utilizando técnicas do estado sólido, docagem molecular, estudo de solubilidade de fases e aplicando a teoria de Flory-Huggins;
- Utilizar o delineamento experimental no desenvolvimento de formulações por *spray-drying*;
- Selecionar as melhores formulações, considerando tamanho de partícula, diâmetro aerodinâmico, composição, rendimento e doseamento, para estudos *in vitro* de liberação de BI e análise aerodinâmica;
- Caracterizar as formulações selecionadas por metodologias do estado sólido, sendo essas DSC, TGA, FTIR, DRX, MEV e picnometria de gás;
- Determinar variáveis aerodinâmicas de fração emitida (FE), fração de partículas finas (FPF), fração respirável (FR), diâmetro aerodinâmico mássico médio (DAMM) e desvio padrão geométrico (DPG) das formulações selecionadas;
- Avaliar a liberação do fármaco utilizando células de Franz com membranas celulósicas.



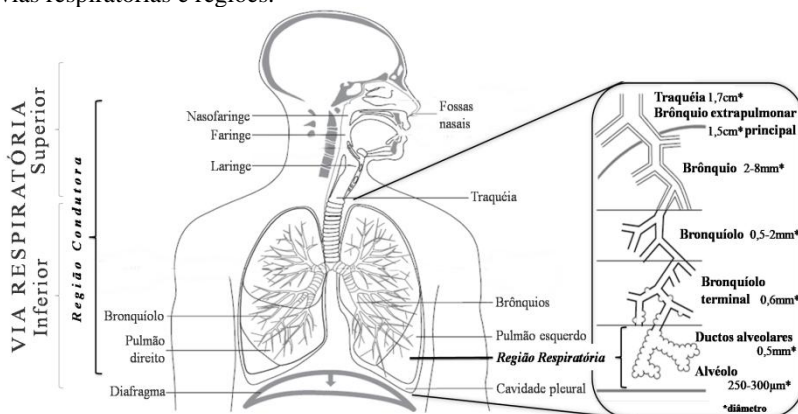
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ANATO-FISIOLOGIA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório se inicia na região nasal, seguida de faringe, laringe e traqueia, onde ocorre a divisão em brônquios direito e esquerdo, formando os pulmões. Estes são compostos por bronquíolos menores, terminados por bronquíolos terminais profundos, nos sacos alveolares (NOKHODCHI; MARTIN, 2015; OLIVEIRA, 2016).

A Figura 1 traz a representação anatômica e as duas formas mais comuns de categorizar o sistema respiratório. Ao fragmentá-lo em vias respiratórias superior e inferior, tendo como referência a caixa torácica, se expõe uma perspectiva anatômica desse sistema. Entretanto, ao dividi-lo em zonas de condução e respiratória, é assumida uma visão fisiológica do sistema respiratório (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

Figura 1 - Representação anatômica do sistema respiratório e subdivisão em vias respiratórias e regiões.



Fonte: Adaptado de Bisgaard, O'Callaghan & Smaldone (2001).

Da cavidade nasal até a laringe ocorre a filtração de partículas maiores, o aquecimento e o direcionamento do ar inalado. A traqueia e os brônquios são responsáveis pela condução do ar e das minúsculas partículas inaladas. Constituído de ramificações dicotômicas, os brônquios e bronquíolos possuem imensa área superficial, devido à presença das células ciliadas caliciformes, estas são secretoras de muco. Em condições não patológicas, a camada de muco apresenta entre 0,5 e 5 µm, e é composta por glicoproteínas, proteínas, lipídeos e água,

expelido em direção à traqueia por meio de movimentos ciliares ritmados (NOKHODCHI; MARTIN, 2015; OLIVEIRA, 2016).

O direcionamento do muco para a traqueia e posteriormente ao trato gastrointestinal, remove as partículas retidas nessa região. As trocas gasosas ocorrem nos bronquíolos terminais, ductos e sacos alveolares (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

Os alvéolos apresentam área superficial de aproximadamente 100 m<sup>2</sup>, em adultos, para realização de trocas gasosas, nesse local ocorre a absorção de substâncias com ação sistêmica. Nos alvéolos não há muco, o epitélio achatado é constituído por pneumócitos tipo I, barreira de trocas gasosas entre tecido e capilares, pneumócitos tipo II, secretores de surfactante pulmonar, que reduz a tensão superficial do ar inspirado e do líquido pulmonar. Ademais, os macrófagos alveolares realizam a depuração de material particulado aos linfonodos ou à traqueia (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

A circulação sanguínea pulmonar é responsável pelo transporte de oxigênio para todo o organismo e por eliminar dióxido de carbono produzido pelos diferentes órgãos e tecidos. Todavia, além do oxigênio, outros gases e materiais particulados podem ser absorvidos sistemicamente (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

Compreender o sistema respiratório anatômica e fisiologicamente é essencial no desenvolvimento de medicações de tratamento local ou sistêmico, administrados por essa via.

## 2.2 DIRECIONAMENTO DAS PARTÍCULAS PELO SISTEMA RESPIRATÓRIO

A aerodinâmica das partículas depende de aspectos físicos como a arquitetura individual do sistema respiratório, da pressão exercida para inalar as partículas e do tipo de dispositivo inalatório (EINBERGER; COCKRILL; MANDEL, 2019).

Considerando tais aspectos, a literatura aponta que partículas menores que 2 µm acabam sendo expelidas com a respiração e não atingem o sítio de ação, partículas maiores de 5 µm tendem a ficar retidas na faringe, de 2 a 5 µm as partículas atingem o sítio de ação do fármaco no pulmão, com o mínimo de efeitos colaterais sistêmicos (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; EINBERGER; COCKRILL; MANDEL, 2019).

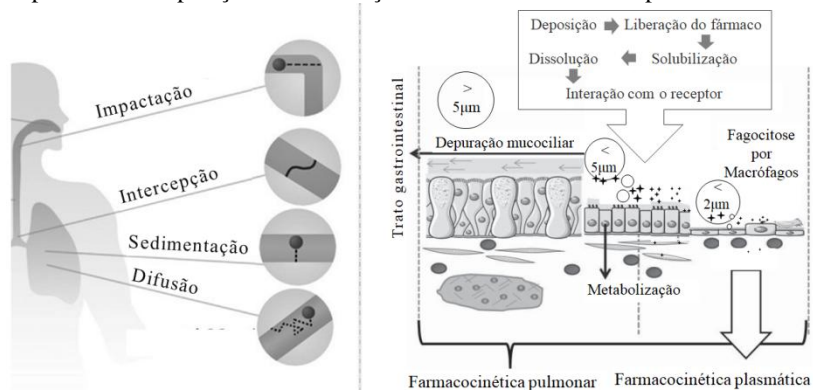
As partículas não depuradas pelos macrófagos e células ciliares, são depositadas nos bronquíolos e alvéolos, onde os fármacos são

liberados e agem local ou sistemicamente. O processo de deposição pode ocorrer por quatro mecanismos, são eles: impactação, sedimentação, intercepção e difusão (Figura 2) (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

A impactação é dependente do fluxo do ar, em geral, ocorre com partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$ , nas regiões orofaríngea e início da traqueobrônquica, pela alta velocidade do ar e fluxo turbulento (Figura 2) (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

Em partículas entre 5 e 0,5  $\mu\text{m}$  prevalece a sedimentação como mecanismo de deposição, ocorrendo em regiões traqueobrônquica profunda e alveolar. Nessas regiões, o fluxo de ar já não é tão intenso, por isso a força predominante na deposição dessas partículas é a gravitacional. Sendo assim, além do tamanho da partícula, a densidade pode afetar em sua deposição (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

Figura 2 - Mecanismos de deposição das partículas no sistema respiratório e etapas desde a deposição até a interação do fármaco com o receptor.



Fonte: Adaptado de Nokhodchi & Martin (2015).

A intercepção ocorre quando as partículas têm formas não circulares e alongadas. Devido a sua morfologia alongada, as partículas são depositadas em regiões superiores do sistema respiratório, por não apresentarem aerodinâmica favorável para percorrer as ramificações brônquicas e alveolares (Figura 2) (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

O mecanismo de difusão é causado pelo movimento browniano, em partículas menores que 0,5  $\mu\text{m}$ , ocorrendo na região alveolar. O

movimento browniano é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, assim, quanto menor a partícula maior probabilidade de colisão com o epitélio alveolar e ocorrer deposição (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

Seguida da deposição, ocorre a liberação do fármaco da formulação, quando esse se encontra em uma matriz carreadora. Nos casos de formulações compostas apenas pelo fármaco, a liberação é ausente, ocorrendo diretamente a solubilização, dissolução, interação e/ou absorção. A liberação do fármaco pela matriz carreadora depende de sua composição, características do meio e do fármaco, além das interações químicas envolvidas nesse processo (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

Quando o fármaco está em contato com o tecido pulmonar, pode ocorrer a absorção sistêmica, se nos alvéolos, ou pode interagir com receptores pulmonares, tendo assim ação local (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017). Dentre as classes de receptores pulmonares mais importantes estão os  $\beta$ -adrenérgicos, muscarínicos, histamínicos, receptores glicocorticóides, leucotrienos 1 e receptores de prostaciclina. A ação de alguns receptores pode ser alterada em distintas patologias pulmonares e, a ação dos fármacos nesses receptores busca a homeostasia do sistema, com o mínimo de ação sistêmica, gerando menos efeitos colaterais (EINBERGER; COCKRILL; MANDEL, 2019).

Além disso, outros fatores estão presentes na eficácia de formulações inalatórias. A existência de muco e surfactante no sistema respiratório influencia a deposição e depuração de partículas, dissolução, solubilidade e absorção dos fármacos. Forças de coesão e adesão entre as partículas impactam na deposição e preservação do tamanho de partícula (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001; KWOK; CHAN, 2017).

Algumas metodologias de avaliação aerodinâmica são capazes de estimar se o comportamento das formulações tende a ação local ou absorção sistêmica, melhor discutido no item 2.5.

## 2.3 PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR

Existem três principais formas farmacêuticas inalatórias: solução para nebulização, inaladores dosimetrados pressurizados (*pressurized metered dose inhalers* (pMDI)) e pó para inalação (do inglês, *dry*

*powder inhaler* (DPI) (Figura 3) (KWOK; CHAN, 2017; TELKO; HICKEY, 2005).

As soluções para nebulizações são compostas por um ou mais fármacos, água purificada e conservantes. Para administração dessas soluções é necessário um dispositivo nebulizador elétrico ou gás medicinal, o tempo necessário para a nebulização é variável. A ação dos fármacos inicia após alguns minutos de nebulização, sendo o tempo de ação característico de cada fármaco (TELKO; HICKEY, 2005).

Figura 3 - Dispositivos utilizados na administração de medicamentos pela via inalatória.



Fonte: Adaptado de AG, (2018); Kesavan et al., (2013); OMRON Healthcare, (2018).

Inaladores dosimetrados pressurizados são compostos por um ou mais fármacos e um gás propelente, sendo mais utilizado o norflurano. Em geral, apresentam aerossol com tamanho de partícula monodispersivo, porém, nesse tipo de formulação a liberação controlada de fármacos é impossibilitada. Os fármacos veiculados por esse tipo de forma farmacêutica são àqueles usados em períodos de crise da patologia, pois exigem uma ação rápida (TELKO; HICKEY, 2005).

Os pós para inalação são compostos pelo fármaco isolado, pela mistura de carreador e fármaco ou por partículas contendo o fármaco em uma matriz carreadora. Quando o fármaco está em uma matriz carreadora, as partículas têm tamanho reduzido, o que prejudica o fluxo da formulação, por isso, são utilizados excipientes de granulometria maior, responsáveis por impulsionar as partículas para o interior dos pulmões. Dentre os excipientes, a lactose é a mais utilizada, devido a seu gosto agradável, biocompatibilidade, boa aerodinâmica, capacidade de manter as partículas menos agregadas e outras vantagens (KWOK; CHAN, 2017; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

A eficiência desse tipo de forma farmacêutica é dependente de diversos fatores que envolvem o paciente, as partículas, o dispositivo inalatório e até mesmo a cápsula reservatório da formulação. Todavia, os fármacos veiculados nesse tipo de formulação podem apresentar maior tempo de ação, devido a sua deposição e matriz carreadora. Nesse sentido, novas formulações de pó para inalação têm buscado a liberação prolongada de alguns fármacos, diminuindo o número de aplicações diárias, mantendo a concentração basal do fármaco e, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes (KWOK; CHAN, 2017; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

Como a morfologia esférica apresenta melhor desempenho aerodinâmico, a produção de micropartículas para via inalatória é realizada por técnicas de coesferonização, obtendo assim, formulações homogêneas e com tamanho de partícula menor (KWOK; CHAN, 2017; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

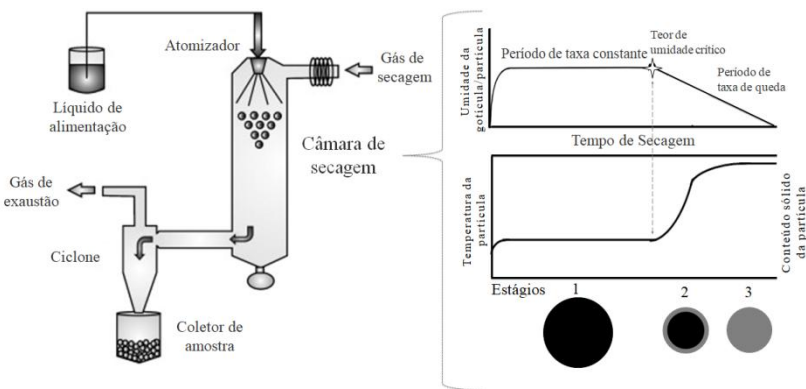
A moagem é o mais comum e antigo método utilizado para obter formulações DPI, entretanto, outros métodos demonstram melhor estabilidade e menor dispersão no tamanho de partícula. Métodos de secagem de soluções são amplamente utilizados, sendo o *spray drying* (SD) o mais facilmente escalonável (KWOK; CHAN, 2017; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

### 2.3.1 *Spray-drying* (SD)

Para o desenvolvimento da metodologia de SD, ou secagem por aspersão, é elaborada uma a solução ou suspensão de alimentação, que pode ser composta pelo fármaco isolado, um ou mais carreadores. Esses conferem uma matriz de onde o fármaco deverá ser liberado, sendo assim seleção de carreadores é essencial para obter o produto final com as características requeridas.

No processo de secagem por SD (Figura 4), a solução/suspensão de alimentação é bombeada para câmara de secagem por meio de uma agulha, a qual tem a função de formar uma aspersão/aerossol, a secagem da aspersão ocorre na câmara de secagem, que se encontra sob alta temperatura. As partículas sólidas são separadas ao percorrer o ciclone, sendo que partículas mais densas são coletadas pelo filtro de exaustão (filtros HEPA) e as menos densas são direcionadas ao frasco coletor (KWOK; CHAN, 2017; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

Figura 4 - Esquema do equipamento *spray-dryer* e cinética de formação das partículas.



Fonte: Adaptado de Sosnik & Seremeta (2015); Singh & Mooter (2016) e Paudel *et. al.* (2012).

Para compreender como as variáveis do processo influenciam nas características das partículas, é necessário entender como as partículas são formadas na técnica de SD. O líquido quando atomizado forma pequenas gotículas, as quais são aquecidas rapidamente ao alcançar à câmara de secagem, nesse período a taxa de secagem é constante e não há mudança na massa das partículas. O solvente presente na superfície, porém não ligado a ela, é evaporado. Por conseguinte, ocorre a migração

do solvente presente no interior das gotículas/partículas para a superfície, por difusão e fluxo capilar. Ao atingir teor de umidade crítico, se inicia a taxa de queda, onde o solvente evaporado fazia parte do conteúdo da partícula (Figura 4) (SINGH; MOOTER, 2016).

À medida que as partículas são formadas na câmara de secagem, o gás de arraste é umidificado, fato que pode impedir o escape do solvente do interior da gotícula, solidificando a partícula antes da completa secagem. Considerando formulações que necessitam de amorfização do fármaco, a taxa de secagem pode determinar a completa e estável amorfização da amostra (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016).

Evidências empíricas baseadas em cálculos dividem a cinética de secagem por SD em três etapas (Figura 5). O estágio 1 inicia quando a gotícula atinge o teor de umidade crítico, a massa de solvente concentrada na superfície da gotícula/partícula é evaporada. Por difusão, o solvente do interior da gotícula/partícula alcança a superfície e é evaporado, entretanto, a partir dessa etapa não há modificação do tamanho de partícula, caracterizando o estágio 2 (PAUDEL et al., 2012).

No estágio 2, a transferência de calor aumenta a temperatura da partícula, facilitando a evaporação do solvente, ainda assim, em casos de crostas resistentes nas partículas, a redução do nível de umidade ocorre até o equilíbrio, sendo que o conteúdo de solvente ligado fortemente pode não ser removido pela secagem. A pressão interna acumulada pela evaporação do solvente pode aumentar a ponto de inflar e/ou fragmentar as partículas e a morfologia esférica da partícula é perdida (PAUDEL et al., 2012).

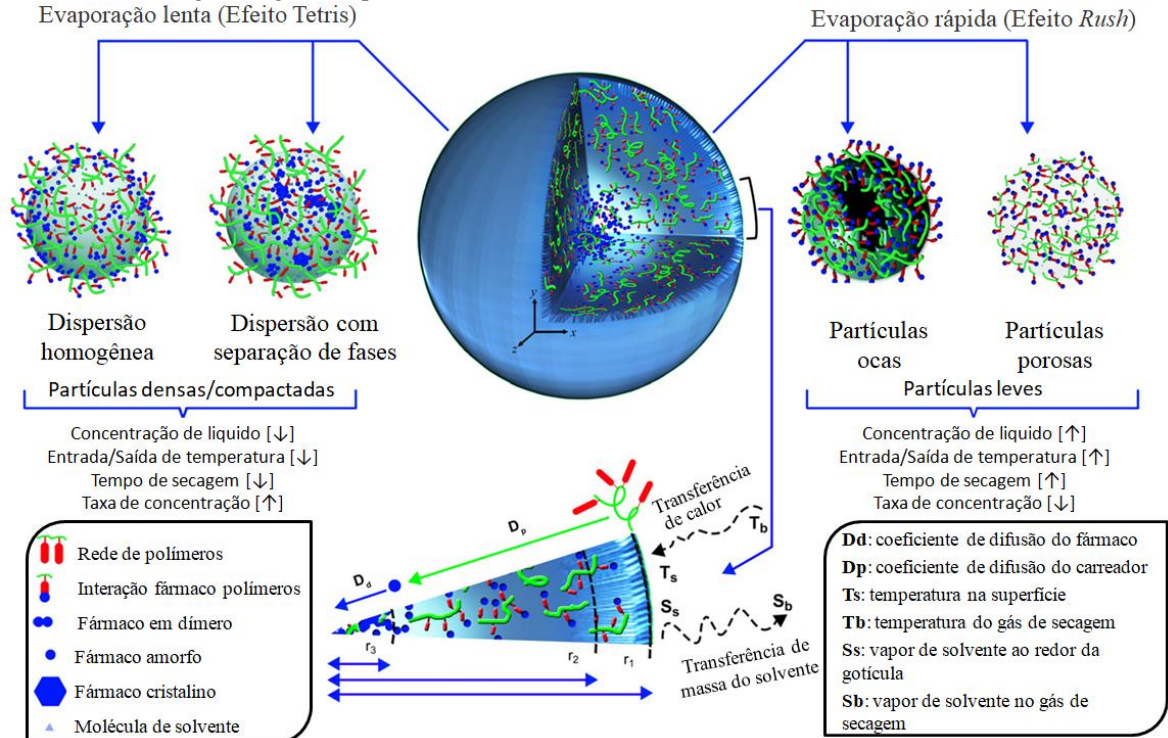
O estágio 3 é caracterizado pela partícula sólida, no qual não há mudança na massa das partículas, pois não existem mais etapas de secagem (PAUDEL et al., 2012).

Como exposto, a morfologia das partículas tem como determinante a taxa de secagem (Figura 5), secagens lentas tendem a formar partículas mais densas, as quais têm seus sólidos organizados pelo efeito *tetris*, onde as interações entre os compostos determinam a organização da partícula (PAUDEL et al., 2012).

Quando o efeito *tetris* é predominante a separação de fases, a nucleação e recristalização dos compostos são impulsionadas. Considerando essas duas características, a secagem lenta não é indicada para formação de partículas inaláveis, por serem densas e pouco homogêneas (PAUDEL et al., 2012).



Figura 5 - Padrões de secagem da gotícula/partícula.



Fonte: Adaptado de Singh & Mooter (2016) e Paudel *et. al.* (2012).

A secagem lenta ocorre quando a concentração de sólidos no líquido é baixa, aliada a uma taxa de alimentação alta, se a temperatura não for alta o suficiente a secagem tende a ser dificultada. Entretanto, quando a taxa de secagem é baixa, a concentração de sólidos é alta e a temperatura de entrada e saída são altas o suficiente para secar as gotículas rapidamente. Para amorfização efetiva do fármaco as temperaturas de entrada e saída devem ser mais altas do que a temperatura de recristalização do mesmo (SINGH; MOOTER, 2016).

Na secagem rápida ocorre o efeito *rush hour* onde a rápida evaporação do solvente condiciona a rápida difusão do solvente interior para a superfície, realizando uma mistura turbulenta dos compostos, que reorganizados apresentam baixa possibilidade de recristalização. A permeabilidade do solvente e interação deste com os compostos tende a gerar partículas ocas ou porosas, ambas de baixa densidade (SINGH; MOOTER, 2016).

### 2.3.1.1 Variáveis críticas do processo de SD

Um processo com um grande número de variáveis, como SD, pode ser ajustado para desenvolver o produto final com todas as características desejadas. Os ajustes nos parâmetros do equipamento, como temperatura de entrada e aspiração, ou relativas à solução/suspensão de alimentação, como a composição e concentração, podem gerar partículas de distintas densidades, tamanhos de partícula, porosidade, afinidade, mucoadesividade, entre outras (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016; MEZHERICHER; LEVY; BORDE, 2010).

A seleção do solvente deve considerar sua toxicidade e a solubilidade dos compostos no mesmo. A incompleta solubilização e a precipitação dos compostos pode aumentar a viscosidade do líquido, que quando processado gera partículas de conteúdo pouco homogêneo (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016)

Quanto ao soluto, tanto a composição quanto a concentração podem originar partículas com densidades, morfologia, tamanho e rendimento variados. Em geral, são adicionados o fármaco e mais um carreador na preparação de formulações pulmonares, entretanto, misturas terciárias também podem constituir esse tipo de formulação (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016; MEZHERICHER; LEVY; BORDE, 2010).

A adição de surfactante pode ser realizada se o fármaco for pouco solúvel, porém esse deve ser biocompatível com os epitélios do sistema

respiratório e adicionado em pequenas quantidades, melhorando assim a solubilidade, dissolução e podendo auxiliar na formação de micelas. Elevadas concentrações de surfactante podem aumentar o tamanho de partícula e propiciar a cristalização do fármaco (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016; MEZHERICHER; LEVY; BORDE, 2010).

Essencialmente, a misturas dos compostos em meio líquido deve ser estável e homogênea, garantindo dessa forma que as partículas sejam formadas de maneira igual do início ao fim do processo (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016). Mais efeitos a respeito do soluto serão apresentados no item 2.4.

A taxa de alimentação coordena o fluxo com que a secagem ocorrerá, depende da concentração da solução e do fluxo de ar, o qual é representado no equipamento pelo fluxo do rotâmetro e pela aspiração, contudo também é diretamente dependente da viscosidade da solução/suspensão. Sendo assim, quando o fluxo de secagem é aumentado, porém a solução/suspensão está concentrada, obtêm-se tamanhos de partículas maiores e com maior umidade, isso devido a temperatura de saída não suprir a demanda de secagem (SINGH; MOOTER, 2016).

A temperatura de entrada é responsável pela secagem das gotículas, por isso, a forma e tamanho das partículas está relacionada diretamente com essa. Além disso, a temperatura de entrada e de saída são variáveis fortemente influentes na amorfização do fármaco (SINGH; MOOTER, 2016).

Existem ainda variáveis relacionadas às condições do equipamento, como a composição do gás e atomizador utilizados (PAUDEL et al., 2012; SINGH; MOOTER, 2016).

## 2.4 CARREADORES APLICADOS NO DESENVOLVIMENTO DE *DPIs*

Em formulações DPI os carreadores são uma categoria de excipientes responsáveis pelo direcionamento do insumo ativo (IA) aos pulmões. Até poucos anos atrás a LAC era o único carreador utilizado nesse tipo de formulação, por possuir aerodinâmica favorável, biocompatibilidade e custo baixo. No entanto, além de carrear fármacos, atualmente esses excipientes são usados para modelar propriedades intrínsecas do princípio ativo (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

A seleção dos carreadores é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de formulações DPI, já que esses podem modelar a liberação, auxiliar na solubilidade e proteger o IA físico-quimicamente.

Contudo, a toxicidade dos carreadores ao tecido pulmonar é um fator decisivo na escolha da composição, bem como a aerodinâmica, interação com o fármaco, palatabilidade, entre outros.

O aumento de pesquisas nessa área se deve não só ao avanço da ciência, como também ao envelhecimento da população. Para pacientes multimedicalizados a via inalatória é uma boa alternativa, por diminuir a intensidade de efeitos colaterais, quando se requer administração de forma invasiva, como a insulina, e, para pacientes com doenças pulmonares crônicas, a liberação modificada permite que o medicamento seja administrado com menor frequência (EINBERGER; COCKRILL; MANDEL, 2019; NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

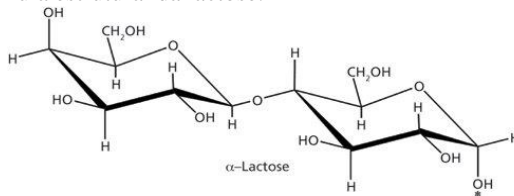
As estratégias de otimização dessa forma farmacêutica podem incluir a redução do tamanho de partícula a micro e nanopartículas, nanocristais, *nanoclusters*, formação de micelas, lisossomas, matrizes poliméricas, entre outras (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

### 2.4.1 Lactose

Compostos glicosídeos desempenham de maneira satisfatória a função de carreadores em DPI. Em geral, apresentam paladar adocicado, o que confere melhor aceitação pelos pacientes, ótimas propriedades de fluxo, baixo índice de incompatibilidades com os insumos ativos, baixo custo e biocompatibilidade (BOER; CHAN; PRICE, 2012).

A LAC (Figura 5) é um dissacarídeo de origem animal, utilizado nas áreas de química, farmácia, alimentos e outras. Composto pelos açúcares galactose e glucose, unidos por uma ligação glicosídica. Cristaliza de formas distintas e gera polimorfos, tais formas apresentam propriedades físicas, químicas e reológicas distintas, pelas quais é possível tanto identificá-las quanto selecioná-las para a finalidade desejada (DFE PHARMA, 2013).

Figura 6 - Fórmula estrutural da lactose.



Fonte: Royall (2017).

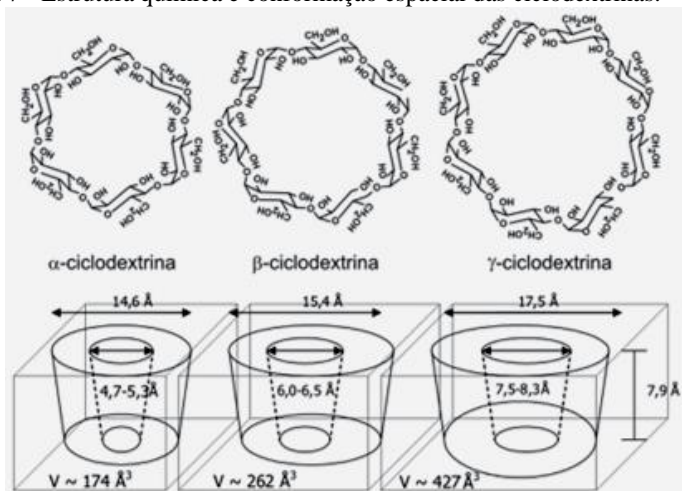
Por ser o carreador inalatório mais antigo, ainda que não seja utilizado na composição da matriz carreadora, faz parte da formulação. É usado com granulometria que possibilite o direcionamento das partículas a partir da parte inferior do sistema respiratório e, a desagregação das partículas (NOKHODCHI; MARTIN, 2015).

## 2.4.2 Ciclodextrinas

Produzidas por degradação enzimática do amido, as ciclodextrinas (CDs) apresentam de seis a oito unidades de glicose, formando oligossacarídeos cíclicos, que devido a ausência de rotação livre exibe a forma tronco-cônica. A forma  $\alpha$ -CD possui seis unidades de glicose, enquanto a  $\beta$ -CD sete e, a  $\gamma$ -CD oito unidades (Figura 6). Além disso, já foram descritos derivados metilados, hidroxialquilados, ramificados, hidrofóbicos, etilados, ionizáveis e acilados (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

A cavidade central das CDs é chamada de hidrofóbica, visto que em soluções aquosas, regiões hidrofóbicas de moléculas menores são atraídas para o interior da cavidade, formando complexos de inclusão. A parte externa, por sua vez, apresenta características mais hidrofílicas. A diferença de polaridade na mesma molécula permite que compostos com características polares e/ou apolares interajam com as CDs (LU et al., 2016; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Figura 7 - Estrutura química e conformação espacial das ciclodextrinas.



Fonte: Venturini *et al.* (2008).

A solubilidade aquosa das CDs é variável, sendo igual a 14,5 g/100 mL para  $\alpha$ -CD, 1,85 g/100 mL para  $\beta$ -CD e de 23,2 g/100 mL para  $\gamma$ -CD, dados referentes a temperatura de 25 °C. A modificação das CDs pode aumentar ou diminuir a solubilidade em água, de acordo com o grupo inserido (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

As etapas que norteiam a formação desses complexos incluem a aproximação das moléculas, rompimento das ligações intermoleculares realizadas com o solvente, incluindo as moléculas de água presentes na cavidade hidrofóbica da CD e, a interação entre IA e CD. Esse processo é dinâmico e contínuo, sendo que a velocidade e estabilidade da formação dos complexos são dependentes de fatores estereoquímicos das moléculas envolvidas (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Essa classe de moléculas é amplamente utilizada na indústria farmacêutica por melhorar a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis. Além disso, por serem compostas por açúcares, as CDs melhoram a palatabilidade das formulações, requerido em diversas formas farmacêuticas, inclusive em DPI, propiciando mais adesão ao tratamento (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). Contudo, em formulações pulmonares as CDs têm apresentado bons resultados.

Kadota e colaboradores (2017) produziram formulações com  $\beta$ -CD e metil- $\beta$ -CD (M- $\beta$ -CD), para veiculação de izoniazida e rifampicina pela via inalatória, obtiveram excelente desempenho aerodinâmico, quando comparado aos pós isolados e não processados, partículas porosas de tamanho reduzido (KADOTA et al., 2017).

A rifampicina também foi utilizada como principio ativo por Tewes *et. al.* (2008), onde a complexação foi realizada com hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD). No trabalho além das características físico-químicas e aerodinâmicas, culturas de células permitiram avaliar a solubilidade do fármaco no tecido, o transporte transmembrana e a integridade do tecido na presença de CDs. Foi observado aumento da solubilidade aparente da rifampicina, constatando-se que a presença de CDs não melhora a absorção, porém possibilita que o fármaco permaneça mais tempo em contato com a membrana. Além disso, a integridade do tecido foi mantida, sem índice de toxicidade (TEWES et al., 2008).

Insulina complexada com HP- $\beta$ -CD, microparticulada com o polímero PLGA (poli(ácido lático-co-ácido glicólico)) apresentou liberação aumentada e prolongada em fluídos simulados do sistema respiratório e em estudos *in vivo*. Nesse trabalho Ungaro e colaboradores (2009) não observaram efeitos tóxicos agudos na

presença dos compostos, entretanto, os autores salientaram a necessidade de estudos a longo prazo (UNGARO et al., 2009).

Estudos de permeabilidade e toxicidade considera que a absorção sistêmica de CDs naturais é segura, enquanto que a  $\beta$ -CD metilada randomicamente (RM- $\beta$ -CD) é tóxica. Contudo, foi demonstrado que a hidroxialquilação das CDs diminui a toxicidade natural sistêmica das CDs (MATILAINEN; JARHO, 2006).

Dufour e colaboradores (2015) desenvolveram partículas por SD contendo budesonida complexada com HP- $\beta$ -CD, além da alta *performance* aerodinâmica e estabilidade físico-química, essas micropartículas apresentaram permeabilidade em células Calu-3 humanas (epitélio bronquial) reduzida inicialmente, porém com prolongamento do tempo de ação, isso devido ao equilíbrio de fármaco na superfície da célula. O efeito inflamatório da budesonida em ratos foi avaliado com administração intra-nasal e, os resultados demonstraram que quando em complexo, são necessários 2,5 vezes menos fármaco para gerar o mesmo efeito anti-inflamatório (DUFOR et al., 2015).

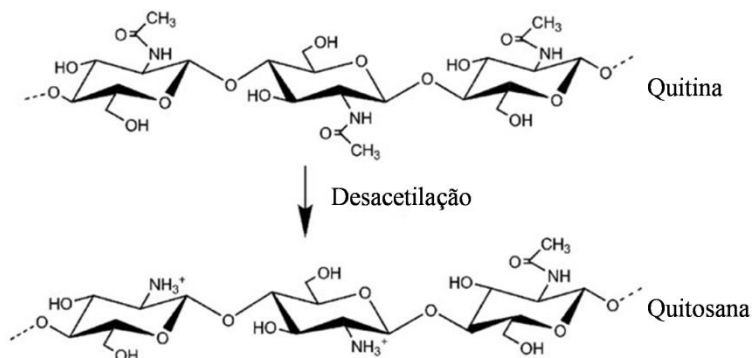
### 2.4.3 Quitosana

Obtida por meio da desacetilação da quitina, a quitosana (QTS, Figura 8) é um polímero natural de origem animal e fúngica. Sua solubilidade é dependente da protonação do grupo amino da molécula, que ocorre em pH igual ou menor a 6,5, em meio aquoso. O nível de protonação e as interações possibilitadas por esse fenômeno conferem versatilidade a molécula, a qual é utilizada em diversas áreas da ciência em distintas funções (GRENHA et al., 2010; HARRIS; ACOSTA; HERAS, 2013).

Na área farmacêutica é amplamente utilizada por ser biodegradável e compatível, filmogênica e mucoadesiva, antibacteriana, antioxidante, anticolesterolêmica e apresentar vantagens na absorção de alguns IAs (HARRIS; ACOSTA; HERAS, 2013).

Em pHs acima de 6,5, os grupos catiônicos interagem com componentes de cargas negativas da superfície em contato, tornando-se insolúvel. No caso do organismo humano, a mucina é esse componente negativo presente no lúmen de diversos órgãos, como intestino e pulmão. A mucoadesividade da QTS promove maior tempo de contato entre o IA e o sítio de ação. Além disso, pode reter água e auxiliar na solubilização e dissolução do fármaco (GRENHA et al., 2010; HARRIS; ACOSTA; HERAS, 2013).

Figura 8 - Reação de desacetilação da quitina, formação de quitosana.



Fonte: Adaptado de Nilsen-Nygaard *et al.* (2015).

Além disso, as moléculas de QTS podem interagir com receptores nas junções *tight*, que são estruturas proteicas das membranas biológicas que conferem a semi-permeabilidade das mesmas. Ao interagir com essas estruturas, induzem a dissociação temporária das junções, aumentando assim a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, podendo influenciar na ação do fármaco (GRENHA *et al.*, 2010).

Essas macromoléculas são divididas de acordo com sua massa molar, sendo de baixa massa molar entre 50000 e 190000 g/mol, de média massa molar entre 190000 e 310000 g/mol e de alta massa molar acima de 310000 g/mol. Alguns estudos demonstraram que QTS de baixa massa molar apresenta menor ativação de macrófagos e menor toxicidade tecidual. Com relação a liberação de fármaco, eficiência de encapsulação e estabilidade deve ser determinada de acordo com o IA, já que também pode apresentar diferenças (CHANG *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Como visto na seção 2.2, a depuração das partículas no sistema respiratório ocorre, porém ainda assim, pode ocorrer o acúmulo de partículas estranhas ao organismo, o que pode acarretar em danos a curto e longo prazo. Por isso, a utilização de polímeros em formulações pulmonares somente é permitida quando estes são degradados, absorvidos e de baixa toxicidade.

Rawal *et al.* (2018) desenvolveram nanopartículas de QTS contendo bedaquilina para o tratamento tuberculose, as quais não exibiram toxicidade em células de tecido pulmonar humano, nem em órgãos de ratos, em ensaio *in vivo* realizado a longo prazo, utilizando

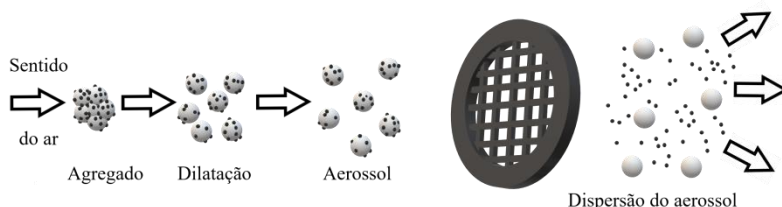


dose máxima equivalente 3135 mg de formulação por quilograma de massa dos animais do estudo (RAWAL; PATEL; BUTANI, 2018).

## 2.5 AVALIAÇÃO DA AERODINÂMICA

Ao inalar uma medicação DPI, os agregados de partículas ativas/fármacos e excipientes são segregados e formam um aerossol. Esse aerossol é formado por micropartículas contendo princípio ativo e por partículas maiores, os excipientes. A mistura de partículas menores e maiores melhora o fluxo do aerossol e direciona as partículas ativas aos pulmões, como demonstrado na Figura 9 (BISGAARD; O'CALLAGHAN; SMALDONE, 2001).

Figura 9 - Desagregação das partículas e formação do aerossol.



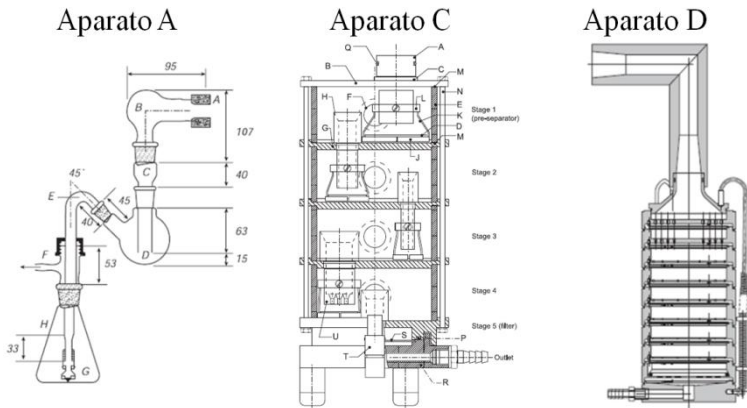
Fonte: Adaptado de Bisgaard & Callaghan (2001).

Com o objetivo de avaliar a aerodinâmica dos aerossóis formados foram desenvolvidos testes *in vitro*, os quais estão descritos na Farmacopéia Européia. São descritos quatro tipos diferentes de sistemas que avaliam características aerodinâmicas de formulações inalatórias, denominadas Aparato A – *glass impinger*, Aparato C - *multi-stage liquid impinger*, Aparato D - *Andersen cascade impactor* (Figura 10) e Aparato E - *Next Generation Pharmaceutical Impactor* (NGI) (European Pharmacopéia, 2005; OTAKE et al., 2016).

As similaridades entre os sistemas estão nas extremidades, a inicial consta de um bucal, onde o dispositivo inalatório é acoplado, a final é composta pela saída de ar, onde é conectada uma bomba com pressão negativa, que simula a inspiração humana. Quanto aos aparatos, cada um foi evoluindo na mensuração da aerodinâmica, com o objetivo de obter mais dados e se igualar cada vez mais com o sistema respiratório. Após simular a inspiração da formulação, é realizada a quantificação de fármaco em todos os estágios, inclusive na cápsula e dispositivo, obtendo assim o balanço de massa (OTAKE et al., 2016).

Buscando assemelhar-se com a geometria pulmonar de maneira simples, o aparato A, *glass impinger*, é fabricado em vidro com dimensões e volumes específicos, trata-se do aparato mais antigo. A divisão básica do *glass impinger* consta de cavidade oral, garganta e pulmões. O fármaco é quantificado em todos os estágios, traz a informação se a formulação é capaz ou não de atingir os pulmões (OTAKE et al., 2016).

Figura 10 - Aparatos descritos pela Farmacopeia Europeia para avaliar a aerodinâmica de formulações inalatórias.



*Glass impinger*      *Multi-stage liquid impinger*      *Andersen cascade impactor*

Fonte: Adaptado da Farmacopeia Europeia (2005).

Os aparatos C, D e E concedem algumas informações adicionais sobre os pós avaliados, são fabricados majoritariamente em aço inoxidável, apresentam etapas mais complexas com distintos tamanhos de poros, pelos quais a formulação percorre. A quantificação de fármaco nos estágios e o tamanho dos orifícios permitem que sejam realizados cálculos relacionados ao tamanho de partícula (European Pharmacopeia, 2005).

Esses aparatos apresentam inicialmente a porta de indução, com a geometria de boca e garganta, direciona as partículas ao estágio inicial, o pré-separador, responsável por reter partículas grandes, de maneira geral os excipientes (European Pharmacopeia, 2005).

O aparato C é composto, além do pré-separador, por mais quatro estágios, cada um contendo seis orifícios de 2,70 mm. O aparato D é constituído por mais sete estágios, com orifícios entre 1,89 e 0,254 mm. Ambos os aparatos têm seus estágios organizados verticalmente.

Composto pela porta de indução, pré-separador, sete estágios e um coletor com micro-orifícios (MOC), o aparato E ou NGI (Figura 11), é o mais recente e com maior exatidão quanto as variáveis obtidas. Tal fato se dá pela maior distribuição do tamanho de poros, estando estes entre 14,3 e 0,07 mm (Figura 11) (CESCHAN; BUCALÁ; RAMÍREZ-RIGO, 2015).

Os estágios e o MOC organizados horizontalmente, de forma alternada, geram um fluxo cruzado. Esse fenômeno impede que a impactação de jatos de ar na borda do estágio seja inibida pelo ar fluindo no centro do estágio (MARPLE et al., 2003).

O coletor do estágio 1 apresenta maior volume interno, desenhado para minimizar o impacto inicial, visto que nessa etapa são retidas as partículas de maior diâmetro aerodinâmico. Os estágios 2 a 7 são percorridos por menos partículas e de menor tamanho, por isso tem menor volume e compõem a impactação secundária. O estágio MOC tem volume igual ao estágio 1, pois é necessário maior espaço para acomodar os 4032 poros de diâmetro 0,07 mm (MARPLE et al., 2003).

No mercado existem diversos dispositivos inalatórios, as diferenças geométricas podem originar distintos resultados para a mesma amostra, sob as mesmas condições, quando avaliadas pelo mesmo método aerodinâmico. Isso ocorre pela alteração na turbulência de ar gerada, que pode facilitar ou dificultar o deslocamento das partículas da cápsula até os estágios do aparato utilizado.

Os dispositivos inalatórios são segregados em três categorias, de baixa resistência (<5 mbar), média resistência (entre 5 e 10 mbar) e alta resistência (>10 mbar). A classificação é realizada de acordo com o regime intrínseco de resistência, isto é, a pressão de ar inalado que o dispositivo resiste (DAL NEGRO, 2015).

Em suma, duas forças atuam no fluxo de ar gerado, a inspiração dependente do paciente e a turbulência produzida no inalador e, é essa turbulência que retira as partículas da cápsula e do dispositivo (DAL NEGRO, 2015).

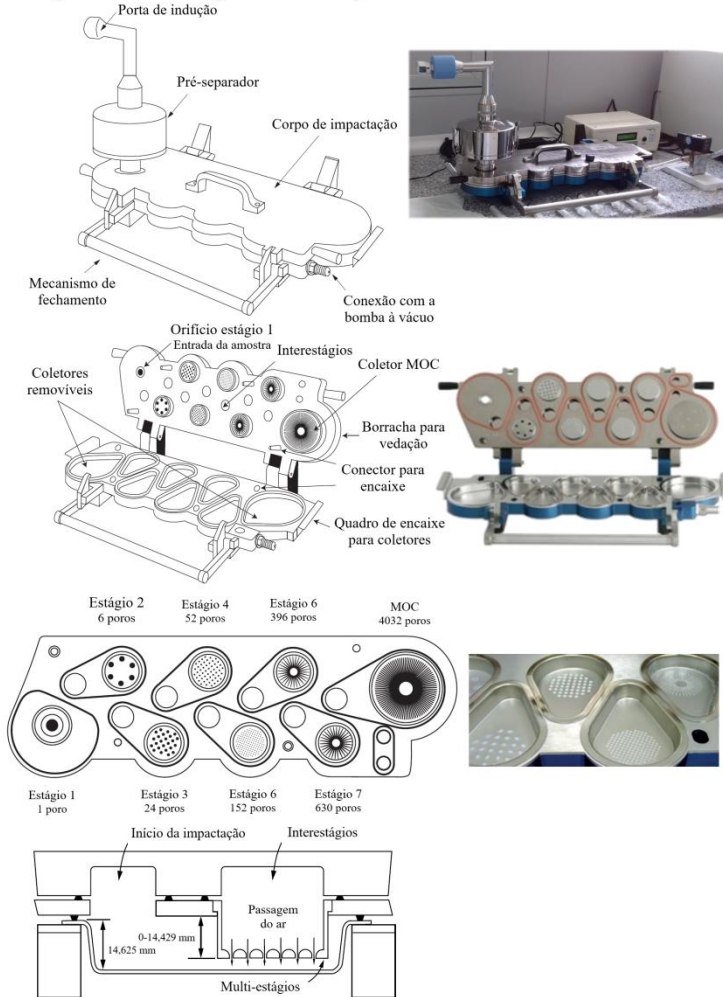
Com mais turbulência e fluxo de ar ocorre mais desagregação das partículas, assim, a fração de partículas finas (FPF) é maior e a probabilidade da formulação, com diâmetros aerodinâmicos adequados, alcançar a região pulmonar é maior. Esse fenômeno é observado em dispositivos inalatórios de alta e média resistência (DAL NEGRO, 2015).

Em dispositivos de baixa resistência apenas a inalação do paciente é capaz de desagregar as partículas. Em pacientes com vias

aéreas obstruídas esse tipo de dispositivo não é indicado, devido a deposição de fármaco na região orofaríngea (DAL NEGRO, 2015).

Figura 11 - Aparato E, ou *Next Generation Pharmaceutical Impactor*, descrito pela Farmacopeia Europeia.

Aparato E - *Next generation impactor*



Fonte: Adaptado da Farmacopeia Europeia (2005).

Diferentemente de formulações orais, as cápsulas não participam da dissolução e desintegração da forma farmacêutica. Na terapia

inalatória, as cápsulas são reservatório da formulação, quando perfurada influencia na aerolização e dispersão das partículas (WAUTHOZ et al., 2018).

Em estudo mais recente, Wauthoz e colaboradores avaliaram a influência das cápsulas na liberação e dispersão da formulação. Para isso utilizaram o NGI, com inalador de baixa resistência, e posteriormente a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar morfologicamente cápsulas de distintas composições. No trabalho foram testadas formulações de formoterol com lactose (LAC), obtendo composições binárias e ternárias (com LAC de duas granulações). Foram utilizadas cápsulas de gelatina e HPMC de diferentes fabricantes (WAUTHOZ et al., 2018).

As diferenças entre os resultados foram atribuídas ao conteúdo de água na cápsula, já que apresentam orifícios maiores e com menor probabilidade de formar ligações de hidrogênio. Apresentam melhor *performance* aerodinâmica cápsulas de HPMC com conteúdo de água de aproximadamente 4%, enquanto que as cápsulas de gelatina apresentaram aproximadamente 13% de água em sua composição (WAUTHOZ et al., 2018).

Quanto às misturas binárias e ternárias, essa última apresentou melhor desempenho aerodinâmico, independente da cápsula utilizada. Sendo que, a lactose micronizada auxiliou na menor deposição de fármaco na porta de indução e no pré-separador do NGI (WAUTHOZ et al., 2018).

## 2.6 DEPOSIÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Como exposto no item 2.2, a eficácia de uma formulação inalatória de ação local é dependente da deposição de suas partículas diretamente no sítio ativo. Logo, ensaios que simulem sua deposição e, também a liberação do fármaco, são importantes para caracterizar a forma farmacêutica inalatória.

A molhabilidade dos pós pode predizer diversas características dos mesmos, como a capacidade de revestimento, a dispersão e também como indicativo do mecanismo de dissolução. A mensuração é realizada a partir do ângulo formado entre o líquido de interesse e a superfície do sólido, por isso, denominado como ângulo de contato (ALGHUNAIM; KIRDPONPATTARA; NEWBY, 2016).

O método mais utilizado para obtenção da molhabilidade é chamado de gota séssil (do inglês, *sessile drop*), simples e reprodutível,

mensura o ângulo de contato entre o sólido (pastilhas ou pós disperso em fita adesiva) e o líquido de interesse. O procedimento é filmado em alta resolução e *softwares* específicos realizam a medida do ângulo e os cálculos necessários. Ao produzir as pastilhas a superfície pode ser modificada, tornando-se menos porosa, por exemplo, podendo alterar o resultado final (ALGHUNAIM; KIRDPONPATTARA; NEWBY, 2016).

Ao mensurar a molhabilidade de pós inalatórios se retrata a fase da deposição desses no tecido pulmonar, ao entrar em contato com o líquido pulmonar, podendo assim estimar se essa deposição será facilitada ou não. Ainda, a partir dessa análise, é possível inferir qual mecanismo de dissolução e/ou liberação do fármaco será predominante (RITA; BENKE; ÁRPÁD, 2019).

Recentemente, essa metodologia vem sendo utilizada no desenvolvimento de formulações DPI. Lin *et. al.* (2017) e Huang *et. al.* (2018) desenvolveram micropartículas de itraconazol, um fármaco de baixa solubilidade aquosa, utilizando como carreador o açúcar manitol, ambos os trabalhos tiveram melhora significativa na dissolução do fármaco, utilizando aparato de dissolução tipo II e, por mensuração do ângulo de contato, obtiveram que a quanto maior a molhabilidade em água da formulação melhor será a dissolução (HUANG *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2017).

Ambrus e colaboradores (2018) descrevem que partículas menos coesivas, ou seja, aquelas de alta molhabilidade em solventes aquosos apresentam melhor deposição pulmonar, devido às interações entre as próprias partículas e, entre as partículas e o epitélio pulmonar (AMBRUS *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante a ser avaliado precedente a testes *in vivo* é a liberação do fármaco, que antecede a dissolução nos bronquíolos e posterior ação do fármaco. Ainda não estão disponíveis nos compêndios oficiais metodologias padronizadas para avaliações de liberação e permeabilidade utilizando modelos pulmonares (GRAY, A. V., 2015; HASTEDT, J. E. *et al.*, 2015).

Alternativas vêm sendo utilizadas a fim de avaliar liberação e permeabilidade em modelos pulmonares como a utilização de culturas e co-culturas celulares humanas ou de animais, além de membranas sintéticas (HAGHI *et al.*, 2014; TRIOLO *et al.*, 2017). A realização de experimentos simulatórios com formulações de bancada evita o uso de animais em experimentos nas fases iniciais, sendo esses necessários apenas quando a formulação estiver bem estabelecida, além de se tratar de uma metodologia mais barata e que evita a aprovação pelo comitê de

ética (CESCHAN et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Atualmente, com o intenso estudo acerca de diferentes materiais biocompatíveis é possível desenvolver membranas sintéticas equivalentes a membranas biológicas, podendo essas ser utilizadas em tais experimentações (ABIDIN et al., 2017).

Um desenvolvimento que tem demonstrado resultados promissores é a avaliação da liberação e permeabilidade de formulações pulmonares por meio de difusão vertical, utilizando geralmente a célula de Franz e adaptando parâmetros para simular um ambiente pulmonar, para isso podem ser selecionados tecidos pulmonares animais ou membranas sintéticas com espessura e características de permeabilidade semelhantes ao tecido pulmonar (OLIVEIRA et al., 2017; TRIOLO et al., 2017).

Um estudo comparativo da liberação de fármaco utilizando metodologias de célula de Franz, aparato de dissolução II (USP) e aparato de dissolução IV (USP), foi realizado por Salama e colaboradores em 2007. Foi avaliada a liberação de isoniazida incorporada em micropartículas de QTS de baixa massa molecular, para administração pulmonar. A ordem de liberação das formulações ocorreu da mesma forma em todos os ensaios, sendo o fármaco liberado em maior proporção quando a composição da formulação apresentava menor quantidade de polímero, entretanto a diferenciação entre as formulações foi melhor observada nos ensaios realizados em células de Franz (SALAMA et al., 2008).

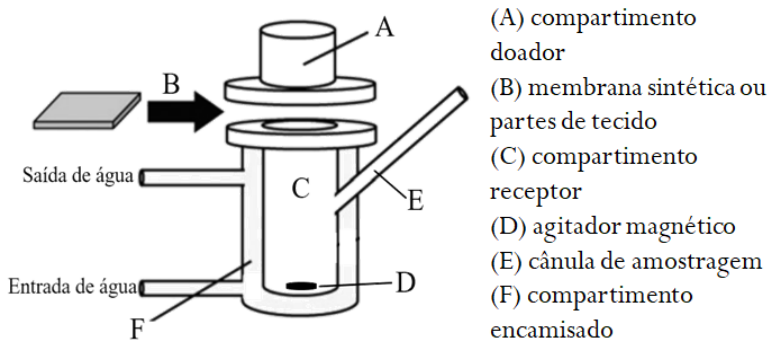
Nas metodologias utilizando aparatos de dissolução II e IV os perfis de liberação foram sobrepostos, sendo que em todos houve liberação de aproximadamente 100% do fármaco. Enquanto que na metodologia de célula de Franz não houve sobreposição dos perfis, a liberação foi lenta e progressiva, onde apenas a formulação que continha apenas isoniazida liberou 100% de fármaco. A formulação que continha 90% de fármaco apresentou o perfil de menor liberação, sendo que durante o experimento de 180 minutos, foram liberados apenas 50% do fármaco contido na formulação (SALAMA et al., 2008).

A conformação dos equipamentos é responsável pelas diferenças observadas, tanto o dissolutor tipo II quanto o tipo IV, apresentam velocidade fluxo de meio relativamente altas, quando se compara com o fluxo de líquido nos pulmões, isso faz com que a liberação do fármaco seja realizada principalmente por arraste do fármaco para fora da membrana de diálise. Em contrapartida, nas células de Franz a velocidade do fluxo é baixa, pois o pó é depositado nas membrana e ultrapassa-a por diferença de concentração, afinidade e tamanho, além

disso, a dissolução do fármaco ocorre lentamente, devido a pequena quantidade de água no compartimento doador de amostra. Os autores justificam que a metodologia de célula de Franz seria a melhor aplicada a sistemas pulmonares de liberação de fármaco, uma vez que a forma de liberação tende a se aproximar com a fisiologia pulmonar (SALAMA et al., 2008).

O sistema de célula de Franz está demonstrado na Figura 12, o qual é constituído por um compartimento doador, onde a amostra é alojada, um espaço entre compartimentos, onde é inserida a membrana sintética ou partes de tecido, compartimento receptor, preenchido com meio de interesse, o qual está em constante movimento, realizado com o auxílio de um agitador magnético. A retirada de alíquotas e a reposição de meio é realizada pela cânula de amostragem. A temperatura é controlada por meio de água aquecida circulante ao redor do compartimento receptor, devido ao encamisamento do compartimento (MACHADO et al., 2015).

Figura 12 - Desenho esquemático do sistema de célula de Franz.



Fonte: Adaptado de Kristof *et al.* (2017).

Assim, a amostra é colocada sobre a membrana semi-permeável, o fármaco é liberado e ultrapassa ao meio receptor, onde é quantificado. O experimento é realizado sob temperatura e agitação controlada (MACHADO et al., 2015).

## 2.7 BROMETO DE IPATRÓPIO

Há séculos compostos anticolinérgicos são utilizados no tratamento de enfermidades respiratórias, sendo que o principal agente

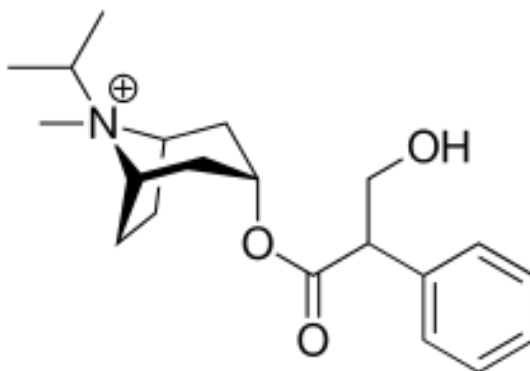


anticolinérgico de origem natural é a atropina, alcalóide extraído das espécies *Datura stramonium* e *Atropa Belladonna*. Documentos antigos de medicina indiana indicam *Datura stramonium* no tratamento de asma. No século XIX começou a ser utilizada na Europa, sendo um dos únicos princípios ativos para o tratamento de broncoespasmo (HANSEL et al., 2009).

A popularidade da atropina entrou em declive com a descoberta dos  $\beta$ -adrenérgicos, em especial a adrenalina, uma vez que os anticolinérgicos naturais causam efeitos colaterais sistêmicos graves, como taquicardia (HANSEL et al., 2009).

O avanço da química medicinal permitiu a descoberta de novos fármacos, análogos a moléculas extraídas de fontes naturais. O brometo de ipratrópio (BI) foi desenvolvido em 1976, análogo da atropina, apresenta modificação estrutural no grupamento amina, passando de amina terciária para quaternária e, ainda devido a protonação do nitrogênio, apresenta-se na forma de sal de bromo, em geral monohidratada. Essas características fazem do BI um composto solúvel em água, livremente solúvel em metanol e ligeiramente solúvel em etanol (Figura 13) (HANSEL et al., 2009).

Figura 13 - Estrutura química do brometo de ipratrópio.

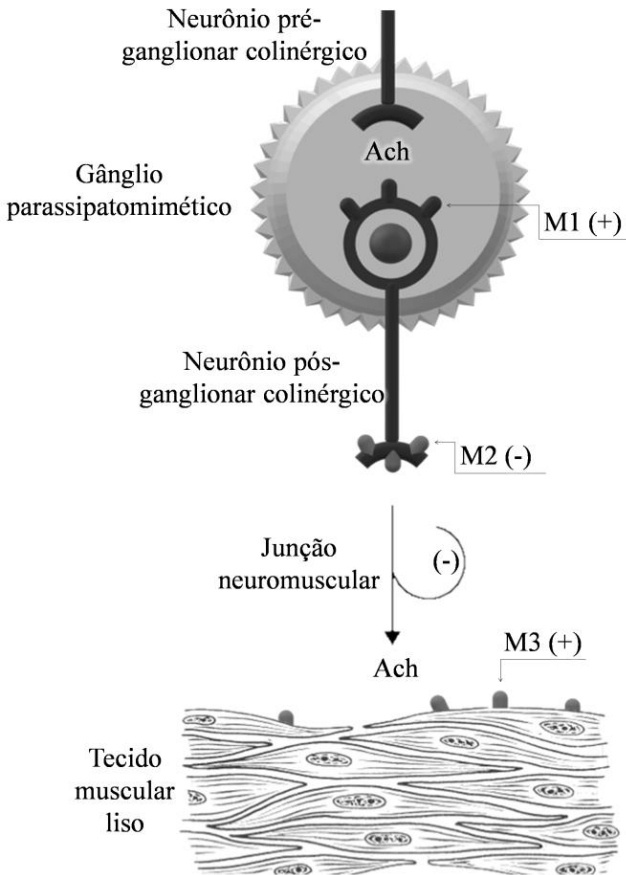


Fonte: Abdine, Belal & Al-badr (2003).

Pequenas diferenças entre as moléculas de atropina e BI foram suficientes para reduzir a permeabilidade da molécula, diminuindo a absorção sistêmica e a incidência de efeitos colaterais (HANSEL et al., 2009).

O controle da contração da musculatura lisa pulmonar é realizado por estímulo do nervo vago aferente, que transmite a informação ao sistema nervoso central, o qual responde pelo nervo vago eferente com a ação de contração ou relaxamento desses músculos (no caso de *feed back* negativo) (Figura 14). Para isso estão envolvidos os receptores muscarínicos, os quais têm como ligante a acetilcolina (HANSEL et al., 2009; SEALE, 2003).

Figura 14 - Transmissão de impulsos nervosos via nervo vago e bloqueio pelo brometo de ipratrópio (Ach representa o neurotransmissor acetilcolina).



Fonte: Adaptado de Hansel *et. al.* (2009).

São expressos três subtipos no sistema respiratório. O subtipo  $M_1$  facilita a transmissão do impulso nervoso e aumenta a contração muscular, enquanto o  $M_3$  media a contração muscular e a secreção de muco, em contrapartida,  $M_2$  é responsável pelo *feed back* de inibição da liberação de acetilcolina. Os subtipos estão localizados em distintas regiões das vias aéreas, sendo que  $M_1$  está presente em gânglios periobrônquicos,  $M_2$  em receptores pós-ganglionares e  $M_3$  no músculo liso (HANSEL et al., 2009; SEALE, 2003).

A ação do BI ocorre por antagonismo dos receptores muscarínicos localizados no pulmão. Por não ser seletivo, o BI pode manter sua ação por meio da retroalimentação inibitória, por ligação em receptores  $M_2$ . A Figura 14 mostra esquematicamente as transmissões de impulsos nervosos mediados por acetilcolina e como o bloqueio realizado pelo BI inibe a contração muscular lisa (HANSEL et al., 2009).

Após inalação a máxima resposta ocorre entre uma hora e meia e duas horas, a intensidade de ação diminui, porém é sustentada por até seis horas. Os efeitos colaterais podem incluir olhos e boca seca, efeitos cardiovasculares como taquicardia e aumento do débito cardíaco, porém em baixa incidência devido a via de administração (STAGNER, 2016).

A longo prazo seu uso por meio de nebulização pode induzir glaucoma, devido à forma farmacêutica permitir que o fármaco entre em contato com os olhos do paciente que, se apresentar predisposição, poderá desenvolvê-lo com o uso regular da medicação. Outros distúrbios psíquicos podem ser acarretados, já que o fármaco tem ação sob o sistema nervoso central (KALRA; BONE, 1988; KOLA et al., 2017; PEJIC; KLARIC, 2017; POLATLI et al., 2002).

Esse fármaco é indicado principalmente a pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), caracterizada como uma enfermidade respiratória onde ocorre obstrução crônica e progressiva do fluxo aéreo, a evolução da doença gera um processo inflamatório que pode atingir brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquiolite obstrutiva) e também o parênquima pulmonar (enfisema pulmonar); em casos mais avançados da doença o quadro inflamatório se estender provocando reações sistêmicas, como a perda de peso e a redução da massa muscular. Dentre os principais sintomas da doença estão tosse, secreção, dispneia e sibilos (BARNES, P., DRAZEN, J., RENNARD, S., THOMSON, 2009; BRASIL, 2004, 2012).

O desenvolvimento da doença ocorre pela inalação de partículas ou gases tóxicos, de origem ocupacional ou pelo tabagismo, sendo esse último o principal fator que desencadeia a doença. Outros fatores como

deficiência de algumas proteínas, desnutrição e prematuridade, também podem desencadear a doença, porém se isolados não apresentam muita relevância (BRASIL, 2004, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a DPOC é a quarta principal causa de morte, a qual tem aumentado a cada ano devido ao aumento do tabagismo nos países em desenvolvimento e ao envelhecimento da população; estima-se que até 2030 a doença torne-se a terceira causa de morte (OMS, 2018).

Não há no mercado uma medicação na forma pó para inalação contendo o fármaco BI. Nesta forma farmacêutica, apenas broncodilatadores agonistas adrenérgicos são comercializados, porém estes podem provocar alguns efeitos cardíacos, principalmente em pacientes cardiopatas (GOODMAN; GILMAN, 2005).

A metodologia de SD foi utilizada por Vinjamuri et. al (2016) para desenvolver micropartículas contendo BI, LAC e leucina. Corrigan e colaboradores (2006) também desenvolveram micropartículas contendo BI, porém associado a salbutamol, nesses trabalhos foram avaliadas apenas características físico-químicas (CORRIGAN; CORRIGAN; HEALY, 2006; VINJAMURI; HAWARE; STAGNER, 2016).

Kim Y. H. e Shing K. S. (2008) utilizaram fluido supercrítico para micronizar BI e avaliar quanto sua deposição pulmonar, o fizeram *in situ*, por meio de um *software* e puderam concluir que a maior parte das formulações desenvolvidas são retidas na região traqueobrônquica (KIM; SHING, 2008).

Por meio de matrizes apolares contendo DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), PLGA e PLA (ácido polilático) houve a liberação controlada de BI, as partículas obtidas apresentaram baixa densidade, devido à alta porosidade, tamanhos adequados à via inalatória. Também foi realizado um estudo em animais, que demonstrou prolongamento do tempo de ação, porém somente quando a composição de polímeros é igual 30%, os ensaios *in vivo* não foram equivalentes ao estudo de liberação *in vitro*, indicando que a formulação pode agir de forma distinta quando em contato com o organismo (KIM; SHING, 2008).

Visto que o BI é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças pulmonares, auxilia no controle dos sintomas, pode ser utilizado em diversos perfis de pacientes. O desenvolvimento de uma forma farmacêutica que cause menos efeitos colaterais contendo o fármaco pode trazer benefícios aos usuários e ampliar o número de pacientes que possam utilizá-lo. Além disso, os medicamentos DPI são portáteis e de fácil utilização.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

O BI foi doado pelos Laboratórios Teuto Brasileiro S/A, (Anápolis-GO) e Prati-Donaduzzi (Toledo-PR). As ciclodextrinas (CDs): beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) foram doadas pela empresa Labonathus (Campinas, Brasil), representante nacional da Roquette Corporate (Iestem, França). A lactose (LAC) adquirida da DMV Fonterra Excipients (Goch, Alemanha) e a quitosana de baixa massa molar (QTS) SigmaAldrich (São Paulo, Brasil) foram adquiridas de seus respectivos fabricantes sob lote SLBH5874V. Lactose monohidratada (LAC140) (-70 + 140 ASTM Mesh, Parafarm, Saporiti, Buenos Aires, Argentina), disponibilizada pelo repositório de drogas e excipientes do setor de Partículas, da PLAPIQUI/CONICET.

Sais, ácidos, bases e reagentes utilizados foram de grau analítico, a água ultrapura foi obtida pelo sistema gradiente Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MATÉRIAS PRIMAS

Para as análises por DSC foi utilizada célula DSC 60 – Shimadzu (Kyoto, Japão), previamente calibrada com padrão índio 99,99 %. A razão de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min na faixa de temperatura entre 30 e 300 °C, para BI isolado e entre 30 e 250 °C para as demais amostras, sob atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min.

A TGA foi realizada com o equipamento TGA-50 – Shimadzu (Kyoto, Japão), previamente calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Cerca de 4,0 mg das amostras selecionadas foram analisadas num fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, na faixa de temperatura entre 50 e 450 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min.

Os espectros de FTIR foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil) equipado com refletância total atenuada (ATR), na faixa entre 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 32 *scans*, na resolução do espectro de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Foi obtido um espectro branco para cada uma das condições experimentais.

Um difratômetro Philips modelo X'Pert (Holanda), com um tubo de cobre, voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, na faixa de 5 – 40

(20) com o tempo de intervalo de 5 s, foi utilizado para obter os difratogramas.

As fotomicrografias foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca JEOL (Japão), modelo JSM-6390LV, sob voltagem de aceleração de 10 kV. O preparo das amostras consta da aplicação dos pós com fita dupla face em *stubs*, seguida do recobrimento com ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD 500. A preparação e as análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia (LCME-UFSC).

### 3.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

As possíveis interações foram avaliadas pelos métodos de análise físico-química de misturas físicas e aplicação da teoria de Flory-Huggins.

Para o estudo de pré-formulação, misturas físicas foram obtidas pesando o fármaco e cada um dos carreadores na proporção 1:1 (m/m), agitadas por cinco minutos em agitador rotativo, após isso as misturas físicas foram analisadas por DSC e FTIR, conforme descrito no item 3.2.

As análises DSC foram realizadas na faixa de trabalho de 30 a 250 °C, com razão de aquecimento foi de 5 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min.

Os espectros de FTIR foram obtidos na faixa entre 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 32 *scans*, na resolução do espectro de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Para o método de Flory-Huggins, pequenas proporções de carreador 0, 5, 10, 15, 20 e 25 % (m/m) foram adicionadas ao fármaco, e as amostras resultantes foram analisadas por DSC. A razão de aquecimento utilizada foi de 5 °C/min numa faixa de temperatura entre 30 e 250 °C, sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min. A Equação 1 foi aplicada para calcular o parâmetro de interação entre fármaco-carreador.

$$\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_m^0} = -\frac{R}{\Delta H} \left( \ln \Phi + \left(1 - \frac{1}{m}\right) (1 - \Phi) + \chi(1 - \Phi)^2 \right) \quad (1)$$

Na Equação 1,  $T_m$  e  $T_m^0$  representam as temperaturas (em K) de fusão do fármaco nas misturas físicas e fármaco puro, respectivamente; R indica a constante dos gases e é igual a 8,31 L kPa/K mol;  $\Delta H$ , variação de entalpia de fusão do fármaco puro, em J/mol, obtido na análise DSC;  $\phi$ , a fração volumétrica do fármaco, em  $\text{cm}^3/\text{mol}$ , calculada

a partir da massa molar e densidade;  $m$ , a razão entre o volume da cadeia polimérica e o volume da molécula de fármaco (Equação 2); e  $\chi$ , a variável a ser determinada, sendo o parâmetro de interação entre os componentes (mPa).

Para calcular  $m$ , foi utilizada a Equação 2, onde  $MM$  corresponde a massa molar e  $\rho$ , densidade verdadeira.

$$m = \frac{MM \text{ (carreador )} / \rho \text{ (carreador )}}{MM \text{ (fármaco )} / \rho \text{ (fármaco )}} \quad (2)$$

A entalpia de fusão do BI foi calculada pelo *software* TA-60WS versão 2.01. A densidade das matérias-primas foi obtida utilizando picnometria em gás hélio em Accu PYC II 1340 (Micromeritics), com mensuração realizada dez vezes, a média dos valores foi aplicada na Equação 2 e para obter as frações volumétricas da Equação 1.

Para obtenção das massas molares foram utilizados dados empíricos para BI,  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD, devido a fórmula química permanecer constante, entretanto para a QTS, onde a massa molar é dependente da média de unidades formadoras desse polímero natural, a determinação da massa molar média foi realizada experimentalmente.

Soluções diluídas de QTS foram preparadas em ácido acético 0,2 mol/L contendo 0,2 mol/L de cloreto de sódio, a viscosidade dessas soluções foi aferida em viscosímetro de Brookfield modelo LVDV-II+P, a temperatura de  $25 \pm 1$  °C, sob rotação de 150 rpm.

A viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) é calculada a partir da Equação 3, onde  $\eta_a$  representa a viscosidade da solução amostra e  $\eta_0$  a viscosidade mensurada para o solvente utilizado, nesse caso, a solução de ácido acético contendo cloreto de sódio.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_a}{\eta_0} - 1 \quad (3)$$

Os dados de  $\eta_{sp}$  são utilizados na construção de uma curva, a qual tem como eixo y a razão de  $\eta_{sp}$  pela concentração de QTS na solução e como eixo x a concentração de QTS. A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é indicada pela intersecção da curva no eixo y, sendo utilizada na Equação 4 para determinar a massa molar viscosimétrica média da matéria-prima.

$$[\eta] = K \times MM^\alpha \quad (4)$$

A Equação 4, formulada por Mark-Houwink, apresenta valores de  $\alpha$  e K constantes, sendo iguais a 0,93 e  $1,81 \times 10^3$ , respectivamente (GRUNWALD et al., 1978).

### 3.4 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES

O estudo de solubilidade de fases foi realizado para avaliar a interação entre o fármaco BI e as ciclodextrinas que serão usadas como carreadores nas formulações pulmonares. Para tanto, seguiu-se a literatura de Higuchi e Connors (1965).

Soluções crescentes de

CDs foram elaboradas, para  $\beta$ -CD de 0 a 16 mM e para HP- $\beta$ -CD de 0 a 46 mM, e a estas foram adicionados 10 mg de BI, obtendo concentração de fármaco 2 mg/mL. As suspensões permaneceram sob agitação, a temperatura ambiente controlada ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até atingir o equilíbrio.

A concentração de BI dissolvida foi determinada utilizando a metodologia de quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV). Primeiramente foi realizada uma varredura para determinar o comprimento de onda de trabalho, seguida pelo desenvolvimento de uma curva padrão de BI utilizando espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian, Estados Unidos). Alíquotas das suspensões foram coletadas nos tempos de 24 e 48 h, diluídas e a leitura em espectrofotômetro foi feita em triplicata.

### 3.5 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular foi realizada tendo o BI como ligante e LAC,  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, QTS,  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD como receptores, utilizando *docking* rígido/flexível para analisar a interação entre o ligante e os receptores. As estruturas dos receptores foram mantidas rígidas, a medida da flexibilidade das ligações ou torções pré-determinadas do ligante foram consideradas, gerando distintas configurações.

Para obtenção das estruturas foram utilizados dados cristalográficos (CIF), sendo que os únicos receptores modelados computacionalmente com o campo de força *General AMBER Force Field* (GAFF), que é específico e parametrizado para moléculas orgânicas, foram a QTS e a HP- $\beta$ -CD, nesta última apenas contendo os hidrogênios polares (GAFF, 2018).



A etapa do *pré-docking* foi realizada no programa AutoDock Tools (MORRIS et al., 2009), para ambas as etapas de preparações dos receptores e ligante. Na etapa inicial, os arquivos *.pdb* dos receptores, extraídos dos arquivos CIF com o programa Avogadro, são preparados retirando hidrogênios não-polares (NPHs) e apenas os polares são mantidos na estrutura, representação NPHs (HANWELL et al., 2012). O arquivo *.pdb* é verificado interativamente e reescrito como *.pdbqt*, onde as cargas parciais do tipo Gaisteiger-Marsili são aferidas para cada átomo (GASTEIGER; MARSILI, 1978, 1980).

A preparação do ligante procede de forma análoga nesta etapa de *pré-docking*, sendo aferida a flexibilidade das ligações e sendo também utilizada a representação NPHs. Em uma segunda etapa interativa, as configurações da caixa de *grid* são obtidas para cada sistema, e estas devem englobar o receptor quando seu domínio é desconhecido (sítio ativo), e principalmente quando este é de origem não-proteica (Tabela 1). Essas configurações são exportadas num arquivo *.txt* para o script de submissão para realização do *docking* molecular no programa AutoDockVina (TROTT; OLSON, 2009).

Tabela 1 - Parâmetros da caixa de *grid* para o *docking* molecular dos sistemas receptores/ligante.

Parâmetros da caixa de <i>grid</i>	LAC	$\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD	QTS	$\alpha$ -CD	$\gamma$ -CD
Espaçamento entre pontos (A)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Pontos nos eixos (A)						
x	40	40	40	36	40	40
y	40	40	40	66	40	40
z	40	40	40	38	40	40
Centro da caixa de <i>grid</i> (A)						
x	-21,108	-11,097	11,246	2,621	18,016	-12,781
y	9,026	-12,877	-12,877	-9,693	1,379	14,791
z	-0,997	2,251	2,251	4,97	21,17	-1,612

Fonte: A autora.

Para a etapa de *docking*, já com os arquivos preparados da etapa posterior, a configuração do parâmetro *exhaustiveness* foi mudada para valor de 10 (*default*=8), sendo submetidos ao programa AutoDockVina em ambiente BASH, no qual para cada corrida, o programa fornece as nove configurações mais estáveis (*default*), que são organizadas em

ordem crescente de *binding* para dar origem ao resultado final do *docking* molecular.

Os resultados finais são analisados via GUI no programa Chimera, nos quais também são geradas as imagens dos sistemas docados e incluídos os hidrogênios faltantes do receptor para a análise de ligação de hidrogênio.

### 3.6 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Com o objetivo de estudar o comportamento dos carreadores frente à técnica de SD, recorreu-se ao delineamento experimental utilizando o *software* Design-Expert® 7.0.0 (Stat-Ease Inc., EUA). Uma metodologia de superfície de resposta (MSR) com processamento algoritmo IV-*Optimal* foi elaborada empregando os fatores e níveis descritos na Tabela 2. Para temperatura e concentração os níveis foram adaptados de acordo com as características de cada carreador.

Basicamente, a MSR é utilizada para encontrar condições ótimas para uma ou mais respostas, ao empregar fatores e níveis influentes. Após realizados os experimentos e obter as respostas desejadas, a desejabilidade foi aplicada, função que ajusta os níveis dos fatores com o objetivo de originar a resposta desejada, nesse caso, tamanho de partícula e rendimento adequados (ARMSTRONG, 2006; TORBECK, 2007).

Tabela 2 - Fatores e níveis utilizados na metodologia de superfície de resposta.

Fator		Nível mínimo	Nível máximo
Temperatura (°C)	β-CD	140	150
	HP-β-CD	120	130
	QTS	160	180
Concentração (%)	β-CD	1	2
	HP-β-CD	5	10
	QTS	2	4
Aspiração (%)		70	100

Fonte: A autora.

Como respostas foram avaliados o rendimento e o tamanho de partícula. O rendimento foi calculado de acordo com a Equação 5 e o tamanho de partícula avaliado por análise das imagens de MEV (metodologia descrita no item 3.2), com mensuração em 100 partículas por meio do *software* ImageJ 1.52a. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia (LCME-UFSC).

$$\% \text{ rendimento} = \frac{\text{massa recuperada} \times 100}{\text{massa total}} \quad (5)$$

O delineamento experimental contou com 32 amostras, tendo quatro replicatas, com um total nove amostras apresentam em sua composição  $\beta$ -CD, onze HP- $\beta$ -CD e doze QTS (Tabela 3).

Tabela 3 - Condições utilizadas na obtenção das formulações ausentes de BI, determinadas por delineamento experimental.

	Aspiração (%)	Concentração (%)	Temperatura de entrada (°C)	Carreador
Q2	100	1	130	QTS
B1	70	1	130	$\beta$ -CD
Q5	100	0,76	110	QTS
Q9	85	1	120	QTS
H5	87	3	110	HP- $\beta$ -CD
B2	100	2	130	$\beta$ -CD
Q1	70	0,5	130	QTS
Q7	89	1	118	QTS
H3	70	3	110	HP- $\beta$ -CD
H6	100	1	130	HP- $\beta$ -CD
B3	92	1	145	$\beta$ -CD
B4	85	1,5	135	$\beta$ -CD
B5	70	2	150	$\beta$ -CD
H7	70	1	122	HP- $\beta$ -CD
Q3	100	0,5	110	QTS
B1	70	2	150	$\beta$ -CD
H2	85	2	120	HP- $\beta$ -CD
H4	83	3	130	HP- $\beta$ -CD
Q8	78	0,5	116	QTS
RH1	87	3	110	HP- $\beta$ -CD
H8	100	3	117	HP- $\beta$ -CD
Q6	70	0,56	110	QTS
H1	73	2,4	121	HP- $\beta$ -CD
RH2	100	3	118	HP- $\beta$ -CD
RQ1	70	0,56	110	QTS
B6	100	3	150	$\beta$ -CD
B7	85	2	140	$\beta$ -CD
Q4	70	0,76	130	QTS

B8	93	3	134	$\beta$ -CD
RH3	83	3	130	HP- $\beta$ -CD
B0	100	3	150	$\beta$ -CD
H0	100	3	130	HP- $\beta$ -CD
Q0	100	3	180	QTS

Fonte: A autora.

Ajustando critérios de rendimento e tamanho de partícula, foram obtidas variáveis para produção de nove formulações, contendo nessa etapa o fármaco. Das formulações três foram compostas por  $\beta$ -CD, duas por HP- $\beta$ -CD e quatro por QTS.

Devido à interferência da técnica de MEV na análise das formulações contendo fármaco, foram produzidas mais seis formulações utilizando temperatura mais alta, duas contendo  $\beta$ -CD, duas contendo HP- $\beta$ -CD, uma contendo QTS e uma contendo  $\beta$ -CD e QTS. Todas as formulações contendo BI e condições de produção estão descritos na Tabela 4.

Foram realizados para as formulações contendo fármaco, o cálculo de rendimento, como descrito anteriormente, a análise morfológica por MEV e o doseamento de BI, utilizando cromatógrafo Perkin Elmer series 200 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos).

A título de comparação, foi produzida uma formulação sem a presença de carreador, apenas com o BI, totalizando 16 formulações contendo o fármaco (F16, Tabela 4). Para produção dessa formulação as condições foram baseadas na literatura (VINJAMURI; HAWARE; STAGNER, 2016).

Tabela 4 - Condições utilizadas na produção das formulações contendo BI e os respectivos carreadores.

	Aspiração (%)	Carreador (%)	BI (%)	Temperatura de entrada (°C)	Carreador
F1	89	1,357	0,39	175	$\beta$ -CD
F2	89	1,357	0,39	150	$\beta$ -CD
F3	73	1,016	0,27	150	HP- $\beta$ -CD
F4	73	1,016	0,27	175	HP- $\beta$ -CD
F5	100	0,320	0,28	160	QTS
F6	93	0,560	0,20	160	$\beta$ -CD/QTS
F7	100	1,000	0,50	160	QTS

F8	99	1,500	0,38	146	QTS
F9	99	1,500	0,38	158	QTS
F10	93	1,000	0,25	131	QTS
F11	10	5,640	0,75	124	HP- $\beta$ -CD
F12	88	1,390	0,25	136	$\beta$ -CD
F13	83	5,100	0,68	119	HP- $\beta$ -CD
F14	89	1,600	0,29	150	$\beta$ -CD
F15	83	1,650	0,30	136	$\beta$ -CD
F16	100	0,000	0,81	150	Ausente

Fonte: A autora.

A produção das formulações propriamente dita constou inicialmente da produção de soluções. Para isso a solubilização do carreador foi realizada em agitador magnético, sendo que para as formulações contendo  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD foi utilizada água ultrapurificada, para as formulações contendo QTS e  $\beta$ -CD/QTS ácido acético 1,5 %.

As formulações apresentadas na Tabela 3 contaram apenas com os carreadores. Para as formulações apresentadas na Tabela 4, após a solubilização completa dos carreadores a quantidade correspondente de BI foi adicionado.

Para a formulação F6, primeiramente foi solubilizada a  $\beta$ -CD, em seguida o BI e finalmente foi adicionada QTS.

Todas as formulações permaneceram sob agitação magnética por 24 h. Procedeu-se então, com a nebulização em mini *spray-dryer* B-290 Buchi (Buchi, Suíça) utilizando as variáveis descritas em respectivas tabelas.

Todas as amostras foram produzidas sob condições de nível do rotâmetro entre 40 e 50 (NI/h) e bomba a 15%. Todas as formulações foram armazenadas em recipiente fechado, mantidas em dessecador sob temperatura ambiente.

O rendimento dessas formulações foi calculado seguindo a Equação 5. Para o doseamento de BI nas formulações recorreu-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Perkin Elmer series 200 (PerkinElmer Inc., Estados Unidos) utilizando método analítico validado, descrito no apêndice A.

### 3.7 SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES FINAIS

Para selecionar as formulações com características mais promissoras foi realizada uma análise dos resultados das técnicas de caracterização de densidade e tamanho de partícula, análises realizadas na PLAPIQUI/CONICET (Bahía Blanca, Argentina), além dos dados de rendimento, condições do processo de produção e caracterização do estado sólido, realizados na UFSC.

Foram determinadas densidades *bulk* (aparente) e *tapp* (de compactação), utilizando a metodologia da proveta. Primeiramente, são realizados os procedimentos da densidade *bulk*, onde 1 a 2 g de amostra é adicionado a uma proveta graduada, sem compactação, e em seguida tem seu volume mensurado. Após isso, realiza-se os procedimentos para determinação da densidade *tapp*, onde a proveta é levantada a uma altura de  $10 \pm 5$  cm e impactada por 100 vezes, sob ritmo constante, o volume final do produto compactado é mensurado. Ambas as determinações foram realizadas individualmente com cada amostra e em triplicata.

As densidades foram calculadas utilizando dados de massa e volume (Equação 6). A partir dos resultados de densidade *bulk* e *tapp* foram calculados Índice de Carr (IC) (Equação 7) e relação de Hausner (RH) (Equação 8):

$$d = \frac{m}{v} \quad (6)$$

$$IC = \frac{\sigma_{tapp} - \sigma_{bulk}}{\sigma_{tap}} \quad (7)$$

$$RH = \frac{\sigma_{tapp}}{\sigma_{bulk}} \quad (8)$$

Onde, *d* representa densidade; *m*, massa de amostra; *v*, volume ocupado pelo pó na proveta; IC, índice de Carr;  $\sigma_{tapp}$ , densidade de compactação;  $\sigma_{bulk}$ , densidade aparente; RH, relação de Hausner.

O tamanho de partícula foi determinado por meio de difração a laser Horiba LA 950V2 (Kyoto, Japão), sob o método de pó, onde 100 mg de cada amostra foi dispersa em 800 mg de lactose (LAC140). Os dados obtidos são o diâmetro médio (*D<sub>m</sub>*) e seu desvio padrão (*DP*), mediana da distribuição (*D<sub>50</sub>*), diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 10% (*D<sub>10</sub>*) e 90% (*D<sub>90</sub>*). O *Span* é calculado utilizando esses dados indica a polidispersão do sistema e o diâmetro aerodinâmico (*Daer*), também calculado, relaciona a densidade *tapp* e *D<sub>50</sub>* (Equação 9).

$$Span = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}} \quad (9)$$

Onde:  $D_{90}$ ,  $D_{10}$  e  $D_{50}$  representam 90%, 10% e 50% da população.

O diâmetro aerodinâmico (Equação 10) foi determinado de forma estimada e de forma experimental. Primeiramente foi calculado a partir dos dados de  $D_{50}$  e  $\sigma_{tapp}$ . O conjunto de resultados foi avaliado e foram selecionadas quatro formulações para realização dos demais experimentos.

$$Daer = D_{50} \sqrt{\sigma_{tapp}} \quad (10)$$

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DAS MICROPARTÍCULAS

As micropartículas obtidas foram caracterizadas por DSC, TGA, FTIR, DRX e MEV, descritos no item 2.2.

Para visualização da  $T_g$  por DSC, a razão de aquecimento utilizada foi de 5 °C/min numa faixa de temperatura entre -50 e 240 °C, sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min. O resfriamento foi realizado com nitrogênio líquido.

A TGA foi realizada utilizando aproximadamente 4,0 mg das amostras selecionadas, num fluxo de nitrogênio de 50 mL/min na faixa de temperatura entre 30 e 450 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min.

Os espectros de FTIR foram obtidos na faixa entre 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 32 *scans*, na resolução do espectro de 4  $\text{cm}^{-1}$ , como descrito no item 3.2. Foi obtido um espectro branco para cada uma das condições experimentais.

Para obtenção dos difratogramas de raios-X, foi usada voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, na faixa de 5 – 40 (2 $\theta$ ) com o tempo de intervalo de 5 s.

As análises de MEV foram realizadas com o pó seco obtido por SD, a preparação das amostras foi realizada de acordo com o item 3.2.

A densidade real das amostras foi obtida utilizando picnometria em gás hélio em Accu PYC II 1340 (Micromeritics), a mensuração foi realizada dez vezes, com os resultados são exibidos na forma de média e desvio padrão.

### 3.9 PERFIL AERODINÂMICO

O perfil aerodinâmico foi determinado na Planta Piloto de Engenharia Química da CONICET, em Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Onde foi utilizado o *Next Generation Impactor* (CopleyScientific, Nottingham, RU), equipado com uma porta de introdução da amostra e um pré-separador conectado por um bucal ao NGI, que é constituído por um pêndulo inercial de sete estágios que separa os pós de acordo com os diferentes diâmetros aerodinâmicos, com a fase final é composta por um coletor de micro-orifício (MOC).

As amostras ( $25 \pm 0,50$  mg) foram inseridas em cápsulas de gelatina tamanho 3, os pós dispersos por meio de um inalador de alta resistência RS01 (Plastiapae, Milão, IT) a pressão negativa de 4 kPa, originando taxas de fluxo de aproximadamente 60 L/min.

A fim de suavizar o impacto e assemelhar a muco e epitélio do sistema respiratório, as os estágios de 1 a 7 e MOC foram recobertos de glicerina.

Após experimento, os diâmetros caudais de cada estágio são calculados de acordo com diretrizes específicas. O fármaco foi quantificado em cada estágio utilizando CLAE, com método previamente validado, descrito no apêndice A, utilizando cromatógrafo Watters Alliance e2695, detector UV fotodiodo Waters 2998. O diâmetro aerodinâmico mássico médio (DAMM) e o desvio padrão geométrico (DPG) foram determinados utilizando *cut-off* dos diâmetros. Os índices de Fração emitida (FE), Fração de partículas finas (FPF) e Fração respirável (FR) de acordo com as seguintes equações:

$$FE = \frac{\text{total recuperado} - (\text{bucal e dispositivo})}{\text{total recuperado}} \times 100 \quad (10)$$

$$FPF = \frac{\text{estágios 3 a 7 e MOC}}{\text{total recuperado no NGI}} \times 100 \quad (11)$$

$$FR = \frac{\text{estágios 4 a 7 e MOC}}{\text{total recuperado}} \times 100 \quad (12)$$

Todos os cálculos seguem especificações farmacopeicas (European Pharmacopeia 7.0, 2010).



### 3.10 AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO E LIBERAÇÃO

Para estimar a deposição das formulações foi utilizado o ângulo de contato em água, com medidas realizadas em goniômetro ramé-Hart modelo 250, usando o *software* DROPimage para tratar dados e obter imagens. As amostras na forma de pó foram prensadas, em prensa hidráulica Specac (Specac Limited, Inglaterra), obtendo pastilhas de espessura média de 1,6 mm e massa média de 849,25 mg.

A liberação do BI foi avaliada em células de Franz verticais, utilizando membrana de diálise celulósica (Sigma, peso molecular: 14.000 Da). O compartimento receptor (60 mL), onde a formulação é inserida, continha tampão fosfato pH 7,4 mantido em agitação sob temperatura controlada de 37 °C. Em intervalos pré-definidos, uma amostra de 1,5 mL foi retirada para quantificação do mesmo e o volume da célula completado com tampão fosfato pH 7,4 sob temperatura de 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata com cada uma das formulações selecionadas e com o fármaco puro.

A quantificação de fármaco liberado foi realizada em cromatógrafo Watters Alliance e2695, detector UV fotodiodo Waters 2998. O método cromatográfico foi descrito detalhadamente no apêndice A, onde a coluna cromatográfica foi a Purosphere® Star RP-18 Endcapped (Merck Millipore, Alemanha), 150 x 4,6 mm x 5µm, sob temperatura de análise de 35 °C. A fase móvel é constituída tampão fosfato monopotássico pH 4,0, ajustado com ácido fosfórico 85% e Acetonitrila, com fluxo de 1 mL/min.

Os perfis de liberação foram comparados de forma independente, utilizando os fatores  $f1$  (diferença) e  $f2$  (similaridade), a partir das equações:

$$f1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |Rt - Tt|}{\sum_{t=1}^n Rt} \right\} \times 100 \quad (14)$$

$$f2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \right\} \times 100 \quad (15)$$

Nas equações 14 e 15  $Rt$  e  $Tt$  indicam a porcentagem do fármaco liberado em para a referência e teste, respectivamente, a cada tempo. A variável  $n$  indica os tempos de coleta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS E ESTUDO DE INTERAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A caracterização físico-química e morfológica das matérias primas, suas misturas e formulações resultantes garante a qualidade e estabilidade dos pós em todas as etapas. Além disso, a comparação dos dados de materiais isolados e submetidos a processos de manufatura, pode sugerir interações, reações e comportamentos entre as matérias primas (BRITTAIN, 2003).

Uma série de técnicas são combinadas para obter dados físicos como temperatura de fusão e cristalinidade; químicos como força de ligação entre os átomos, representada pelos grupamentos químicos identificados no espectro FTIR; e morfológicos como a topografia da superfície dos pós. Sendo assim, o BI foi caracterizado por técnicas de DSC, TGA, FTIR, DRX e MEV, enquanto os carreadores por DSC, FTIR e MEV. Para análise das misturas foram utilizadas técnicas de DSC e FTIR e para a aplicação da teoria de Flory-Huggins apenas DSC.

Na determinação do perfil térmico do BI, foi possível identificar dois eventos endotérmicos na curva DSC (Figura 15A). O primeiro em 113,51 °C, característico de perda de água, seguido de estabilização da linha de base e em 236,61 °C foi observado o segundo evento endotérmico, de alto consumo de energia, com aspecto de fusão de substância pura, seguido de uma provável decomposição da amostra.

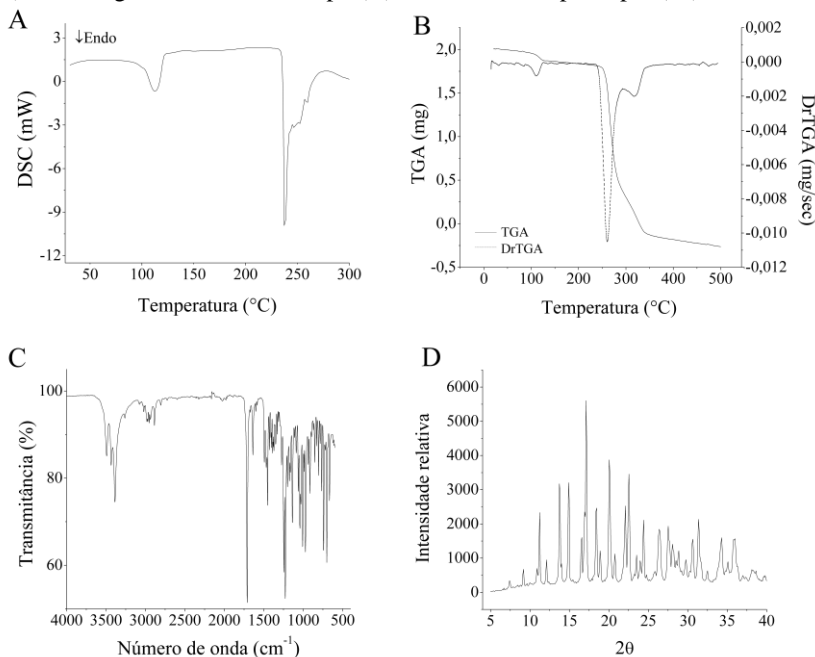
A  $T_g$  do fármaco não foi determinada experimentalmente durante o desenvolvimento desse trabalho, entretanto Müller (2015) utilizou DSC de temperatura modulada (TMDSC) e obteve a  $T_g$  do BI em 28,04 °C, dado que será utilizado para análise DSC das formulações finais (MÜLLER, 2015).

Na análise de TGA e DrTGA (Figura 15B), foi observado um evento entre 80 e 130 °C, com perda de aproximadamente 4% da massa da amostra, decorrente de desidratação, que confirma os dados obtidos por DSC. A curva TGA permanece estável até 242 °C, sendo que após essa temperatura dois eventos sobrepostos de perda de massa foram observados e, em 378 °C, o restante da amostra completa sua decomposição.

Os dados térmicos obtidos correspondem com o laudo do fabricante e ao relatado na literatura, sendo que a perda de água era esperada devido à amostra apresentar-se na forma hidratada. O evento

de fusão do BI foi observada em temperatura muito similar com as literaturas consultadas (BRITTAIN, 2003; LUSOCHIMICA, 2016).

Figura 15 - Curva obtida por calorimetria exploratória diferencial (A), curvas termogravimetria e termogravimetria derivada (B), espectro de infravermelho (C) e difratograma de raios-X de pó (D) do brometo de ipratrópio (BI) obtidas.



Fonte: A autora.

O espectro de FTIR do BI pode ser visualizado Figura 15C, o qual apresentou regiões características que foram condizentes com dados observados na literatura, sugere-se que bandas de média intensidade em 3490, 3389, 3335 e 3263  $\text{cm}^{-1}$  são correspondentes ao grupamento amina. Entre 3084 e 2805  $\text{cm}^{-1}$  foi observado um conjunto de bandas correspondente ao estiramento da cadeia carbônica. O grupo éster foi identificado por uma intensa banda em 1711  $\text{cm}^{-1}$ , referente à carbonila do éster, e em 1600  $\text{cm}^{-1}$  bandas correspondentes a porção etérea foram observadas. (SILVERSTEIN *et. al.*, 2006; BRITTAIN, 2003).

O difratograma do BI (Figura 15D) indicou a substância com cristalina, sem apresentar halo de amorfização, com picos característicos

e com intensidade muito similar ao encontrado na literatura, sendo as principais reflexões observadas em 11,22; 13,77; 14,94; 17,01; 20,05 e 22,46 ° (ABDINE; BELAL; AL-BADR, 2003).

As curvas DSC dos carreadores, misturas e comparativo com o fármaco estão demonstradas na Figura 16. Com relação ao perfil térmico dos carreadores, a LAC apresentou um evento endotérmico em 146,58 °C, correspondente à evaporação da água de cristalização, e um segundo evento endotérmico a 216,85 °C referente à fusão que foi seguida de degradação (AL-AKAYLEH et al., 2013).

Ambas CDs apresentaram endotermas próximas a 100 °C, atribuídas à desidratação, visto que na cavidade hidrofílica das CDs encontram-se alojadas moléculas de água (XIAO et al., 2014). Não foram observados outros eventos nas curvas DSC das CDs.

A QTS exibiu alteração na linha de base, sendo um indicativo de  $T_g$ . Todavia, na faixa de temperatura de trabalho não foram observados eventos térmicos (BOGGIONE et al., 2017). Todos os dados apresentaram-se condizentes com os encontrados na literatura, a decomposição dos carreadores ocorre em temperaturas superiores a 250 °C, como foi relatado por Xiao e colaboradores (2014) (para  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD) e Boggione e colaboradores (2017) (para QTS).

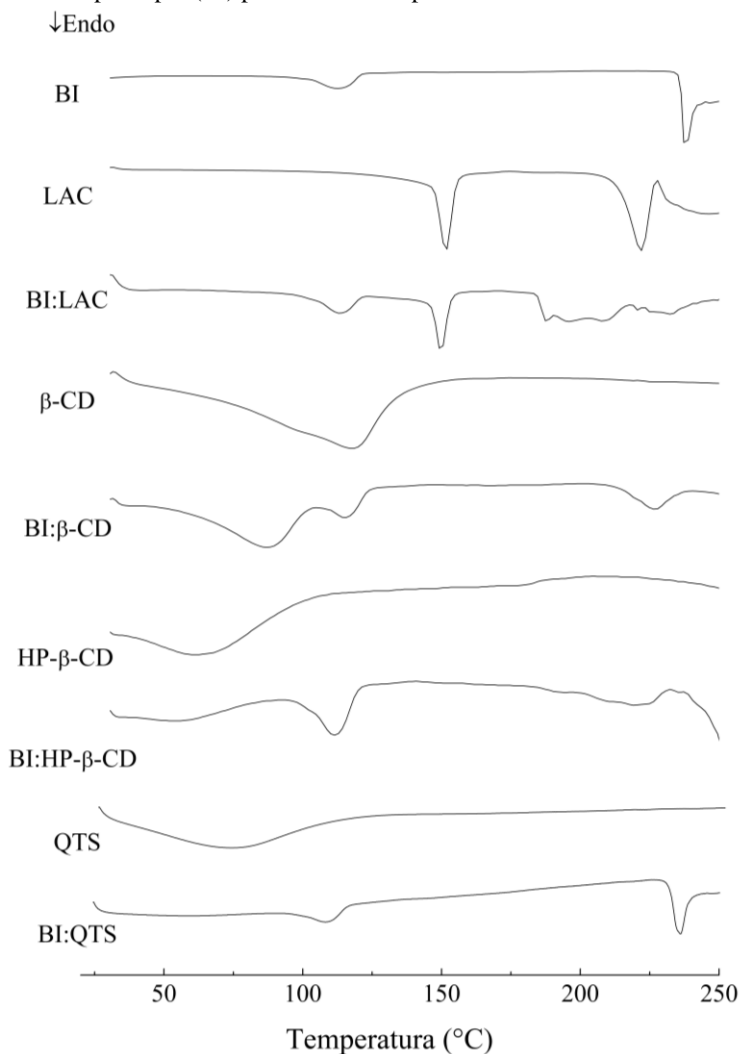
A  $T_g$  dos carreadores foi encontrada em busca na literatura, sendo igual a 61,1 °C para  $\beta$ -CD e a 61 °C para QTS de baixo peso molecular. A HP- $\beta$ -CD e a LAC, na forma  $\alpha$ -lactose monoidratada não apresentam esse tipo de transição do estado sólido (DHAWADE JAGTAP, 2012)

O conhecimento da temperatura de  $T_g$  torna-se imprescindível para o desenvolvimento de formulações por SD. A secagem e formação rápida das partículas sob temperatura acima da  $T_g$  propiciam o estado amorfo dos materiais. Essa forma é geralmente mais hidrossolúvel, facilitando a dissolução e conseqüentemente sua farmacocinética. A monitorização da  $T_g$  dos produtos finais é uma forma de identificar interações entre os componentes e avaliar se estes se encontram na forma cristalina ou amorfa (PERRONE et al., 2016).

Nos espectros FTIR dos carreadores (Figura 17) a LAC exibiu duas regiões com bandas características, em torno de 3334  $\text{cm}^{-1}$ , referente à hidroxila, bandas em 2970, 2926 e 2902  $\text{cm}^{-1}$  relativas à porção alcano da molécula e em 1027  $\text{cm}^{-1}$ , que indicam a ligação glicosídica entre a galactose e glicose (C-O-C) (LISTIOHADI et al., 2009). Os dados obtidos da matéria-prima LAC permitiram identificá-la como a forma  $\alpha$ -Lactose monohidratada, sendo essa a mais utilizada em diversas formas farmacêuticas, incluindo formulações inalatórias, pelo

fato de apresentar melhor estabilidade, fluxo e fácil produção industrial (DFE PHARMA, 2013; KIRK; DANN; BLATCHFORD, 2007).

Figura 16 - Curvas obtidas por calorimetria exploratória diferencial para os carreadores lactose (LAC),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), respectivas misturas físicas (1:1 m/m) e fármaco brometo de ipratrópio (BI) para análise comparativa.



Fonte: A autora.

As CDs apresentaram espectros FTIR similares, onde denotam-se três regiões características, com bandas largas em aproximadamente  $3300\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de hidroxilas nas CDs e nas moléculas de água. Entre  $2930$  e  $2250\text{ cm}^{-1}$ , bandas relativas a cadeia carbônica. Entre  $1157$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$  bandas de intensidade média a alta ocorrem devido as ligações etéreas e glicosídicas dos oligossacarídeos de glicose (EL-KEMARÝ et al., 2011; XIAO et al., 2014).

A intensidade das bandas no espectro da HP- $\beta$ -CD é reduzida devido à adição de uma cadeia carbônica na molécula de  $\beta$ -CD, que confere um caráter mais hidrofóbico à CD modificada, o que diminui as interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, sendo que a análise experimental é realizada com menor interferência da umidade atmosférica. O fato é confirmado pela diferença de largura nas bandas correspondentes às hidroxilas, sendo que bandas mais largas indicam a participação das hidroxilas em ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Além disso, o fato desta ser uma modificação química da  $\beta$ -CD, acrescida do grupo hidroxipropil, faz com que no espectro uma sutil banda em  $2971\text{ cm}^{-1}$  seja acrescida (BARBOZA et al., 2009).

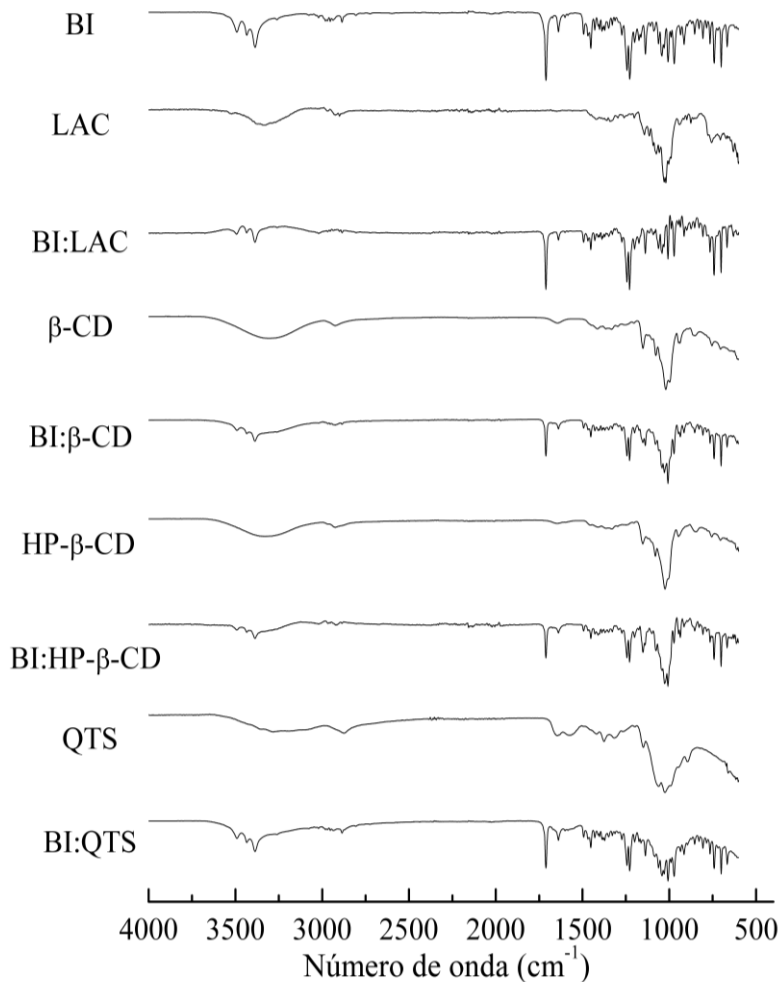
A QTS apresentou bandas características em  $3420\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial do grupo O-H associado a outros grupos polares por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, em  $3300\text{ cm}^{-1}$  decorrente da ligação N-H, em  $1650$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$  correspondente às amidas da molécula, em  $1070$  a  $1030\text{ cm}^{-1}$  pertencente à carbonila e bandas intensas entre  $800$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  devido a presença de anéis piranosídicos (BOGGIONE et al., 2017; QIAO et al., 2017).

A interação no estado sólido foi avaliada inicialmente pelas misturas físicas na proporção 1:1 (m/m) de BI com cada um dos carreadores. A análise térmica e a FTIR demonstram-se como bons preditores de interações fármaco-carreador, por apresentar alta sensibilidade, utilizar pouca quantidade de amostra e se tratarem de técnicas relativamente rápidas.

Na curva DSC da mistura de BI e LAC (Figura 16), foram observados os eventos de desidratação do fármaco e da LAC, em  $108,22$  e  $143,99\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. As mesmas temperaturas foram observadas para as matérias-primas isoladas, sendo indicativo da ausência de interação entre o fármaco e o excipiente. Outro evento endotérmico sem perfil definido a  $177,88\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi observado, sendo em temperatura inferior a fusão de ambas as matérias-primas, provavelmente da caramelização da lactose e solubilização do fármaco na fase líquida. O fato observado indica que a mistura dos compostos

quando submetida a altas temperaturas pode apresentar desconformidades no produto final, por incompatibilidade física.

Figura 17 - Perfis obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para os carreadores lactose (LAC),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e respectivas misturas, em comparação com o fármaco brometo de ipratrópio (BI).



Fonte: A autora.

A curva DSC da mistura entre BI e  $\beta$ -CD (Figura 16) apresenta dois eventos endotérmicos entre 50 e 120 °C, correspondentes a desidratação da CD em questão e do fármaco, respectivamente. Outros eventos endotérmicos foram observados em 221,41 °C e a partir de aproximadamente 248 °C, correspondentes a fusão do BI, seguidos de decomposição da mistura.

Diferentemente a mistura BI:HP- $\beta$ -CD apresentou apenas um evento endotérmico em 108,85°C, decorrente da desidratação da amostra, seguida de estabilização da linha de base até 233,78 °C, onde foi observado um evento endotérmico, correspondente a decomposição do material.

Em ambas as curvas DSC das CDs não foi possível observar evento de fusão do BI característico, além disso, ocorreram deslocamentos da temperatura de fusão do fármaco isolado, sendo um indício de interação. No caso da mistura com  $\beta$ -CD, o fármaco pode ter interagido de formas e intensidades distintas, originando dois eventos endotérmicos.

No caso das CDs, a detecção de interações pode indicar a inclusão do fármaco na cavidade hidrofóbica da CD. Para fármacos lipossolúveis esse tipo de interação possibilita maior proporção de fármaco solubilizado no meio. Em contraste, para fármacos hidrossolúveis inclusão na cavidade prolongaria o tempo de liberação do fármaco, caracterizando uma liberação prolongada.

A mistura entre BI e QTS (Figura 16), apresentou perfil semelhante ao BI isolado, com um evento endotérmico próximo dos 100 °C, fusão em 235,73 °C, seguido de decomposição, que possivelmente sobrepôs o evento exotérmico observado na curva DSC da QTS. O perfil do evento de fusão do fármaco, quando em mistura, foi alterado, porém com essa técnica não foi possível afirmar interações entre os compostos.

A respeito da análise por FTIR das misturas físicas (Figura 17), na mistura que continha LAC houve predominância do espectro do BI, que quando isolado apresentava bandas mais intensas. De maneira geral, quando em mistura houve diminuição na intensidade das bandas de ambos os compostos, porém sem deslocamento significativo, sendo as principais bandas do BI identificadas no espectro da mistura, sobrepondo em alguns casos bandas da LAC. Portanto, não foram identificadas interações entre as matérias primas BI e LAC por meio da técnica de FTIR.

No espectro FTIR da mistura entre BI e  $\beta$ -CD (Figura 17) foi observado alargamentos das bandas na região de 3300, devido ao



característico perfil de estiramento da hidroxila, presente no espectro do  $\beta$ -CD, podendo também ser um indicativo de interação intermolecular. Deslocamentos não significativos foram observados, bandas de ambos compostos foram observadas no espectro.

Para a mistura entre BI e HP- $\beta$ -CD foi obtido um espectro com deslocamentos não significativos, com a presença de bandas de ambos compostos.

Ao comparar os espectros das misturas de BI com  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD, há distinção de intensidade nas bandas relativas ao grupo éster do BI, sendo de maior intensidade na mistura com HP- $\beta$ -CD. Esse indicativo de ligação foi investigado por outras metodologias, apresentadas nas próximas seções do trabalho. De maneira geral, nas duas misturas de BI com CDs, as bandas intensas do BI são capazes de prevalecer no espectro.

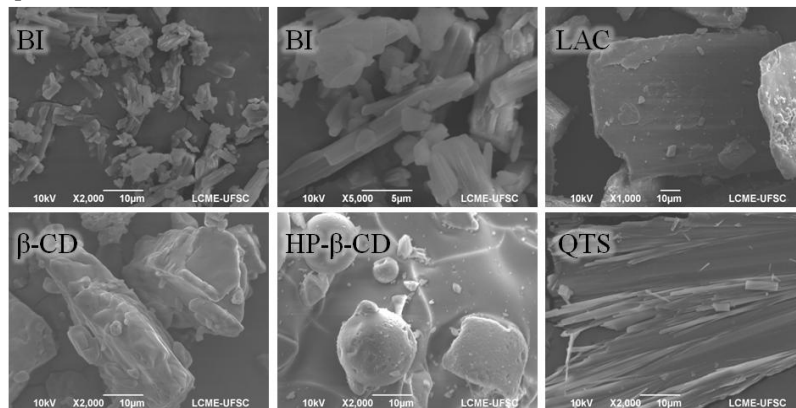
O espectro da mistura física entre BI e QTS (Figura 17) apresentou diminuição na intensidade das bandas características de ambos compostos, sendo que as bandas agudas do BI se sobressaem no espectro, porém, não é possível observar a formação de novas bandas.

A análise das misturas físicas por meio da técnica de FTIR não permitiu identificar interações entre BI e os carreadores, onde as bandas características do BI ocorrem em deslocamentos similares às bandas características dos carreadores. Além disso, a experimentação é realizada com as misturas físicas sem a influência de fatores como a temperatura e a presença de solvente, que são capazes de acelerar e desencadear reações entre os compostos.

As imagens obtidas por MEV das matérias primas estão apresentadas na Figura 10. A análise microscópica do BI (Figura 18) revelou uma superfície lisa e grânulos irregulares de pequeno tamanho com distribuição de tamanho variado, o mesmo padrão microscópico observado por diversos autores (CORRIGAN; CORRIGAN; HEALY, 2006; KIM; SHING, 2008; VINJAMURI; HAWARE; STAGNER, 2016).

A LAC apresentou uma superfície com leves irregularidades, tamanho de grânulos não uniformes e maiores quando comparados ao BI. Nas CDs foram identificados padrões distintos, sendo para  $\beta$ -CD grânulos irregulares de pequenos tamanhos, para HP- $\beta$ -CD o formato dos grânulos esteve entre quadrados com bordas arredondadas e esferas com superfície levemente porosa. A QTS exibiu superfície lisa e formato de agulhas aglomeradas.

Figura 18 - Fotomicrografias das matérias primas utilizadas. Sob aumentos de 2000x e 5000x para brometo de ipratrópio (BI), 1000x para lactose (LAC), 2000x para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e quitosana (QTS).



Fonte: A autora.

Outro parâmetro utilizado para avaliar a interação entre os compostos foi o método de Flory-Huggins. Para os cálculos foram utilizados os valores apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis utilizadas no cálculo do parâmetro de solubilidade de Flory-Huggins.

Matéria-prima	Densidade* (g/cm <sup>3</sup> )	Massa molar (g/mol)	Volume molecular (cm <sup>3</sup> /mol)
BI	1,41	412,37	292,67
$\beta$ -CD	1,46	1134,98	779,63
HP- $\beta$ -CD	1,28	1541,55	1191,12
QTS	1,53	143932,26	93317,06

\*Determinada experimentalmente por picnometria a gás.

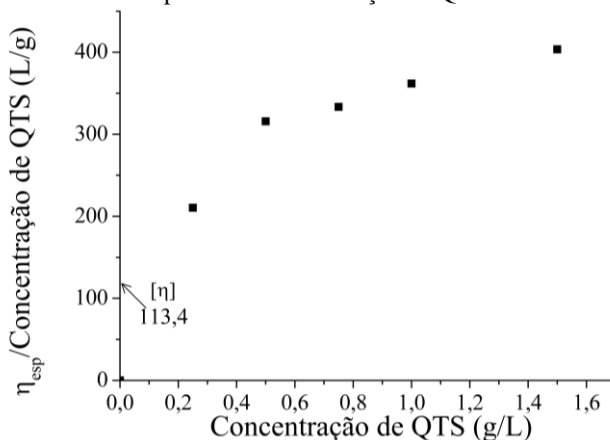
Fonte: A autora.

A entalpia de fusão do BI foi calculada pelo *software*, sendo essa igual a -46935,73 J/mol. A densidade realizada experimentalmente por picnometria em gás hélio permitiu a utilização de valores mais fidedignos nos cálculos.

As massas molares do BI,  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD podem ser facilmente calculadas e encontradas em diversas literaturas, visto que apresentam estrutura química fixa. Entretanto, para a QTS que é um polímero natural, a massa molar deve ser obtida experimentalmente.

Para isso foram preparadas soluções nas concentrações de 0 a 1,5 g/L, das quais foi mensurada a viscosidade em viscosímetro de Brookfield, determinada a viscosidade específica ( $\eta_{\text{esp}}$ ), seguindo a Equação 3 (item 3.3), os dados foram utilizados para construir uma curva (Figura 19), onde o eixo X representa a concentração de QTS e o eixo Y, a razão entre  $\eta_{\text{esp}}$  e concentração da QTS.

Figura 19 - Relação entre viscosidade específica e concentração quitosana, onde o eixo X é composto pelas concentrações de quitosana (QTS) e o eixo Y, pela razão entre viscosidade específica e concentração de QTS.



Fonte: A autora.

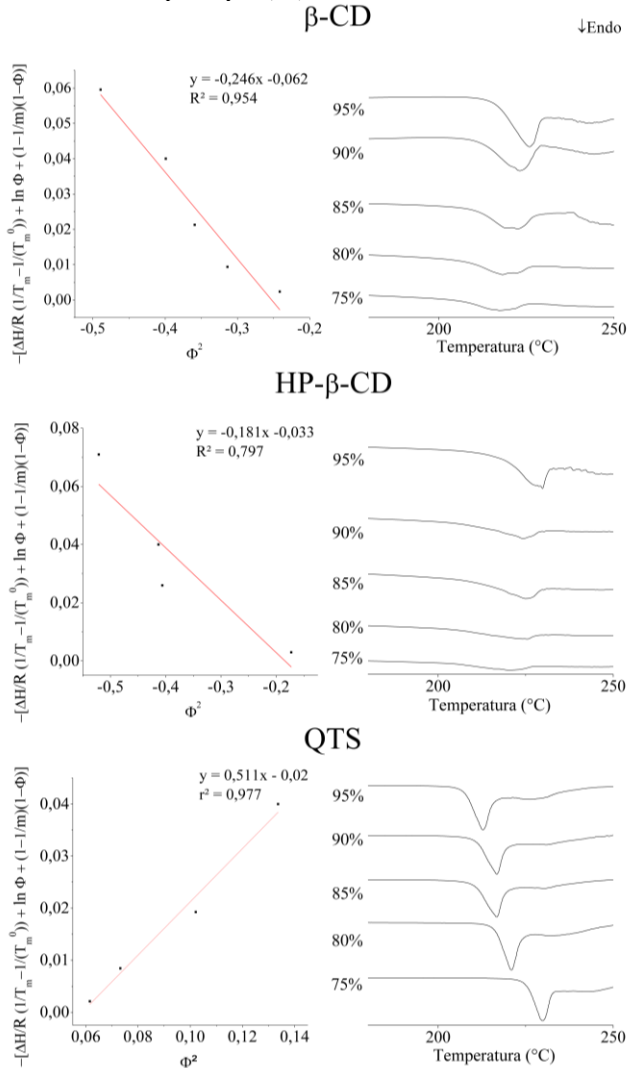
A partir da curva foi determinada viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , a qual é representada pela intersecção do eixo Y. Utilizando o valor de  $[\eta]$  obtido e considerando  $\alpha$  e  $K$  constantes, sendo iguais a 0,93 e  $1,81 \times 10^{-3}$ , respectivamente, foi calculada a massa molar viscosimétrica média da QTS utilizada, sendo igual a 143932,26 g/mol.

O volume molecular de todos os compostos foi calculado utilizando os dados de massa molar e densidade.

As curvas resultantes dos cálculos do estudo de interação aplicando a teoria de Flory-Huggins e curvas DSC estão demonstradas na Figura 20.

A teoria de Flory-Huggins não foi aplicada na mistura entre BI e LAC, devido ao carreador apresentar ponto de fusão menor do que o fármaco, seguido de degradação, impossibilitando a visualização do ponto de fusão do fármaco.

Figura 20 - Curvas resultantes do estudo de interação aplicando a teoria de Flory-Huggins e curvas de calorimetria exploratória diferencial das misturas fármaco:carreador em diferentes proporções, onde a porcentagem indicada é referente ao brometo de ipratrópio (BI).



Fonte: A autora.

O parâmetro de interação, representado por  $\chi$ , foi empregado com o intuito de fornecer valores numéricos às interações em misturas de

carreadores e fármaco. Basicamente a teoria de Flory-Huggins é interpretada indicando baixa miscibilidade quando valores de  $\chi$  são positivos e alta miscibilidade com valores negativos. Os valores de parâmetro de solubidade obtidos foram de  $-3,86$  para  $\beta$ -CD,  $-5,35$  para HP- $\beta$ -CD e  $1,9$  mPa para QTS, apontando ótima miscibilidade entre BI e as CDs, ou seja, a interação carreador- fármaco é mais favorecida que as interações fármaco-fármaco e carreador-polímero nesses sistemas.

Ainda que a mistura de BI e QTS apresente valor de  $\chi$  indicativo de baixa miscibilidade, esse é considerado baixo em relação a outros sistemas encontrados na literatura, tal fato se deve ao volume molecular ocupado pelos compostos, que é dependente da massa molar. Como a massa molar determinada para a QTS é extremamente alta, comparada aos outros carreadores, o parâmetro de solubilidade gerado indica que uma pequena proporção de moléculas QTS é capaz de ser solubilizada quando em mistura com moléculas de BI. Termodinamicamente, isso pode ser explicado pelo fato da aleatoriedade do sistema aumentar, devido às inúmeras configurações, o que faz a entropia da mistura aumentar significativamente (ICOZ; KOKINI, 2007).

Nas curvas de DSC (Figura 20) das misturas em proporções geométricas, foi possível observar o deslocamento dos eventos de fusão, a diminuição da variação de entalpia e na característica do ponto de fusão do fármaco, isso ocorre pela presença das CDs e da QTS no sistema, sendo que a medida que a proporção de carreador aumenta as diferenças são mais facilmente identificadas.

Ainda na maior proporção de carreador utilizada nessa metodologia (25%), não foram observados perfis iguais aos que foram obtidos nas misturas físicas na proporção 1:1 (Figura 16), em atenção à importância da estequiometria para que ocorram as interações, sendo nas CDs, possível inclusão do fármaco na cavidade hidrofóbica.

Marsac e colaboradores (2009) destacam que em sistemas farmacêuticos a teoria de Flory-Huggins pode ser aplicada a misturas em que o polímero apresente transição vítrea menor que o ponto de fusão do fármaco, sendo assim aplicável a todos os sistemas fármaco-carreador avaliados (MARSAC; LI; TAYLOR, 2009).

Embora não sejam consideradas as interações intermoleculares, os resultados demonstraram que os carreadores apresentam alto potencial de interação com o fármaco, o que no caso das CDs é de extrema relevância.

## 4.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES

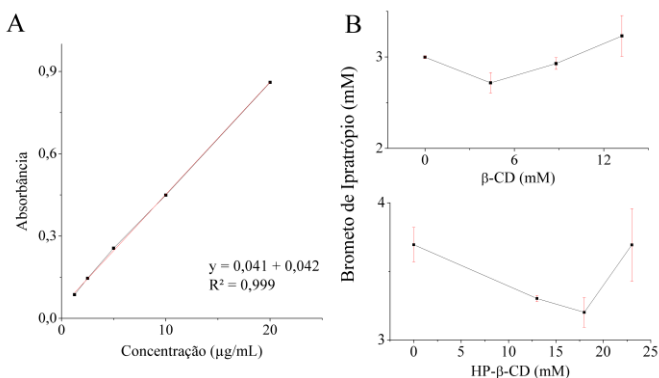
O estudo de solubilidade de fases foi realizado para avaliar a formação de complexos de inclusão do fármaco com as CDs. Como as CDs tendem a aumentar a solubilidade da molécula hospedeira, é realizado o monitoramento da solubilidade da molécula hospedeira, no caso o BI, em soluções com concentrações crescentes de CDs (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Sendo assim, o método aplicado aos demais carreadores, sobre os quais não se tem informações de alteração na solubilidade, pode gerar resultados de difícil e falha interpretação.

A curva de calibração obtida por espectrofotometria UV a 208 nm está demonstrada na Figura 21A, ( $r^2 = 0,999$ , Equação da reta:  $y = 0,041x + 0,042$ ), foi composta por cinco pontos entre 1,25 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , utilizada para calcular a concentração das amostras no estudo de solubilidade de fase. A presença das CDs não interferiu na quantificação do fármaco.

A interação do BI com as CDs ocorreu de forma semelhante (Figura 21B), visto que a formação de um platô nas representações gráficas impossibilitou a realização dos cálculos comumente utilizados para determinação da estequiometria e constante de estabilidade aparente. Não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as concentrações de BI dissolvidas após 24 h.

Figura 21 - A: Curva de Calibração do BI, obtida no espectrofotômetro na região do ultravioleta. B: Diagrama de solubilidade de fases obtidos na interação de brometo de ipratrópio (BI) com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD).



Fonte: A autora.

O fato de se tratar de um fármaco hidrofílico, com poucos e divergentes dados de solubilidade na literatura dificulta a adição de excesso de fármaco. Em teste realizado, foi constatado que seriam necessários mais de 25 mg/mL para obter uma suspensão de BI.

### 4.3 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular, um dos ramos da modelagem molecular, é aplicada com o objetivo de prever ligações não-covalentes entre moléculas. Os carreadores foram considerados na análise como receptores e o fármaco como ligante.

A docagem realizada originou nove configurações moleculares, cada uma com seu respectivo nível de afinidade e a raiz do desvio quadrático médio (*root mean square deviation* (RMSD)) da configuração 1, os dados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da docagem molecular para os sistemas receptores/ligante.

Carreador/ Receptor	Configuração	Afinidade (kcal/mol)	RMSD da configuração 1 (A)	
			(ub)	(lb)
LAC	1	-2.3	0	0
	2	-2.2	2,921	6,948
	3	-2.2	2,088	3,005
	4	-2.1	2,124	3,647
	5	-2.0	2,829	3,815
	6	-2.0	9,055	11,027
	7	-2.0	2,873	6,955
	8	-1.9	1,718	2,63
	9	-1.9	2,798	6,723
β-CD	1	-5.5	0	0
	2	-5.4	0,991	1,704
	3	-5.3	2,509	5,303
	4	-5.2	2,312	3,981
	5	-5.1	2,319	3,776
	6	-5.0	1,482	2,504
	7	-5.0	3,127	5,95

	8	-5.0	2,967	5,646
	9	-4.9	1,989	2,928
	1	-4.5	0	0
	2	-4.4	3,507	6,861
	3	-4.4	3,213	5,246
HP- $\beta$ -CD	4	-4.4	2,519	6,091
	5	-4.4	1,682	2,335
	6	-4.4	2,608	6,405
	7	-4.3	2,295	6,625
	8	-4.3	2,33	6,338
	9	-4.3	2,719	6,446
	1	-4.1	0	0
	2	-3.9	3,021	7,788
	3	-3.8	2,816	7,647
QTS	4	-3.8	2,806	6,755
	5	-3.8	3,091	4,195
	6	-3.7	9,423	12,199
	7	-3.7	2,577	6,614
	8	-3.7	3,571	5,599
	9	-3.6	12,317	16,265
	1	-3.9	0	0
	2	-3.8	2,197	3,462
	3	-3.7	2,787	5,582
	4	-3.7	1,185	2,405
$\alpha$ -CD	5	-3.6	2,814	3,739
	6	-3.6	3,183	4,941
	7	-3.5	1,683	2,764
	8	-3.5	3,014	6,221
	9	-3.5	3,023	5,329
	1	-5.2	0	0
	2	-5.2	3,331	5,305
	3	-5.1	3,604	5,739



γ-CD	4	-5.1	2,507	6,393
	5	-5.0	2,397	6,602
	6	-4.9	3,23	5,48
	7	-4.9	2,513	6,451
	8	-4.8	2,709	6,348
	9	-4.7	2,117	6,209

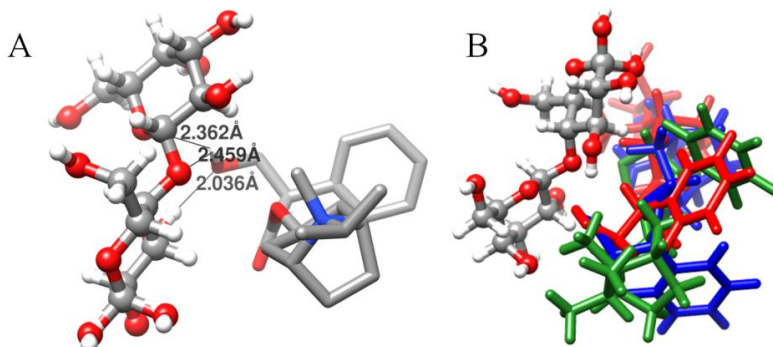
Fonte: A autora.

O parâmetro RMSD indica o alinhamento da estrutura do BI em cada configuração, sendo a configuração 1 utilizada como comparativo, ub relacionada a ligação mais distante acima e lba ligação mais distante abaixo. Assim, as diferenças observadas na Tabela 6 permitiram analisar em cada um dos sistemas se o grau de afinidade está relacionado com configurações semelhantes.

Os valores de afinidade ou magnitude de interação mostram quão facilitada e estável é a interação receptor/ligante, de acordo com a configuração correspondente. Tendo em vista que reações espontâneas apresentam valores de energia negativos, configurações mais estáveis são àquelas de menor valor.

No sistema LAC/BI a configuração mais estável apresentou afinidade de -2,3 kcal/mol, enquanto a menos estável -1,9 kcal/mol, demonstrando pouca diferença entre si. Com relação às configurações, houve pouca diferença entre os valores de RMSD.

Figura 22 - A: configuração mais estável do sistema LAC/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema LAC/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por *ball/stick* e fármaco *stick*.

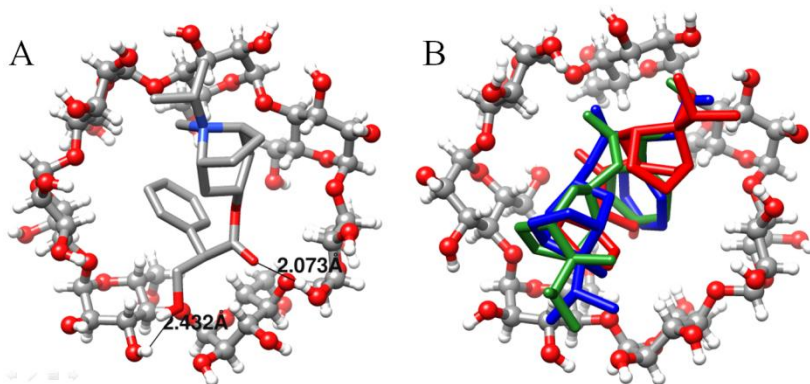


Fonte: A autora.

Realizada a análise de pós-*docking* (Figura 22), foram observadas três ligações de hidrogênio para configuração 1, ainda assim não há diferença de RMSD entre as configurações 1, 2 e 3 foi de apenas 0,1 kcal/mol, sugerindo que nesse sistema as ligações de hidrogênio não o tornam significativamente estável.

O sistema  $\beta$ -CD/BI demonstrou alta estabilidade de ligação para todas as configurações, de -4,9 a -5,5 kcal/mol, sendo dentre os estudados o mais estável com diferença notável do menos estável, LAC/BI. De acordo com os valores de RMSD para o sistema, não houve discrepância entre as configurações, ainda que o intervalo de energia entre as configurações tenha sido o maior.

Figura 23 - A: configuração mais estável do sistema  $\beta$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema  $\beta$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por *ball/stick* e fármaco *stick*.



Fonte: A autora.

As imagens de pós-*docking* estão demonstradas na Figura 23, onde foram detectadas duas ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio de BI e o hidrogênio do anel interior da  $\beta$ -CD para a configuração 1, a mais estável. Para configuração 2 foram detectadas duas ligações de hidrogênio e apenas uma para configuração 3.

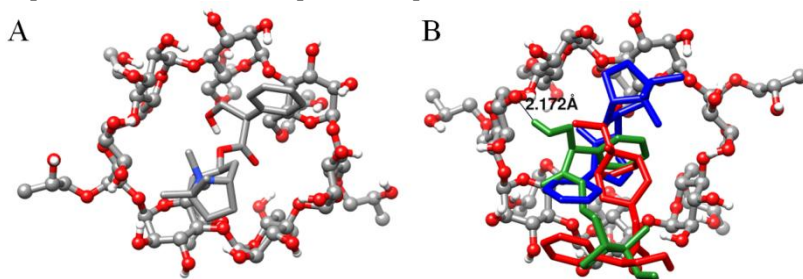
Considerando a estereoquímica do sistema, sugere-se que a estabilização do sistema é majoritariamente exercida pelo efeito gaiola, ou seja, pela inclusão do BI na cavidade da  $\beta$ -CD. A docagem molecular também indicou que ocorre a inclusão do BI pela  $\beta$ -CD, sustentando a hipótese.

A magnitude de interação para o sistema HP- $\beta$ -CD/BI foi de -4,3 a -4,5 kcal/mol, dentre os sistemas foi o que obteve menor intervalo de energia e com diferença de configuração também baixa, pela análise dos valores de RMSD.

No pós-*docking* (Figura 24) foi possível observar que das três mais estáveis, apenas a configuração 2 apresentou ligação de hidrogênio, sendo que essa não favoreceu para que a configuração 2 fosse a mais estável. Foi observada pequena diferença de afinidade entre as configurações 1 e 2, nenhuma diferença entre as configurações 2, 3, 4, 5 e 6.

Ao comparar as configurações mais estáveis do sistema  $\beta$ -CD/BI com o HP- $\beta$ -CD/BI, o ligante não apresenta configurações semelhantes, sugerindo que o grupamento hidroxipropil fornece certa repulsão entre as moléculas, gerando menor magnitude de afinidade ao sistema HP- $\beta$ -CD/BI.

Figura 24 - A: configuração mais estável do sistema HP- $\beta$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema HP- $\beta$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por *ball/stick* e fármaco *stick*.



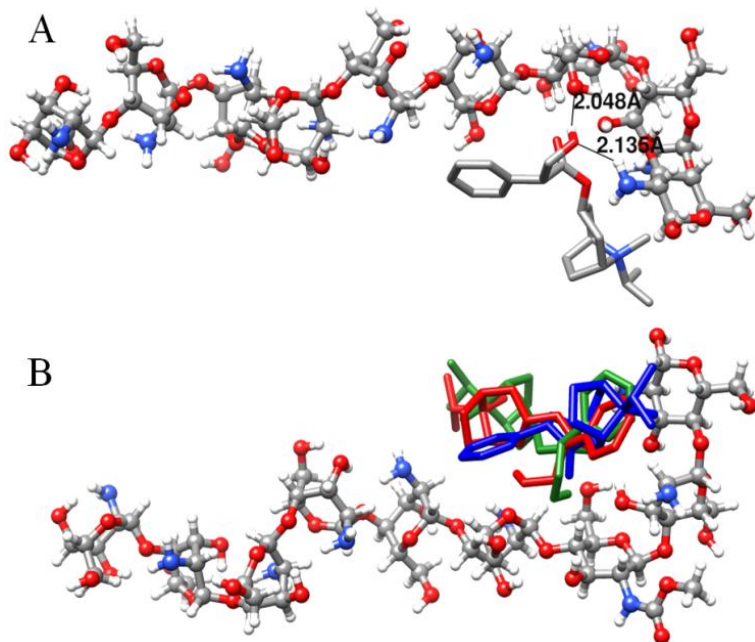
Fonte: A autora.

O sistema QTS/BI apresentou afinidade entre -3,6 e -4,1 kcal/mol, com intervalo entre as afinidades de 0,5 kcal/mol, inferior apenas ao sistema  $\beta$ -CD/BI. Os valores de RMSD indicam que as configurações são diferentes entre si, o que não foi observado para os demais sistemas.

Como pode ser observado na Figura 25, a análise de pós-*docking* revelou não haver ligações de hidrogênio em nenhuma das três configurações mais estáveis. Os dados sugerem que nesse sistema o fármaco apresenta uma flexibilidade maior, possivelmente por não haver

ligações de hidrogênio em nenhuma configuração e pela estereoquímica da molécula de QTS não aprisionar o BI, como ocorre nas CDs.

Figura 25 - A: configuração mais estável do sistema QTS/BI, B: representação das três configurações mais estáveis. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por *ball/stick* e fármaco *stick*.



Fonte: A autora.

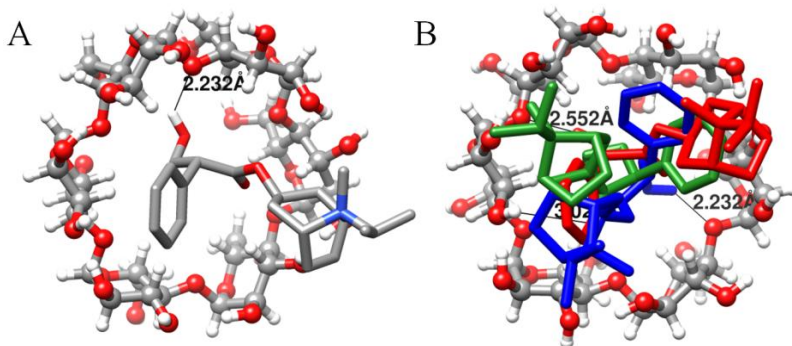
Em suplementação aos resultados, a docagem molecular também foi realizada com as CDs  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) como receptores.

A afinidade do sistema  $\alpha$ -CD/BI esteve entre -3,5 e -3,9 kcal/mol, sendo a menos estável entre as CDs, dentre todos os sistemas é apenas mais estável do que o sistema LAC/BI. Não houveram alterações bruscas de configuração, o que pode ser observado pelos valores de RMSD, na Tabela 6.

O pós-*docking* (Figura 26) evidenciou a presença de três ligações de hidrogênio, uma na configuração 1, entre o hidrogênio do grupo hidroxila do BI e um oxigênio cíclico da  $\alpha$ -CD. As outras duas ligações foram observadas para a configuração 3. As ligações de hidrogênio não

foram capazes de tornar o complexo estável como as demais CDs, isso devido ao tamanho da cavidade hidrofóbica não alojar o BI efetivamente.

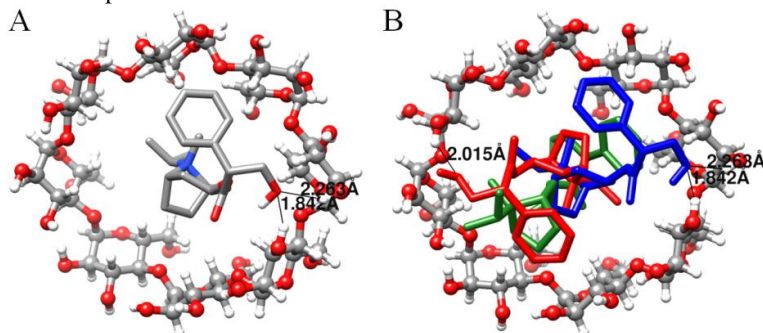
Figura 26 - A: configuração mais estável do sistema  $\alpha$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema  $\alpha$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por *ball/stick* e fármaco *stick*.



Fonte: A autora.

Para o sistema  $\gamma$ -CD/BI a afinidade esteve entre -4,7 e -5,2 kcal/mol (Tabela 6), sendo o segundo sistema mais estável, com pequeno intervalo de magnitude. A análise dos dados de RMSD indica pouca diferença entre as configurações.

Figura 27 - A: configuração mais estável do sistema  $\gamma$ -CD/BI, B: representação das três configurações mais estáveis do sistema  $\gamma$ -CD/BI. No qual as cores, azul, verde e vermelho indicam as configurações 1, 2 e 3, respectivamente. Carreador apresentado por *ball/stick* e fármaco *stick*.



Fonte: A autora.

O pós-*docking* desse sistema (Figura 27) mostra duas ligações de hidrogênio para configuração 1, as quais ocorrem na mesma região da molécula, entre o oxigênio da hidroxila do BI e hidrogênios de hidroxilas da molécula de  $\gamma$ -CD. Para configuração 3 também foi identificada uma ligação de hidrogênio em posição equivalente à configuração 1.

A diferença básica entre  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD é o número de unidades de glicose com que é formada, sendo seis, sete e oito, respectivamente. O número de unidades de glicose é proporcional ao volume da cavidade hidrofóbica, algo que foi influenciado diretamente nos resultados obtidos.

A  $\alpha$ -CD, de cavidade hidrofóbica menor, não foi capaz de alojar efetivamente o fármaco, enquanto a  $\gamma$ -CD, possuindo a cavidade de maior volume, alojou BI de forma eficaz, porém com distância intermolecular maior do que no sistema  $\beta$ -CD/BI. O volume da cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD se mostrou ideal para alojar o BI com distância intermolecular pequena, tornando esse o sistema mais estável.

Deve-se salientar que a análise de docagem molecular é investigativa, não inclui efeitos entrópicos, relacionados ao solvente, temperatura e pressão. Todavia, os resultados são bases confiáveis e precisas para análises moleculares posteriores e na ausência de dados experimentais, suficientemente válidos na tomada de decisões.

O parâmetro de solubilidade obtido por Flory-Huggins indicou que a QTS apresenta maior interação com o BI, seguida pela HP- $\beta$ -CD e por fim a  $\beta$ -CD, diferentemente da docagem molecular. Os métodos analisam de formas diferentes, a teoria de Flory-Huggins considera fatores físico-químicos como volume e ponto de fusão do fármaco, enquanto a docagem molecular realizada é focada na estereoquímica das moléculas, por isso os resultados não apresentam a mesma ordem de interação.

Considerando os resultados de análise de mistura de fármaco e carreadores, parâmetro de solubilidade por Flory-Huggins e docagem molecular, foram excluídos do estudo a LAC,  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD. As CDs foram excluídas devido à análise de *docking* indicar menor afinidade nos sistemas. Os carreadores  $\beta$ -CD e QTS foram selecionados devido a apresentarem ótimos resultados em todas as metodologias aplicadas. A HP- $\beta$ -CD foi selecionada por ser análoga a  $\beta$ -CD, podendo assim ser estudado o impacto do grupo hidroxipropil da fase farmacotécnica até a liberação do fármaco.

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Escassa literatura referente a formulações contendo os carreadores para aplicação pulmonar foi encontrada, da qual não há trabalhos contendo os carreadores selecionados e BI. Pela falta de dados foi realizado um delineamento de experimentos para selecionar as melhores condições de produção para incorporação do fármaco.

Como as variáveis a serem avaliadas já eram conhecidas, recorreu-se a MSR. Singh e Mooter (2016) descreveram variáveis que influenciam na formação e secagem das partículas por SD, dessas a concentração da solução de secagem, a composição da amostra, a aspiração e a temperatura de entrada são as de maior impacto na formação de partículas pequenas (SINGH; MOOTER, 2016).

As respostas obtidas para as formulações obtidas estão demonstradas na Tabela 7, os modelos de respostas apresentaram-se estatisticamente relevantes. Para tamanho de partícula  $p < 0,05$ , correlação de  $r^2$  igual a 0,73 e  $r^2$  ajustado de 0,41. O modelo de resposta para rendimento apresentou  $p < 0,0005$ , correlação  $r^2$  de 0,98 e  $r^2$  ajustado de 0,96.

Na Tabela 7 estão apresentadas as respostas obtidas para o delineamento experimental. As formulações sem adição do fármaco estão organizadas de forma aleatória, a letra “Q” indica as amostras contendo QTS, “B” as compostas por  $\beta$ -CD e “H” as que contem HP- $\beta$ -CD, a letra “R” representa as formulações feitas em replicata, a numeração identifica cada uma das distintas formulações.

Tabela 7 - Respostas obtidas para o delineamento experimental das formulações sem a incorporação do fármaco.

	Rendimento (%)	Tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Desvio padrão ( $\mu\text{m}$ )
Q2	56,73	4,12	2,99
B1	49,34	3,06	1,39
Q5	50,74	3,75	1,68
Q9	31,28	4,19	1,76
H5	78,62	3,53	1,49
B2	47,93	4,54	2,11
Q1	44,28	2,46	1,62
Q7	58,81	4,65	1,80
H3	68,84	3,75	1,65
H6	62,40	2,91	1,47
B3	52,04	2,23	1,10
B4	47,31	2,69	1,55
B5	55,72	2,73	1,63

H7	71,12	2,73	1,36
Q3	55,34	3,08	1,77
B1	55,72	2,73	1,63
H2	70,19	3,37	1,33
H4	71,91	3,18	1,55
Q8	55,34	3,59	1,17
RH1	78,62	3,53	1,49
H8	50,00	3,40	1,45
Q6	50,57	4,39	2,13
H1	65,53	3,87	1,71
RH2	50,00	3,40	1,45
RQ1	50,57	4,39	2,13
B6	57,65	2,70	1,38
B7	53,07	2,13	1,02
Q4	42,24	3,67	2,16
B8	50,12	2,98	1,96
RH3	71,91	3,18	1,55
B0	63,39	2,34	1,28
H0	50,00	2,44	1,67
Q0	68,03	2,72	2,34

Fonte: A autora.

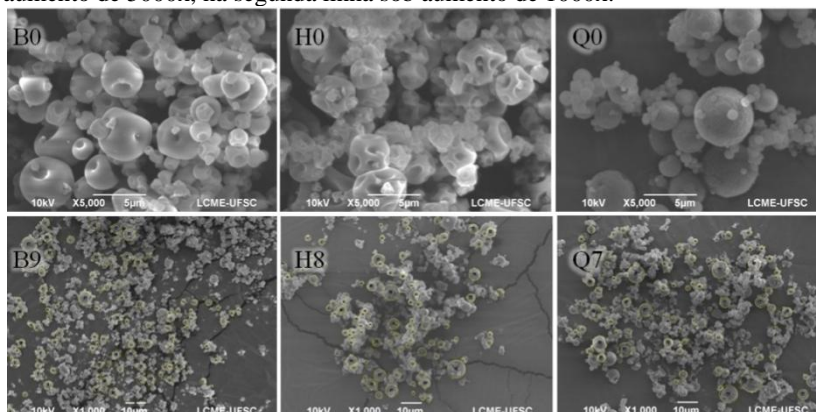
Como respostas foram avaliados o rendimento e tamanho de partícula, os quais são dependentes do processo de secagem e escolha dos parâmetros. Sendo que, o rendimento é um fator importante no escalonamento da produção das formulações e, o tamanho de partícula e os desvios padrões (DP) são imprescindíveis para a esse tipo de forma farmacêutica. No apêndice B estão apresentadas variáveis de produção e respostas obtidas para cada uma das formulações ausentes de BI.

Na Figura 28 estão apresentadas algumas das imagens obtidas por MEV. No aumento de 5000x é possível analisar a morfologia detalhada das partículas, enquanto que no aumento de 1000x nota-se a distribuição populacional das partículas, sendo esse aumento utilizado na mensuração do tamanho de partícula.

Durante a análise do tamanho de partícula por imagens de MEV, por meio do *software* ImageJ 1.52a, as partículas são limitadas por uma linha e numeradas no centro, facilitando o levantamento, sendo que essas delimitações são observadas nas imagens MEV da Figura 28, no aumento de 1000x.



Figura 28 - Fotomicrografias das formulações obtidas por *spray-drying* sem a incorporação de fármaco. Na primeira linha as imagens encontram-se no aumento de 5000x, na segunda linha sob aumento de 1000x.



Fonte: A autora.

As formulações contendo CDs apresentaram morfologias similares, partículas com aspecto esférico e com poros. As formulações elaboradas com QTS, em geral, apresentaram-se esféricas com poros quando em temperatura de secagem mais baixa e esféricas rugosas quando a secagem ocorreu sob temperaturas mais altas.

Quanto à distribuição das partículas, as formulações contendo CDs exibiram maior homogeneidade quando comparada com as formulações de QTS.

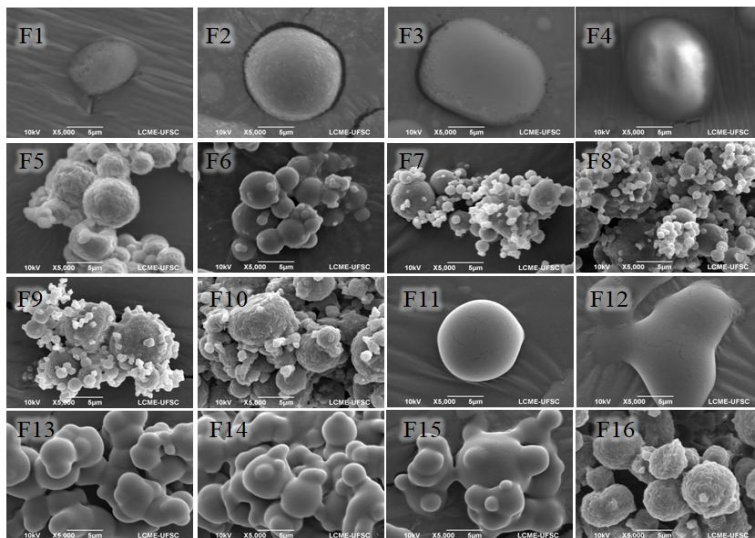
O rendimento da maioria das formulações foi considerado adequado, estando entre 47,31 e 63,93 % para formulações produzidas com  $\beta$ -CD, entre 50 e 78,62 % para HP- $\beta$ -CD e entre 31,28 e 68,03 % para QTS.

Quanto aos tamanhos de partícula, as formulações contendo  $\beta$ -CD apresentaram menor tamanho, com média de 2,81  $\mu\text{m}$ , em seguida as formulações de HP- $\beta$ -CD, com média de 3,26  $\mu\text{m}$  e, por fim, as formulações contendo QTS, onde a média foi de 3,68  $\mu\text{m}$ . Todas as formulações apresentaram-se adequadas, considerando que a incorporação do fármaco tende a aumentar o tamanho de partícula.

Realizada a otimização dos modelos, foi selecionado o critério de tamanho de partícula, no intervalo de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , para obter as condições de produção das formulações contendo BI. Foram produzidas nove formulações, três compostas por  $\beta$ -CD, duas por HP- $\beta$ -CD e quatro por QTS, utilizando distintas condições de produção e concentração de

carreador e BI, como descrito no item 3.6, as imagens obtidas estão demonstradas na Figura 29.

Figura 29 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações contendo BI.



Fonte: A autora.

Ao incorporar o BI nas formulações ocorreu uma interferência na metodologia de análise do tamanho de partícula, uma vez que a tensão aceleradora exercida no preparo das análises de MEV deformou as partículas. Nas imagens (Figura 29) não foi possível delimitar as partículas e proceder com a mensuração dos tamanhos de partícula. Isso foi observado para as formulações contendo CDs produzidas sob temperaturas mais baixas.

O mesmo efeito foi observado por Vinjamuri e colaradores (2016), formulações obtidas por SD sem BI, contendo apenas os carreadores, neste caso LAC e leucina, apresentaram morfologia regular e quando incorporado o fármaco não há delimitação entre as partículas (VINJAMURI; HAWARE; STAGNER, 2016). O efeito foi atribuído à dissolução da superfície, seguida de sua recristalização sob condições de vácuo. Outra possibilidade é a alta pressão com que as partículas são submetidas durante o preparo das amostras.

Para as formulações contendo QTS o perfil esférico e rugoso foi mantido, quando comparadas às formulações sem a incorporação do

fármaco (Tabela 8). A ocorrência de poros nas partículas em geral está relacionada com uma boa aerodinâmica e deposição, algo que não pode ser confirmado para as formulações contendo CDs (ARAYNE; SULTANA, 2006).

Como a interferência do preparo das amostras para análise de MEV foi pronunciada nas formulações contendo CDs e produzidas sob temperaturas inferiores, foram produzidas mais seis formulações (F1 a F6), das quais a temperatura de entrada foi mais alta e/ou a proporção de BI e carreador foi alterada, considerando as características de cada formulação.

Além disso, foi adicionada uma nova composição de formulação, contendo  $\beta$ -CD e QTS. Diversos trabalhos na literatura demonstram modificação na liberação de fármaco quando são utilizadas na composição CDs e QTS. Trapani e colaboradores (2010) sugerem que o interior das partículas é formado pelo complexo fármaco-CD e o revestimento é composto por QTS.

Nas imagens de MEV das formulações contendo BI (Figura 29) foi observada menor interferência da técnica em F1 a F6, com relação as formulações produzidas utilizando o delineamento experimental (F7 a F15).

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de rendimento das 16 formulações desenvolvidas. O apêndice C (Tabela 1) reúne as condições de produção e dados rendimento e doseamento de BI obtidos para essas formulações.

As formulações contendo  $\beta$ -CD obtiveram melhor rendimento, de 52,99 a 73,38%, sendo os melhores resultados obtidos a baixa concentração de BI, alta concentração de  $\beta$ -CD e temperatura de 150 °C (F14). A mesma formulação apresentou o melhor doseamento de fármaco, 79,10%, indicando que essas são condições ótimas para produção de partículas com essa composição.

Para as formulações contendo HP- $\beta$ -CD o rendimento não apresentou discrepâncias, estando entre 58,81 e 66,31%, onde melhores resultados foram obtidos com o aumento em temperatura de entrada e baixa concentração de BI e HP- $\beta$ -CD. No doseamento o resultado de melhor desempenho acompanhou o de melhor rendimento de formulação.

Foram observados baixos rendimentos nas amostras compostas por QTS, ao utilizar baixa concentração de carreador e fármaco, aliado a alta temperatura, o rendimento foi de 63,77% e o doseamento igual a 92,25%, ambos mais altos dentre as amostras contendo QTS. Para a

única amostra contendo dois carreadores o rendimento foi de 54,30% e o doseamento igual a 69,05%.

Tabela 8 - Rendimento e doseamento de fármaco das formulações desenvolvidas com BI.

	Rendimento (%)	Doseamento de BI (%)
F1	60,95	63,98
F2	52,99	66,62
F3	59,05	85,67
F4	66,31	90,99
F5	63,77	92,25
F6	54,30	69,05
F7	30,78	79,51
F8	44,24	56,02
F9	14,07	74,38
F10	14,37	66,41
F11	59,50	63,65
F12	65,75	68,72
F13	58,81	62,03
F14	73,38	79,10
F15	61,87	36,38
F16	14,47	100

Fonte: A autora.

Contraopondo resultados de rendimento e doseamento das formulações, notou-se que o doseamento é maior para as formulações contendo CDs, indicando que a inclusão do fármaco preserva-o durante a metodologia de SD. Para as formulações contendo QTS, o equilíbrio entre a concentração de BI e carreador foi diferencial para obter alto rendimento e doseamento.

A presença de dois carreadores com características distintas na formulação F6 gerou rendimento e doseamento médios, quando comparados as demais formulações. Provavelmente o doseamento não foi maior pela baixa concentração de  $\beta$ -CD na formulação, assim parte do BI que não interagiu com a CD foi eliminado durante o processo.

Durante o desenvolvimento por SD da formulação F16, sem carreador, foi observado que as partículas aderem ao equipamento, formando uma película, causando baixíssimo rendimento. A alta

hidrofilicidade aliada a carga positiva presente na amida da molécula de BI pode ter influenciado na incompatibilidade do fármaco com a técnica.

Considerando a técnica de SD e a incompatibilidade do BI frente a esta, o rendimento e doseamento de BI são vantajosos na maioria das formulações, sendo a interação entre o fármaco e os carreadores determinante para os resultados obtidos.

#### 4.5 SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES FINAIS

Na etapa de desenvolvimento das formulações foram obtidas 15 diferentes amostras, das quais foram selecionadas quatro para proceder com os experimentos, diminuindo assim o volume de material utilizado e tempo gasto com cada uma das análises. No apêndice C estão demonstrados os dados de produção das micropartículas e resultados das caracterizações utilizadas para selecionar as formulações mais promissoras.

Os dados de densidade *bulk* e *tapp*, Índice de Carr e relação de Hausner estão demonstrados na Tabela 9.

A densidade *bulk* das partículas esteve entre 0,21 e 0,45 g/cm<sup>3</sup>, enquanto que, a densidade *tapp* entre 0,33 e 0,76 g/cm<sup>3</sup>. A partir desses resultados foram calculados o Índice de Carr e a relação de Hausner, os quais caracterizam os pós quanto suas propriedades de fluxo, a classificação preconizada pela USP (2016), de excelente a extremamente pobre.

A densidade dos pós impacta diretamente no direcionamento inercial e na sedimentação das formulações pulmonares, assim densidades altas estão associadas com partículas que ficam retidas nas áreas superiores do sistema respiratório. Em contrapartida, baixas densidades estão relacionadas com um direcionamento aos pulmões, seguida de sedimentação das partículas.

Tabela 9 - Resultados de densidades *bulk* e *tapp*, índice de Carr, relação de Hausner e respectiva classificação quanto ao fluxo dos pós desenvolvidos.

	$\sigma_{bulk}$ (g/mL)	$\sigma_{tapp}$ (g/mL)	IC	RH	Classificação
F1	0,23	0,37	36,76	1,58	Muito pobre
F2	0,24	0,37	36,51	1,58	Muito pobre
F3	0,34	0,48	28,21	1,39	Pobre
F4	0,29	0,49	40,24	1,67	Extremamente pobre

F5	0,23	0,33	31,34	1,46	Pobre
F6	0,31	0,47	33,33	1,50	Muito pobre
F7	0,45	0,59	23,16	1,30	Aceitável
F8	0,32	0,76	57,48	2,35	Extremamente pobre
F9	0,24	0,47	48,15	1,93	Extremamente pobre
F10	0,21	0,39	46,15	1,86	Extremamente pobre
F11	0,34	0,54	36,07	1,56	Extremamente pobre
F12	0,25	0,43	41,10	1,70	Extremamente pobre
F13	0,31	0,58	47,42	1,90	Extremamente pobre
F14	0,27	0,39	31,94	1,47	Muito pobre
F15	0,25	0,35	29,73	1,42	Pobre
F16	0,31	0,71	56,25	2,29	Extremamente pobre

Fonte: A autora.

Partículas de diâmetros menores que 30  $\mu\text{m}$ , possuem forças de coesão partícula-partícula predominantes, por isso a classificação do fluxo apresenta-se desfavorável, entretanto a adição de insumos não ativos, que melhoram a qualidade do fluxo e podem ser aplicadas por via pulmonar já demonstrou eficácia em diversos trabalhos relacionados à via inalatória (CESCHAN et al., 2016; CESCHAN; BUCALÁ; RAMÍREZ-RIGO, 2015). Portanto, a classificação de fluxo não será utilizada como parâmetro primário de seleção.

O tamanho de partícula mensurado por meio da difração a laser fornece o diâmetro geométrico das partículas da amostra, sendo esse espacial e não planar. Os dados obtidos por meio dessa técnica são o diâmetro médio ( $D_m$ ) e seu desvio padrão (DP), mediana da distribuição ( $D_{50}$ ), diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 10% ( $D_{10}$ ) e 90% ( $D_{90}$ ). O *Span* é calculado utilizando esses dados indica a polidispersão do sistema e o diâmetro aerodinâmico ( $D_{aer}$ ), também calculado, relaciona a densidade *tapp* e  $D_{50}$ . Todos os dados estão apresentados na Tabela 10.

Dentre os dados apresentados o  $D_m$  e o  $D_{aer}$  nos trazem a informação teórica sobre a aerodinâmica da formulação, sendo que valores próximos a 5  $\mu\text{m}$  tendem a ser ideais. Em geral, o  $D_{aer}$  teórico se apresenta menor do que o experimental, este representado pelo diâmetro aerodinâmico mássico médio (DAMM), pois mesmo considerando a densidade *tapp*, não engloba relações de inércia, porosidade das partículas e fluidez (*flowability*) dos pós.

A variável *Span* relaciona a distribuição das partículas a 10, 50 e 90%, assim sendo valores baixos indicam distribuição estreita com baixa variação, como nos resultados obtidos, onde a variação de *Span* foi de 0,96 a 1,33, pelo fato de não haver discrepância nos resultados, essa variável não foi considerada para seleção das formulações finais. Os resultados de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$ , apesar de serem essenciais para avaliação, são utilizados como variável de outras mensurações, não tendo caráter seletor.

Tabela 10 - Dados de tamanho de partícula obtidos para as formulações desenvolvidas.

	Dm ( $\mu\text{m}$ )	DP ( $\mu\text{m}$ )	$D_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i>	Daer ( $\mu\text{m}$ )
F1	6,79	0,40	7,28	3,89	11,34	1,10	5,38
F2	6,97	0,04	7,49	4,02	11,64	1,09	5,39
F3	5,71	0,41	6,24	2,82	10,43	1,33	4,54
F4	5,28	0,01	4,98	2,20	8,68	1,30	5,12
F5	6,15	0,08	6,59	3,55	10,35	1,11	4,68
F6	6,85	0,22	7,27	4,23	11,01	0,99	5,46
F7	7,40	0,39	7,84	4,64	11,73	0,96	6,29
F8	7,15	0,65	7,62	4,44	11,59	1,00	5,45
F9	8,09	0,16	8,69	4,89	13,55	1,07	6,17
F10	8,45	0,57	9,12	4,85	14,53	1,15	6,10
F11	6,13	0,28	6,51	3,56	10,00	1,05	5,42
F12	6,53	0,06	6,97	3,85	10,76	1,06	5,41
F13	5,73	0,22	6,09	3,24	9,49	1,09	4,70
F14	6,13	0,03	6,54	3,48	10,19	1,09	5,39
F15	6,45	0,27	6,87	3,77	10,61	1,06	5,41
F16	12,20	0,71	13,46	6,73	22,51	1,29	10,24

Fonte: A autora.

O fator primário de seleção foi a composição das amostras, assim seria possível analisar as diferenças frente aos ensaios realizados. Isso foi possível devido aos resultados, de maneira geral, por apresentarem-se com valores próximos. Após o agrupamento de acordo com a composição, realizou-se a análise com base no rendimento, doseamento de BI nas formulações (Tabela 8), tamanho médio de partícula e diâmetro aerodinâmico (Tabela 10).

A média do tamanho de partícula e diâmetro aerodinâmico nos trazem a informação teórica de como a formulação vai agir fisicamente no organismo do paciente, sendo que valores próximos a 5  $\mu\text{m}$  tendem a ser ideais. Durante a produção das formulações existe uma porção que não pode ser recuperada, o que leva ao rendimento ser sempre menor

que 100%, isso também tem relação com a recuperação de fármaco no produto final.

As formulações selecionadas para proceder com os demais ensaios foram F4 (BI/HP- $\beta$ -CD), F5 (BI/QTS), F6 (BI/ $\beta$ -CD e QTS) e F14 (BI/ $\beta$ -CD), abrangendo todas as composições utilizadas para o desenvolvimento das formulações, sob condições de produção que propiciaram rendimento, doseamento, aspectos de densidade e tamanho de partícula adequados.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS MICROPARTÍCULAS

As curvas DSC das formulações finais estão demonstradas na Figura 21, nas quais foi observada a semelhança do fenômeno físico de  $T_g$  do BI, evento endotérmico de segunda ordem, ocorrendo entre 40 e 80 °C. Após essa temperatura cada amostra demonstrou um comportamento distinto, devido a composição.

A formulação F4, que contém HP- $\beta$ -CD, apresentou a  $T_g$  em 28,63 °C, caracterizado por uma transição de segunda ordem, caracterizado pela variação da capacidade calorífica, entretanto sem variação de entalpia. O sistema busca restabelecer a linha de base e não foram observados eventos térmicos na faixa de temperatura estudada.

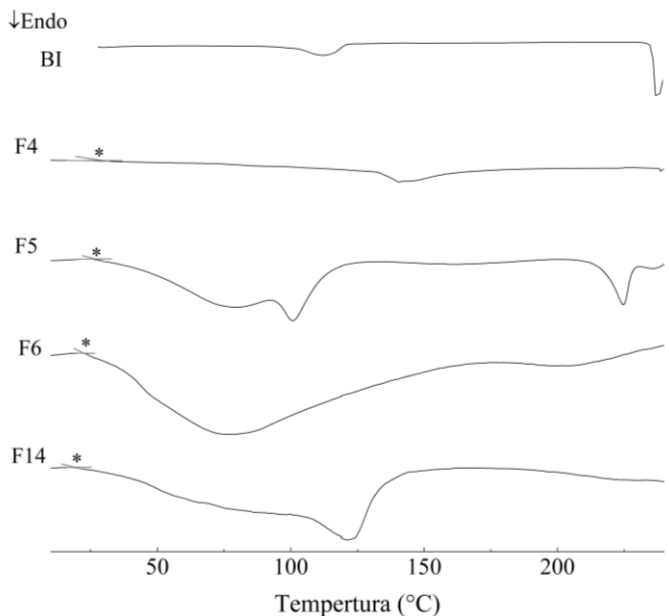
Na curva DSC da formulação F5, composta por BI e QTS, observou-se a  $T_g$  em 26,59 °C, seguido de um evento exotérmico anexo até 127 °C, indicando a possível recristalização do BI, após isso ocorre a estabilização da linha de base e um terceiro evento endotérmico foi observado em 225,02 °C, resultante da fusão do fármaco não ligado fortemente à QTS, indicado pela temperatura inferior ao insumo puro e por um evento pouco agudo.

Apresentando em sua composição QTS,  $\beta$ -CD e BI, a formulação F6 apresentou  $T_g$  com início em 23,19 °C. Após isso, o sistema busca a estabilização da linha de base, sem a ocorrência de eventos na faixa de temperatura de análise.

A curva DSC da formulação F14, a qual contém BI e  $\beta$ -CD, apresentou apenas uma transição, em 23,44 °C, identificado como a  $T_g$  do BI. A provável recristalização do BI ocorre próximo dos 100 °C, em seguida a linha de base é restabelecida, sendo que até o final da análise não foram observados eventos térmicos.



Figura 30 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial do brometo de ipratrópio (BI) e das formulações finais, evidenciado por asterisco o início da  $T_g$ . Sendo que, F4 é composta por BI e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD); F5, por BI e quitosana (QTS); F6, por BI,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e QTS; e F14, por BI e HP- $\beta$ -CD.



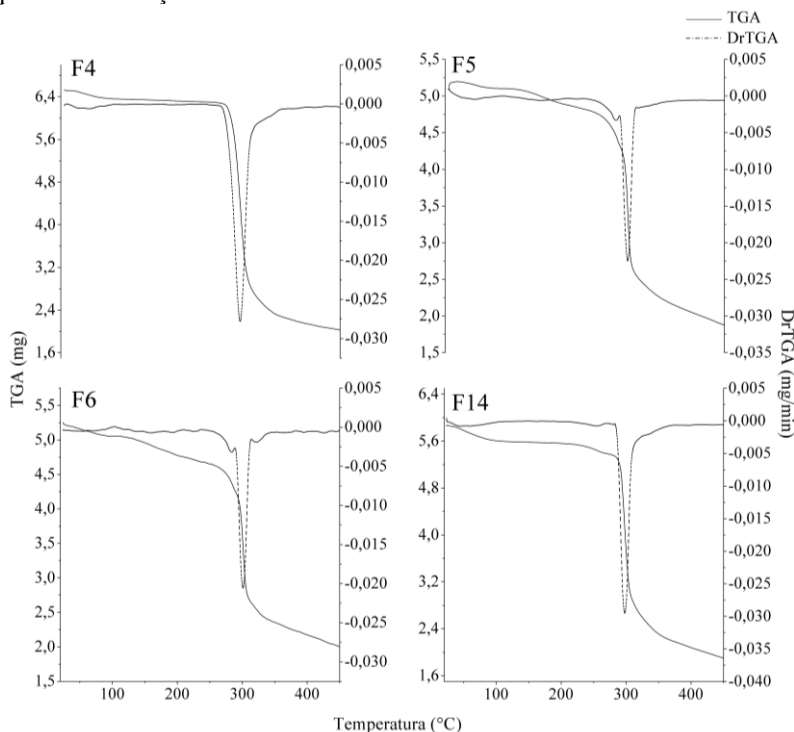
Fonte: A autora.

Nas formulações F4, F6 e F14 não foi observado evento de fusão do fármaco, indicando a inclusão deste na cavidade hidrofóbica das CDs, ou ainda a amorfização das amostras. No caso da formulação F5, não há CDs para proteger o BI fisicamente, ainda que haja interação entre os compostos ocorre o aparecimento do evento de fusão do BI.

A análise termogravimétrica (Figura 31) das amostras demonstrou que todas possuem água residual, com perda de massa de 2,512 % para F4, 3,015 % para F5, 3,128 % para F6 e de 4,520 % para F14. Não havendo eventos até 200 °C, aproximadamente. A decomposição das amostras ocorreu a partir de 269,50 °C para F4, 203,87 °C para F5, 251,74 °C para F6 e 285,11 °C para F14.

Os dados de TGA se relacionam com a temperatura de secagem utilizada no SD, sendo que quanto maior a temperatura de entrada menor a quantidade de água residual.

Figura 31 - Curvas termogravimétricas e termogravimétricas derivadas obtidas para as formulações finais.



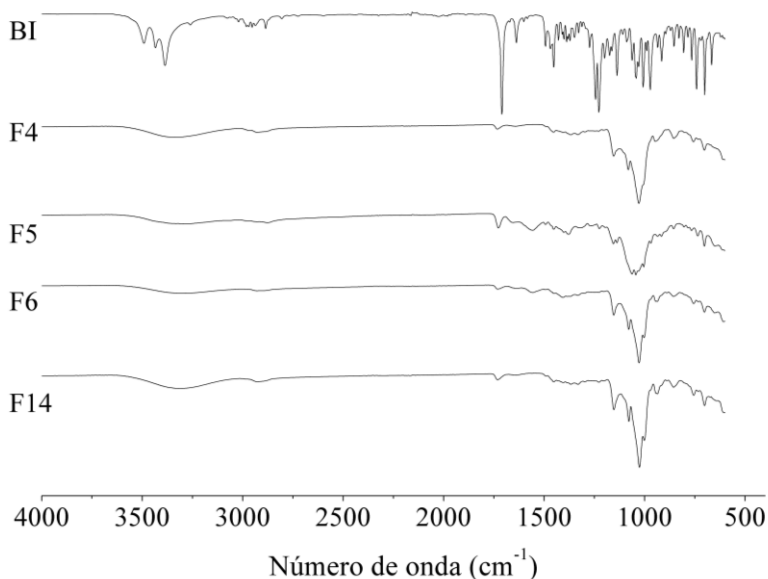
Fonte: A autora.

Os espectros FTIR das formulações estão demonstrados na Figura 32. A formulação F4 teve em seu espectro predomínio das bandas da HP- $\beta$ -CD, apenas permanecendo bandas entre  $1483$  e  $1243$   $\text{cm}^{-1}$  do BI e a banda correspondente a carbonila do éster, com um deslocamento de  $20$   $\text{cm}^{-1}$ , observada em  $1731$   $\text{cm}^{-1}$ , sendo que essa banda apresentou também um efeito hipsocrômico (diminuição significativa na intensidade). O perfil do espectro FTIR sugere que houve a inclusão do BI na cavidade da CD.

No espectro da formulação F5 também houve a predominância de bandas do carreador, nesse caso a QTS, somente a banda da carbonila do éster permaneceu, tendo sua intensidade bruscamente diminuída e um deslocamento para  $1728$   $\text{cm}^{-1}$ . Apesar dos estudos de docagem molecular demonstrarem a interação por meio de ligação de hidrogênio, as bandas correspondentes do BI e da QTS não sofreram deslocamento,

houve apenas diminuição na intensidade, sem a confirmação de tais interações por essa técnica.

Figura 32 - Espectro FTIR do BI em comparação com os espectros FTIR obtidos para as formulações selecionadas.



Fonte: A autora.

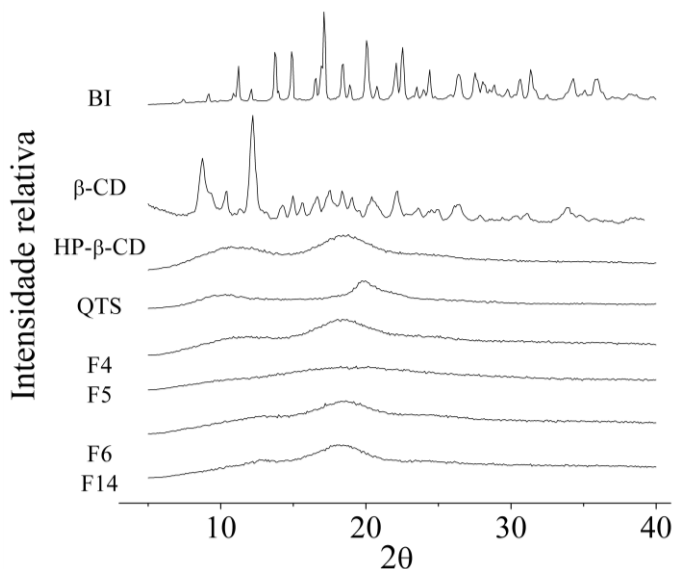
O espectro FTIR da formulação F14 apresentou uma mescla de bandas da QTS e da  $\beta$ -CD, não houve predomínio de um dos carreadores, apenas sobreposição de bandas de maior intensidade. Como nos demais espectros houve predomínio nas bandas dos carreadores, diminuição na intensidade de todas as bandas e sobreposição de algumas bandas não significativas. Com relação as bandas do BI presentes no espectro da F14, houve alteração na banda da carbonila do éster, essa ocorreu a  $1730\text{ cm}^{-1}$  com diminuição significativa na intensidade.

Os dados de FTIR não permitiram confirmar experimentalmente quais grupamentos químicos estariam sofrendo alterações. Nos espectros FTIR obtidos para as formulações, em contraste com os obtidos para as misturas físicas, houve o predomínio dos carreadores, a banda da carbonila do éster, a mais intensa no espectro do BI puro, permaneceu, ainda que baixíssima intensidade, nos espectros das formulações. Além disso, no caso das formulações F4, F6 e F14, que

contem CDs, a hipótese da inclusão do BI na cavidade das CDs é sustentada, não só pelo predomínio do espectro dos carreadores, como também pela intensidade menor e a deformação da banda de carbonila nos espectros, quando comparados ao espectro da formulação F5.

Os difratogramas obtidos estão demonstrados na Figura 33, onde denotam-se semelhanças entre as quatro formulações, não havendo reflexões do fármaco cristalino, todas as amostras são amorfas e apresentam halo de amorfização. Tal fato já era esperado devido na técnica de produção das partículas ocorrer a solubilização dos compostos, seguida de secagem rápida por aspersão, em SD.

Figura 33 - Difratogramas de raios-X das matérias primas e das formulações finais.



Fonte: A autora.

A densidade real das partículas foi determinada por picnometria em gás, utilizando o gás inerte hélio, uma vez que ao comparar com as densidades obtidas para as matérias primas (Tabela 5) não foram observadas diferenças relevantes. A baixa densidade das partículas pode estar relacionada com a porosidade do material, o que não pode ser confirmado por meio de MEV para as formulações compostas por CDs.

Durante a formação das partículas no *spray-dryer*, temperaturas mais altas, aliadas a concentração baixa de fármaco/carreadores e baixa

aspiração secam mais rapidamente a amostra, impedindo que os sólidos se concentrem no centro da partícula. Além disso, a secagem efetiva diminui a quantidade de água residual, ambos fatos acarretam baixos valores de densidade real (CESCHAN et al., 2016).

Tabela 11 - Densidades reais obtidas por picnometria a gás.

	Volume (cm <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
F4	2,70	1,41
F5	2,05	1,43
F6	2,50	1,46
F14	2,30	1,51

Fonte: A autora.

Em todas as formulações foi observada a presença de interações entre o fármaco e os carreadores, a partir dos resultados das análises do estado sólido discutidas nos itens 4.1 e 4.3. No caso das formulações obtidas por SD, os processos de interação em água por 24h, a atomização e a secagem em altas temperaturas, promovem condições físico-químicas que potencializam a ocorrência de interações.

Os carreadores e o fármaco utilizados, por docagem molecular, já apresentaram alto potencial de interação, mesmo sem a presença de solventes, pressão e/ou temperatura, sendo assim, já eram esperadas interações entre os compostos. No caso das formulações inalatórias de BI, as interações tornam-se pertinentes devido a incompatibilidade do fármaco com a técnica de SD, a qual é a melhor para diminuir o tamanho de partícula, essas interações são capazes de proteger o fármaco durante o processamento.

Além do caráter farmacotécnico, as interações e a amorfização do BI podem influenciar na dissolução, liberação, início e tempo de ação. A baixa densidade pode auxiliar para que as partículas alcancem áreas mais profundas dos pulmões. O tamanho de partícula pequeno aumenta a superfície de contato da formulação com o meio, alterando a molhabilidade e, por consequência o início e tempo de ação do fármaco.

Os dados revelam que as quatro formulações selecionadas possuem particularidades distintas que podem afetar a aerodinâmica, deposição e liberação do fármaco.

#### 4.7 PERFIL AERODINÂMICO

Os ensaios realizados no NGI permitem simular o trato respiratório, sob o aspecto aerodinâmico. Utilizando fluxo negativo de

60 mL/min, equivalente a aspiração de um indivíduo saudável, os pós são aspirados da cápsula inserida no dispositivo inalatório, decorrem os estágios do impactador. A massa de amostra adicionada nas cápsulas foi determinada considerando a dosagem máxima por dia e a concentração mínima de quantificação pelo método validado (apêndice A).

Cada estágio possui poros de diferentes tamanhos, assim cada um dos estágios apresenta um *cut-off*, com a quantificação de fármaco nos estágios, no dispositivo inalatório e cápsula, estima-se o DAMM, DPG, FE, FPF e FR, esses resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Perfil aerodinâmico obtido por análise no NGI.

	FE (%)	FPF (%)	FR (%)	DAMM ( $\mu\text{m}$ )	DPG
F4	94,31	40,21	37,92	2,76	1,82
F5	94,70	41,87	39,65	3,02	1,70
F6	88,83	39,71	35,28	3,03	1,79
F14	83,21	43,10	35,87	2,94	1,69

Fonte: A autora.

A FE representa a porção de fármaco que é emitida do dispositivo inalatório, por isso no cálculo são consideradas as quantificações desde o dispositivo inalatório até o MOC. As formulações exibiram FE entre 83,21 e 94,31%.

A menor FE foi observada para F14, a qual foi produzida sob temperatura de 150 °C em SD, temperatura mais baixa do que as demais amostras. Como observado no TGA, existe água residual em todas as amostras, ainda que em pequena proporção, as moléculas de água alojadas nas cavidades polares das CDs e ligadas ao BI que não tenham sido efetivamente desidratados podem realizar ligações de hidrogênio, o que promove a aglomeração das partículas, além das interações entre as moléculas das próprias partículas da formulação, podendo ocorrer ainda a interação com as moléculas de gelatina da cápsula, razão pela qual os pós não são totalmente retidos da cápsula quando se emprega pressão ao experimento.

Assim, foi possível observar que F6 produzida a temperatura de 160 °C contendo em sua composição  $\beta$ -CD e QTS, obteve melhor desempenho em FE, porém, ainda inferior a F5, ainda que produzida sob 160 °C, obtém a melhor *performance* de FE devido ao carreador QTS apresentar boa secagem e menor possibilidade de interações intermoleculares. A formulação F4 também apresentou alto desempenho

de FE, composta por HP- $\beta$ -CD como carreador, produzida sob temperatura de 175 °C, proporcionando eficiência na secagem das partículas.

Os dados de FE e a hipótese de aglomeração das partículas acompanham os resultados de densidade real (Tabela 11), onde F14 e F6 apresentam valores de densidades reais maiores que F4 e F5. Sendo F5 com valor de densidade real menor que F6, indicando a secagem efetiva da formulação.

A FPF é calculada considerando a quantidade de fármaco desde o estágio 3 até o MOC, isso a partir da FE, indicando a porcentagem de partículas menores do que 2,85  $\mu\text{m}$ . Para FR o cálculo é similar, porém a porcentagem indicada por essa variável é de partículas menores que 1,68  $\mu\text{m}$ .

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam que todas as formulações alcançam regiões profundas dos pulmões, com resultados similares a encontrados por Liu *et. al.* (2018) e Zhang *et. al.* (2018), ambos desenvolveram partículas contendo budesonida (LIU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

Diferente do tamanho de partícula mensurado por difração a laser, o DAMM, obtido por testes aerodinâmicos, é calculado por meio dos limites de tamanho de partícula do equipamento utilizado, nesse caso o NGI. Além dos limites físicos das partículas, a pressão negativa exercida é capaz de desagregar partículas, principalmente no caso de partículas porosas e pouco densas, isso faz com que o DAMM apresente valores menores do que os calculados para Daer e a média do tamanho de partícula. Os resultados de DPG indicam a dispersão dos DAMM, todavia nenhuma das amostras apresentou esse parâmetro acima de 2, indicando homogeneidade de distribuição.

De maneira geral, no intervalo de 1 a 5  $\mu\text{m}$  ocorre a distribuição do fármaco nos pulmões, sendo que partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  são expelidas e, maiores que 5  $\mu\text{m}$ , acabam retidas nas regiões de boca a traquéia (MORENO-SASTRE *et al.*, 2016). Alguns autores contestam que partículas menores que 3  $\mu\text{m}$  apresentam absorção sistêmica, entretanto fatores físico-químicos relacionados às micropartículas e características farmacológicas do fármaco podem influenciar para que ocorra absorção sistêmica ou local (CESCHAN *et al.*, 2018).

Zanen e colaboradores (1996) realizaram um estudo clínico com oito pacientes asmáticos, média de idade de 55 anos, onde os parâmetros de espirometria foram mensurados após a administração de aerossóis de BI, no estudo foram utilizados aerossóis com tamanho de partícula 1,5, 2,8 e 5  $\mu\text{m}$  (ZANEN; GO; LAMMERS, 1996). O objetivo foi verificar

qual tamanho de partícula seria mais eficaz para melhorar o volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV1), média do débito expiratório em 75% (MEF 75) e 50% (MEF 50) da capacidade vital forçada (FVC). Não foram observados efeitos colaterais agudos, todos os parâmetros apresentam melhora em relação ao placebo, independente do tamanho de partícula do BI administrado. O aerossol com melhor desempenho foi o com partículas de BI de 2,8 µm, seguido por 1,5 µm e 5µm.

Os tamanhos de partícula das formulações encontram-se entre 2,76 e 3,03 µm, adequados para administração inalatória. Os valores de MDDA maiores quando possuem QTS na composição, o que já era esperado devido ao tamanho de partícula mensurado por difração a laser, isso também foi observado para as formulações que não continham o BI, indicando que a QTS apresenta tendência em originar partículas maiores sob as condições avaliadas.

A representação gráfica da quantificação de BI nos diferentes estágios o NGI nos permite visualizar melhor o comportamento de cada uma das formulações, como demonstrado na Figura 34.

Nota-se que a formulação F14 apresenta maior concentração nos estágios cápsula e dispositivo inalatório, quando comparado às outras formulações, devido a possível agregação das partículas, totalizando 16 % de fármaco recuperado. Ainda assim, seu diâmetro permitiu que as micropartículas atingissem o estágio 6. Em contrapartida, a formulação F5 teve melhor desempenho nessas etapas, onde apenas 4 % de fármaco foi recuperado, indicando a porcentagem de fármaco que não entrará em contato com o paciente.

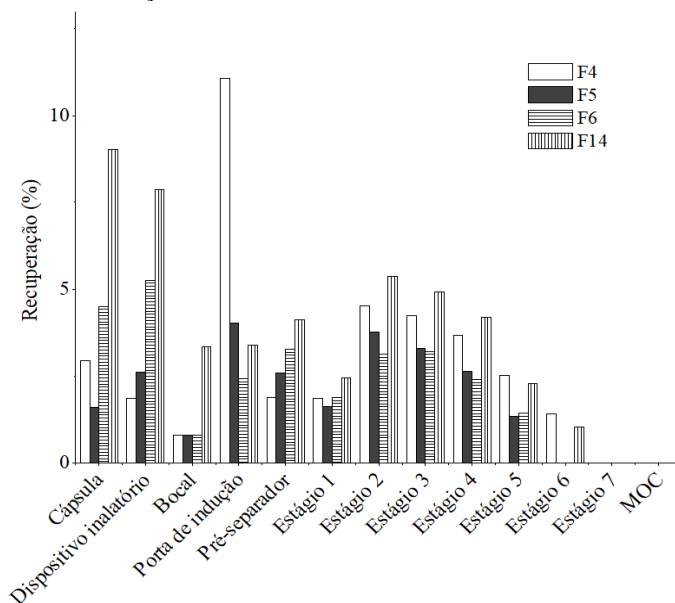
A partir do estágio bucal o fármaco estaria em contato com o paciente, porém em distintas regiões do sistema respiratório. Após o estágio 2, considera-se que o fármaco atingiu os pulmões, sítio de ação do fármaco. A formulação F14 possui maior concentração no estágio bucal, porém nos demais estágios obtêm perfil semelhante as demais.

O estágio porta de indução é o primeiro do equipamento propriamente dito, sua forma e disposição remetem a região oral. A formulação F4 apresentou sua maior concentração na porta de indução, ainda assim baixa, quando comparada a outros trabalhos, que em geral apresentam concentrações de fármaco maiores nos primeiros quatro estágios.

Do pré-separador a MOC os perfis foram semelhantes, sendo que nenhuma das formulações atingiu o estágio 7 e MOC. Estima-se que ao não atingirem estágios finais do NGI essas formulações tem ação local predominante, já as que atingem os estágios 7 e MOC, tendem a apresentar absorção sistêmica.



Figura 34 - Distribuição da recuperação de fármaco na avaliação aerodinâmica *in vitro* das formulações finais.



Fonte: A autora.

O desempenho das formulações poderia ser alterado utilizando fluxo negativo distinto, com a troca do dispositivo inalatório, a proporção de formulação e lactose de alta granulometria. Diversas revisões e investigações concluíram que a modificação desses fatores pode alterar o perfil aerodinâmico dos pós (MENDES; SOUSA; PINTO, 2009; QI et al., 2009).

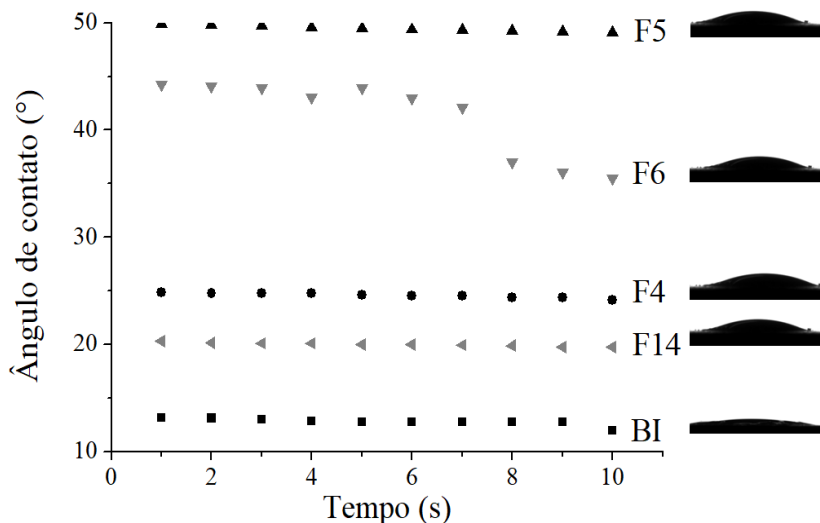
Não foram encontrados estudos que utilizassem BI como princípio ativo e avaliassem a aerodinâmica por NGI. Corrigan e colaboradores (2016) desenvolveram partículas por SD contendo BI e salbutamol, em diferentes proporções. A avaliação da aerodinâmica foi realizada por meio do Aparato A da Farmacopeia Europeia (2005). A FPF obtida foi de 5,24 a 11,77 %, maior a medida conforme a proporção de salbutamol aumenta. Já o tamanho de partícula foi de 5 a 60  $\mu\text{m}$ , sendo maior quando a proporção de BI é maior. Os dados obtidos por Corrigan e colaboradores, juntamente com os resultados de tamanho de partícula e rendimento da secagem de BI por SD, nos confirmam a inviabilidade do processamento desse fármaco isolado por SD, gerando

partículas com tamanhos maiores e mais facilmente agregáveis (CORRIGAN; CORRIGAN; HEALY, 2006).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO E LIBERAÇÃO

A mensuração do ângulo de contato em água permitiu avaliar como as formulações seriam depositadas nos pulmões, onde ângulos de contato menores que  $90^\circ$  indicam alta hidrofiliicidade da amostra. As formulações e o fármaco apresentaram ângulos menores que  $90^\circ$ , como pode ser observado na Figura 35. De maneira geral as formulações obtiveram ângulo de contato maior do que BI, demonstrando que a hidrofiliicidade foi diminuída com o uso dos carreadores, ainda que esses sejam polares como o fármaco.

Figura 35 - Ângulo de contato mensurado entre um e dez segundos para as formulações e BI, a direita de cada identificação das amostras as imagens capturas pela câmera, no momento em que a gota de água toca as pastilhas.



Fonte: A autora.

Além disso, a porosidade das micropartículas influencia na penetração da água por capilaridade, o que pode ser facilmente detectado na F6, onde o ângulo de contato diminui  $10^\circ$  no tempo de 10 segundos.

A composição das formulações influenciou diretamente no ângulo de contato. Aquelas que continham apenas CDs e BI

apresentaram resultados similares, sendo que a F14 exibiu maior hidrofiliçidade em relaçaõ a F4. Isso ocorre devido a presença das cadeias carbõnicas adicionais na HP- $\beta$ -CD, onde o efeito observado ocorre pela repulsãõ das moléculas de água em algumas regiões das partículas.

Em contraste às cadeias carbõnicas, as ligações de hidrogênio possibilitadas pelo contato com água, diminuem o ângulo de contato, o que foi observado para todas as formulações contendo CDs.

Ao comparar F5 e F6, ambas contendo QTS, foram observados perfis distintos, ainda que tenham sido as formulações menos hidrofílicas. A QTS contribuiu de forma com que a superfície das partículas tivesse menos contato com as moléculas de água, diminuindo sua molhabilidade. Quando há apenas QTS e BI na formulaçãõ (F5), a superfície das partículas torna-se menos hidrofílica e o ângulo de contato é mantido próximo a 50 °. A adiçãõ de  $\beta$ -CD na formulaçãõ F6 tornou a superfície mais hidrofílica e, à medida que as moléculas de água entram em contato com a formulaçãõ o ângulo de contato diminuiu, fato que evidencia também a presença de poros nas partículas. A hipótese da presença de poros na formulaçãõ F6 corrobora com o fato desta formulaçãõ apresentar maior diferença entre o Daer e DAMM.

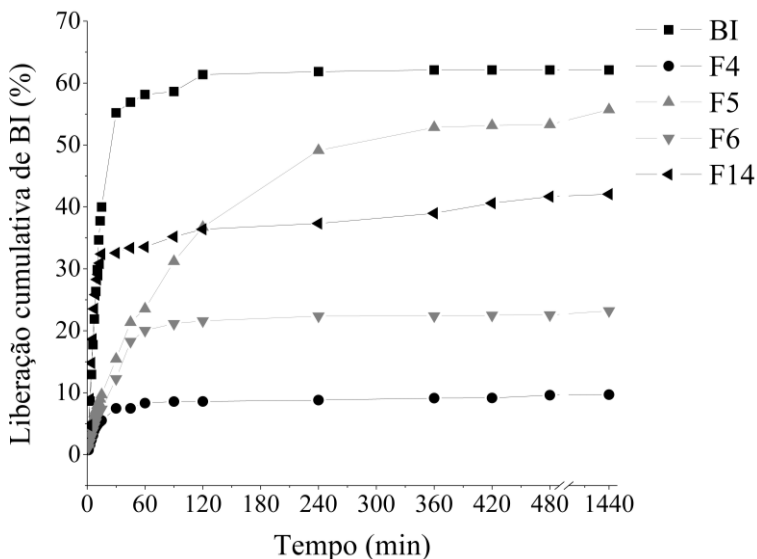
As formulações, em comparaçãõ com o BI puro, tendem a permanecer por um período maior em contato com o tecido alveolar, o que pode aumentar o tempo de açãõ da formulaçãõ.

Para os ensaios de liberaçãõ do fármaco foram utilizadas células de Franz e membrana celulósica, com tamanho de poros de 14.000 g/mol, isso indica que compostos com massa acima disso não permeiam a fase líquida. Na Figura 36 estãõ apresentadas as representações gráficas da liberaçãõ de BI obtidos para o fármaco e as formulações.

Novamente a composiçãõ originou perfis distintos às formulações. O BI apresentou liberaçãõ rápida e progressiva até 30 min, caracterizando um efeito *burst*, entre 30 e 120 min houve pouca liberaçãõ de fármaco e, após 120 min, essa se tornou estável até 24 horas.

As formulações contendo apenas BI e CDs também apresentaram liberaçãõ rápida e progressiva. Para F4 não ultrapassou 10 % de fármaco, devido à alta massa molecular do complexo e menor hidrofiliçidade. Para F14 a liberaçãõ de fármaco foi facilitada, devido a menor massa molecular do complexo e maior hidrofiliçidade, assim como BI, apresentou efeito *burst*, até 15 min a liberaçãõ foi rápida e progressiva e, após isso, o BI foi liberado de forma lenta e em baixa concentraçãõ, até formar um platô, atingindo cerca de 40% de liberaçãõ.

Figura 36 - Perfil de liberação do BI e das formulações, obtidos por ensaio em células de Franz.



Fonte: A autora.

A formulação F5 apresenta em sua composição BI e QTS, o que permitiu uma liberação mais lenta e uniforme do fármaco e, após 24 horas, a proporção de fármaco foi de aproximadamente 55%, sendo a formulação com maior proporção de BI liberado.

O perfil inicial observado na formulação F6, a qual contém complexos de BI- $\beta$ -CD e QTS, apresentou liberação lenta e uniforme, porém a presença de  $\beta$ -CD possivelmente diminuiu a liberação do fármaco ao longo do ensaio. Até 90 min houve recuperação de BI e após isso houve estabilização, resultando na liberação de apenas 23,21 % de BI.

A uniformidade de liberação de BI observada para as formulações contendo QTS pode estar relacionada com a formação de uma película, tornando o ambiente próximo a membrana mais facilmente transitável pelas partículas.

Relacionando a deposição por ângulo de contato e a liberação por meio de células de Franz, verificou-se que a formação de uma película de QTS na formulação F5 permite a liberação facilitada de BI. Entretanto na formulação F6 ainda com a ocorrência desse fenômeno

não houve liberação do BI dos complexos de BI/ $\beta$ -CD, limitado a concentração máxima de BI liberado a 23,21 %.

Das formulações contendo apenas CDs e BI, a F14 obteve melhor desempenho quanto a liberação de BI, esta também foi a formulação mais hidrofílica considerando ângulo de contato, o que pode ter influenciado na dissociação dos complexos.

Comparando os perfis de liberação estatisticamente por meio de parâmetros independentes de diferença e similaridade,  $f_1$  e  $f_2$ , respectivamente, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 13. Nessa análise, perfis são considerados similares quando  $f_1$  apresenta fator entre 0 e 15 e, quando o  $f_2$  obtido estiver 50 e 100 (ANVISA, 2010). Em vista disso, tem-se que nenhuma das formulações apresenta perfil semelhante ao perfil de liberação do fármaco.

Tabela 13 - Fatores  $f_1$  (de similaridade) e  $f_2$  (de diferença) obtidos para os perfis de liberação de brometo de ipratrópio nas formulações.

Perfis comparados	$f_1$	$f_2$
BI-F4	85,18	20,11
BI-F5	45,27	32,94
BI-F6	69,60	25,00
BI-F14	30,82	39,15

Fonte: A autora.

Dentre as quatro formulações demonstraram melhor perfil de liberação a F5 e F14, capazes de liberar proporções maiores de fármaco, ainda assim, os resultados apontam que todas as formulações desenvolvidas controlam a liberação do fármaco, no organismo humano proteínas de membrana, enzimas, reações bioquímicas, fluido pulmonar, íons e moléculas, das quais não foram possíveis reproduzir *in vitro*, a liberação tende a ser facilitada, aumentando a proporção de BI liberado. Contudo, o ensaio permitiu estimar as possíveis formas de liberação de fármaco da matriz formada pelos carreadores.

A obstrução dos poros pela massa molecular dos complexos pode ter saturado a membrana, impedindo que seja liberado todo o fármaco das formulações. Além disso, para que o BI seja liberado da cavidade das CDs é necessário ambiente aquoso e, como o ensaio foi realizado para avaliar a liberação do sólido ao meio líquido, não houve liberação efetiva. Apesar de simular o organismo, a liberação de BI da cavidade das CDs *in vivo* pode ser facilitada, devido à presença de líquidos na superfície do sistema respiratório, onde as partículas são depositadas.

Existem diversas teorias e modelos matemáticos que buscam elucidar como o fármaco é liberado da matriz polimérica, sendo que três mecanismos básicos são considerados: a difusão, porosidade matricial e erosão. Ainda, esses mecanismos podem coexistir, visto que as variáveis dependentes envolvem a características da composição das partículas e do meio. Essas variáveis incluem a difusão de líquido pelo sistema matricial, onde interações químicas são relevantes, dissolução do fármaco, capacidade de intumescimento e erosão da matriz, além da ação da osmose sobre o sistema (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012; VALÉRIO et al., 2019).

## 5 CONCLUSÕES

- As matérias-primas foram caracterizadas no estado sólido, confirmando as identidades descritas pelos fabricantes e condizentes com dados encontrados na literatura.

- Misturas binárias contendo BI e cada um dos excipientes foram obtidas, das quais a análise no estado sólido não confirmou interações entre os compostos. Entretanto, aplicando a teoria de Flory-Huggins constatou-se que as CDs e a QTS utilizadas formam sistemas de alta miscibilidade com o BI.

- Por meio do estudo de solubilidade de fases não foi possível detectar a estequiometria e a constante de estabilidade aparente das inclusões do fármaco a  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD.

- Na docagem molecular as interações entre o fármaco e os excipientes puderam ser melhor esclarecidas, sendo a ordem de maior magnitude de interação dos sistemas:  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD, QTS,  $\alpha$ -CD e LAC. Além disso, essa análise permitiu avaliar mais excipientes e, assim, selecioná-los racionalmente.

- Uma metodologia de superfície de resposta foi desenvolvida e pela qual 33 amostras sem fármaco foram originadas. Com a análise dos resultados foram produzidas 16 formulações contendo o fármaco, das quais foram selecionadas quatro para proceder com a caracterização e avaliação *in vitro*.

- Para seleção das melhores formulações foi considerado o tamanho de partícula, diâmetro aerodinâmico, composição, rendimento e doseamento de fármaco.

- Na caracterização no estado sólido das formulações selecionadas foram observadas interações, dentre elas a inclusão do fármaco na cavidade das CDs, responsável por preservar o BI durante a secagem por SD. Ademais, todas as formulações apresentaram-se amorfas.

- Os ensaios de aerodinâmica realizados no NGI mostraram que todas as formulações atingem os pulmões, com DAMM entre 2,76 e 3,03  $\mu\text{m}$ .

- A análise de ângulo de contato demonstrou que todas as formulações são hidrofílicas, porém menos hidrofílicas que o fármaco puro. Para formulação F6, a qual composta por  $\beta$ -CD, QTS e BI, a porosidade influencia diretamente na forma de deposição das partículas.

- Quanto a liberação de BI avaliado por células de Franz com membranas celulósicas, todas as formulações apresentaram potencial de liberação modificada. O fato da QTS formar uma película e reter líquido

contribuiu para a liberação de fármaco, enquanto que para as CDs a liberação foi menor devido a baixa liberação de BI da cavidade das CDs.

▪ Em suma, quatro formulações de diferentes matrizes carreadoras demonstraram-se mais promissoras. Os ensaios experimentais revelaram que as formulações apresentam perfis diferentes, influenciadas diretamente pela composição. Este trabalho apresentou caráter inovador, o qual avalia as interações existentes entre o fármaco e os excipientes por diversas metodologias, discute a formação de micropartículas de BI obtidas por *spray-dryer* e sua avaliação físico-química, aerodinâmica, de deposição e liberação. Os dados obtidos demonstraram-se satisfatórios ao desenvolver uma nova apresentação farmacêutica de um fármaco com eficácia e segurança comprovada, amplamente utilizado por pacientes multimedcados, podendo assim reduzir efeitos colaterais e melhorar a adesão ao tratamento.



## REFERÊNCIAS

ABDINE, Heba H; BELAL, F; AL-BADR, Abdullah A. Ipratropium Bromide : Physical Properties. v. 30, n. 03, 2003.

AG, Novartis International. Global Pressurized Metered Dose Inhaler Market Analysis. Disponível em: <<https://www.openpr.com/news/1305121/Global-Pressurized-Metered-Dose-Inhaler-Market-Analysis-Forecast-2018-2025-with-Glenmark-Pharmaceuticals-Novartis-International-AG-Propeller-Health-Opko-Health-BioCare-Group.html>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

AL-AKAYLEH, F. et al. Development and evaluation of a novel, multifunctional, coprocessed excipient via roller compaction of  $\alpha$ -lactose monohydrate and magnesium silicate. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, v. 4, n. 2, 2013.

AMBRUS, Rita et al. Novel dry powder inhaler formulation containing antibiotic using combined technology to improve aerodynamic properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 123, p. 20–27, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098718303282>>.

ARAYNE, M S; SULTANA, N. Porous nanoparticles in drug delivery systems. *Pak J Pharm Sci*, v. 19, n. November, p. 158–169, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751130>>.

ARMSTRONG, N. Anthony. *Pharmaceutical experimental Design and Interpretation*. 2. ed. Boca Raton: T&F informa, 2006.

BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Ed. UFV ed. Viçosa: [s.n.], 2007.

BARBOZA, Fernanda M et al. Differential Scanning Calorimetry As a Screening Technique in Compatibility Studies of. v. 43, n. 6, p. 363–368, 2009.

BARNES, P., DRAZEN, J., RENNARD, S., THOMSON, N. **Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management**. 2. ed. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2009.

BISGAARD, Hans; O'CALLAGHAN, Cris; SMALDONE, Gerald C. Drug Delivery to the Lung. 1. ed. Maryland, Estados Unidos: Lung Biology in Health and Disease, 2001.

BOGGIONE, María Julia et al. Synthesis and characterization of chitosan membranes functionalized with amino acids and copper for adsorption of endoglucanase. *Powder Technology*, v. 315, p. 250–257, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2017.04.014>>.

BRASIL. **II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC**. 2004.

BRASIL. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS - DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA**. 2012.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. 2017, Brasília: Anvisa, 2017. p. 11.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC N° 31, DE 11 DE AGOSTO DE 2010. 2010, Brasília: Anvisa. 2010. p. 9.

BRITAIN, H. G. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. V. 30. Nova Jersey: Academic Press., 2003.

CESCHAN, Nazareth Eliana et al. Impact of feed counterion addition and cyclone type on aerodynamic behavior of alginate-chitosan microparticles produced by spray drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 109, p. 72–80, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.09.020>>.

CESCHAN, Nazareth Eliana; BUCALÁ, Verónica; RAMÍREZ-RIGO, María Verónica. Polymeric microparticles containing indomethacin for inhalatory administration. *Powder Technology*, v. 285, p. 51–61, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2015.02.001>>.

CORRIGAN, Deirdre O; CORRIGAN, Owen I; HEALY, Anne Marie. Physicochemical and in vitro deposition properties of salbutamol sulphate / ipratropium bromide and salbutamol sulphate / excipient spray dried mixtures for use in dry powder inhalers. v. 322, p. 22–30, 2006.

DAL NEGRO, Roberto W. Dry powder inhalers and the right things to remember: a concept review. *Multidisciplinary respiratory medicine*, v. 10, n. 1, p. 13, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878791>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

DFE PHARMA. Lactose, Some basic properties and characteristics. 2013. Disponível em: <<http://www.dfepharma.com/en/downloads.aspx?id=%7B2BB38A30-33EC-488D-9B1F-FEE0AD797636%7D>>.

DHAWADE, Purna P; JAGTAP, Ramanand N. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Advances in Applied Science Research*, v. 3, n. 3, p. 1372–1382, 2012. Disponível em: <[www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com)>. Acesso em: 18 dez. 2018.

DUFOUR, Gilles et al. Interest of cyclodextrins in spray-dried microparticles formulation for sustained pulmonary delivery of budesonide. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 495, n. 2, p. 869–878, 30 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26410753>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

EINBERGER, Steven E.; COCKRILL, Barbara A.; MANDEL, Jess. *Principles of Pulmonary Medicine*. 7. ed. Estados Unidos: Elsevier, Inc., 2019.

EL-KEMARY, Maged et al. Inclusion of Paracetamol into  $\beta$ -cyclodextrin nanocavities in solution and in the solid state. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 79, n. 5, p. 1904–1908, 2011.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0. 2.9.18 Preparations for Inhalation: Aerodynamic Assessment of Fine Particles. 2.9.18 Preparations for Inhalation: Aerodynamic Assessment of Fine Particles, v. 7.0, p. 274–285, 2010.

GAAF. No Title. Disponível em: <<http://ambermd.org/antechamber/gaff.html>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

GASTEIGER, Johann; MARSILI, Mario. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Letters*, v. 19, n. 34, p. 3181–3184, jan. 1978. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403901949779>>.

GASTEIGER, Johann; MARSILI, Mario. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, jan. 1980. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0040402080801682>>.

GRENHA, A. et al. The potential of chitosan for pulmonary drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 20, n. 1, p. 33–43, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224710500042>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

GRUNWALD, J et al. Notes to the Editor References Determination of the viscometric constants for chitosan. *G. L. Arch. Biochem. Biophys.* [S.l: s.n.], 1978. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/0141813082900745/1-s2.0-0141813082900745-main.pdf?\\_tid=442891ab-6eb9-4619-93cd-](https://ac.els-cdn.com/0141813082900745/1-s2.0-0141813082900745-main.pdf?_tid=442891ab-6eb9-4619-93cd-)

4cd280b306c2&acdnat=1547839813\_8a22e0d1e15a8bcae258f93637975042>. Acesso em: 18 jan. 2019.

HANSEL, Trevor T. et al. Anticholinergic Bronchodilators. In: BARNES, Peter J. et al. (Org.). . Asthma COPD Basic Mech. Clin. Manag. 2. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2009. p. 615–626.

HANWELL, Marcus D et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. Journal of Cheminformatics, v. 4, n. 1, p. 17, 2012. Disponível em: <<http://jcheminf.springeropen.com/articles/10.1186/1758-2946-4-17>>.

HARRIS, R.; ACOSTA, N.; HERAS, A. Chitosan and inhalers: a bioadhesive polymer for pulmonary drug delivery. Inhaler Devices. [S.l.]: Elsevier, 2013. p. 77–93. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857094964500067>>.

HOLT, Jay. MMAD Calculator. Disponível em: <<http://www.mmadcalculator.com>>. Acesso em: 9 maio 2018.

HUANG, Zhengwei et al. Dry powder inhaler formulations of poorly water-soluble itraconazole: A balance between in-vitro dissolution and in-vivo distribution is necessary. International Journal of Pharmaceutics, v. 551, n. 1–2, p. 103–110, 15 nov. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30217767>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005, Geneva, Switzerland: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

ICOZ, Didem Z; KOKINI, Jozef L. Examination of the validity of the Flory – Huggins solution theory in terms of miscibility in dextran systems. v. 68, p. 59–67, 2007.

JOHAL, Baljinder et al. Fine Particle Profile of Fluticasone Propionate/Formoterol Fumarate Versus Other Combination Products: the DIFFUSE Study. *Combination Products in Therapy*, v. 3, n. 1–2, p. 39–51, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13556-013-0003-9>>.

KESAVAN, Jana et al. Aerosolization of Bacterial Spores with Pressurized Metered Dose Inhalers. *Aerosol Science and Technology*, v. 47, n. 10, p. 1108–1117, out. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02786826.2013.824552>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

KIM, Yong Ho; SHING, Katherine S. Supercritical fluid-micronized ipratropium bromide for pulmonary drug delivery. v. 182, p. 25–32, 2008.

KIRK, J. H.; DANN, S. E.; BLATCHFORD, C. G. Lactose: A definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 334, n. 1–2, p. 103–114, 2007.

KOLA, Mehmet et al. Bilateral acute angle closure developing due to use of ipratropium bromide and salbutamol. *International Ophthalmology*, p. 1–4, 2017.

KRISTOF, Jaroslav et al. Feasibility of transdermal delivery of Cyclosporine A using plasma discharges. *Biointerphases*, v. 12, n. 2, p. 02B402, jun. 2017. Disponível em: <<http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.4982826>>.

KWOK, Philip Chi Lip; CHAN, Hak-Kim. *Advances in pulmonary drug delivery*. 1. ed. Flórida, Estados Unidos: Taylor & Francis Group, LLC, 2017.

LIN, Ling et al. Development of fine solid-crystal suspension with enhanced solubility, stability, and aerosolization performance for dry powder inhalation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 533, n. 1, p. 84–92, 25 nov. 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317308797>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

LISTIOHADI, Yuan et al. Thermal analysis of amorphous lactose and  $\alpha$ -lactose monohydrate. *Dairy Science & Technology*, v. 89, n. 1, p. 43–67, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/dst:2008027>>.

LIU, Tingting et al. Budesonide nanocrystal-loaded hyaluronic acid microparticles for inhalation: In vitro and in vivo evaluation. *Carbohydrate Polymers*, v. 181, n. September 2017, p. 1143–1152, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.018>>.

LUSOCHIMICA. Certificate of analysis. , 6., no 484/16. Italy: [s.n.], 2016.

MACHADO, Rita Monteiro et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 14–26, set. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000149>>.

MARSAC, Patrick J.; LI, Tonglei; TAYLOR, Lynne S. Estimation of drug-polymer miscibility and solubility in amorphous solid dispersions using experimentally determined interaction parameters. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 1, p. 139–151, 2009.

MENDES, Pedro J; SOUSA, João M M; PINTO, João F. Prediction of the Deposition of Dry Powder Aerosols. v. 11, n. 1, p. 186–194, 2009.

MEZHERICHER, M; LEVY, A; BORDE, I. Theoretical Models of Single Droplet Drying Kinetics: A Review. **Drying Technology**, v. 28, n. October 2014, p. 278–293, 2010.

MORENO-SASTRE, M et al. Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 498, n. 1–2, p. 263–273, 2016. Disponível em:

<[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L607338093%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.028%5Cnhttp://findit.library.jhu.edu/resolve?sid=EMBASE&issn=18733476&id=doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.028&atitle=Pulmonary+](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L607338093%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.028%5Cnhttp://findit.library.jhu.edu/resolve?sid=EMBASE&issn=18733476&id=doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.028&atitle=Pulmonary+>)>.

MÜLLER, Thorsten Nicolas. Process-induced disorders in drug powders for inhalation. 2015. 210 f. Chistian Albrecht University, 2015. Disponível em: <[https://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation\\_derivate\\_00006169/Dissertation\\_ThorstenMueller.pdf](https://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation_derivate_00006169/Dissertation_ThorstenMueller.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2018.

NILSEN-NYGAARD, Julie et al. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers*, v. 7, n. 3, p. 552–579, 13 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4360/7/3/552>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

NOKHODCHI, Alie; MARTIN, Gary P. *Pulmonary Drug Delivery*. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118799536>>.

OKSUZ, H. et al. Acute angle-closure glaucoma precipitated by local tiotropium absorption. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 20, n. 6, p. 627–628, 2007.

OLIVEIRA, PAULA MARTINS. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de quitosana para administração pulmonar de isoniazida. 2016. 67 f. Universidade de Brasília, 2016.

OMRON HEALTHCARE. *Respiratory Therapy*. Disponível em: <<https://www.omron-healthcare.com/en/microair-u100>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

OMS. **Chronic respiratory diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>>. Acesso em: 10 dez. 2018.



PAUDEL, Amrit et al. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.015>>.

PERRONE, Ítalo Tuler et al. Soro Em Pó: Estado Vítreo E Condições De Operação Do Spray Dryer. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 71, n. 2, p. 106, 2016. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/527>>.

QI, Aisha et al. Miniature inhalation therapy platform using surface acoustic wave microfluidic atomization. *Lab on a Chip*, v. 9, n. 15, p. 2184, 2009. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b903575c>>.

QIAO, Congde et al. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry*, v. 235, p. 45–50, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.045>>.

RAWAL, Tejal; PATEL, Snehal; BUTANI, Shital. Chitosan nanoparticles as a promising approach for pulmonary delivery of bedaquiline. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 124, n. March, p. 273–287, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098718304032>>.

SEALE, J Paul. Anticholinergic bronchodilators. *Australian Prescriber*, v. 26, n. 2, p. 33–35, 2003.

SIEPMANN, Juergen; SIEPMANN, Florence. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 351–362, jul. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911009588>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SILVERSTEIN, Robert Milton.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Grupo Gen - LTC, 2006.

SINGH, Abhishek; MOOTER, Guy Van Den. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 27–50, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>>.

SOSNIK, Alejandro; SEREMETA, Katia P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40–54, 2015.

TELKO, Martin J.; HICKEY, Anthony J. Dry powder inhaler formulation. *Respir. Care*. [S.l: s.n.], 2005. p. 1209–1227.

TORBECK, Lynn D. *Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design*. Nova York: Informa Healthcare, 2007.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21334>>.

USP. *United States Pharmacopeia*. 2009, [S.l: s.n.], 2009. p. 2685.

VALÉRIO, Alexsandra et al. Biopolymer-hydrophobic drug fibers and the delivery mechanisms for sustained release applications. *European Polymer Journal*, v. 112, p. 400–410, mar. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305718313132>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

VEIGA, Francisco; PECORELLI, Catarina; RIBEIRO, Laura. *As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*. 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006.

VENTURINI, Cristina de Garcia et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01000422008000200032&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01000422008000200032&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 14 fev. 2019.

VINJAMURI, Bhavani Prasad; HAWARE, Rahul V; STAGNER, William C. Inhalable Ipratropium Bromide Particle Engineering with Multicriteria Optimization. *AAPS PharmSciTech*, n. 6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0668-y>>.

WAUTHOZ, Nathalie et al. Impact of capsule type on aerodynamic performance of inhalation products: A case study using a formoterol-lactose binary or ternary blend. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 553, n. 1–2, p. 47–56, dez. 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517318307695>>.

XIAO, Chuan Fan et al. Investigation of inclusion complex of Epothilone A with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, n. 1, p. 297–305, 2014.

ZANEN, P.; GO, L. T.; LAMMERS, J. W. Optimal particle size for beta 2 agonist and anticholinergic aerosols in patients with severe airflow obstruction. *Thorax*, v. 51, n. 10, p. 977–980, 1 out. 1996. Disponível em: <<http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thx.51.10.977>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

ZHANG, Lan et al. Sustained therapeutic efficacy of budesonide-loaded chitosan swellable microparticles after lung delivery: Influence of in vitro release, treatment interval and dose. *Journal of Controlled Release*, v. 283, n. May, p. 163–174, 2018.



## APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE QUANTIFICAÇÃO DE BI

### 1. INTRODUÇÃO

A quantificação de princípios ativos representa um papel fundamental na descoberta de novos fármacos, desenvolvimento de novos medicamentos, estabilidade dos fármacos na forma farmacêutica e controle de qualidade do produto acabado. Dada a importância da mensuração de fármacos o processo analítico deve ser realizado utilizando uma técnica onde os resultados obtidos sejam fidedignos, representando a quantidade real de fármaco na amostra, seja em um ensaio de dissolução ou degradação forçada, por exemplo (FANALI *et. al.*, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a segregação de compostos, devido a interações entre a fase móvel estacionária, sendo a fase móvel composta por uma mistura de solventes polares e apolares e a fase estacionária por uma coluna cromatográfica. Após a separação, ocorre a detecção dos compostos, gerando picos cromatográficos, sendo sua área proporcional a concentração do analito na amostra. As amostras podem se apresentar como a substância isolada em solução ou uma matriz, fato que corrobora para sua utilização em quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas (FANALI *et. al.*, 2017).

O desenvolvimento de um método de quantificação de compostos por CLAE é realizado por meio da adequação de parâmetros do sistema como a coluna cromatográfica, composição da fase móvel, temperatura de análise e forma de detecção, com a finalidade de otimizar a detecção e quantificação da substância de estudo. Para isso é de extrema importância o conhecimento das propriedades físico-químicas e estruturais do analito (FANALI *et. al.*, 2017).

A validação de um método analítico avalia sistematicamente mediante a ensaios experimentais, com o objetivo de comprovar que os resultados obtidos são confiáveis para a finalidade pretendida. O processo de validação segue compêndios e legislações vigentes, no Brasil a mais recente é a RDC Nº 166, publicada em 24 de julho de 2017, como suporte técnico também podem ser utilizados os compêndios de procedimentos de validação disponibilizados pela United States Pharmacopeia (USP) e pela International Conference on Harmonization (ICH) (European Pharmacopeia, 2011; ICH, 2005; USP, 2009).

A quantificação de BI por CLAE reportada nas Farmacopeias Europeia e Americana, utilizando pareamento iônico por fase reversa, que pode diminuir a vida útil da coluna cromatográfica. O método desenvolvido por Simms propõe metodologia em fase reversa sem a utilização de íon pareador, a proporção de solventes orgânicos e aquosos na fase móvel ocorre em gradiente, o que permite a detecção de cinco compostos, sendo quatro desses produtos de degradação (SIMMS et al., 1998).

O método de quantificação do BI foi reproduzido de Simms *et al.* (1998) e adaptado de acordo com sistema desenvolvido. A quantificação do BI foi realizada em solução do composto isolado e quando em complexo com as CDs e QTS. Os parâmetros avaliados para validação do método analítico foram linearidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, especificidade, precisão e exatidão.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

O BI que foi doado pelos Laboratórios Teuto Brasileiro S/A, Anápolis-GO e Prati-Donaduzzi, Toledo-PR. As ciclodextrinas (CDs): beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) foram doadas pela empresa Labonathus (Campinas, Brasil), representante nacional da Roquette Coporate (Iestem, França). A lactose (LAC) DMV Fonterra Excipients (Goch, Alemanha) e a quitosana (QTS) de baixo peso molecular SigmaAldrich (São Paulo, Brasil) foram adquiridas de seus respectivos fabricantes.

As formulações foram desenvolvidas na Central de cromatografia (Central Crom) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. Os solventes utilizados são grau CLAE, os sais de grau analítico e a água ultrapura foi obtida pelo sistema gradiente Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

### 2.2 METODOLOGIA ANALITICA POR CLAE

A validação do método analítico foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos), acoplado a detector UV/Vis, bomba binária e amostrador automatizado.

A quantificação do BI realizada em fase reversa utilizando a coluna analítica Purosphere® Star RP-18 Endcapped (Merck Millipore,

Alemanha), 150 x 4.6 mm x 5 $\mu$ m, temperatura de análise de 35 °C. A fase móvel é constituída de duas fases, Fase A: tampão fosfato monopotássico pH 4,0, ajustado com ácido fosfórico 85% e Fase B: Acetonitrila, sendo de caráter gradiente, detalhado no quadro 1.

Para detecção foi utilizado UV a 210 nm, o volume de injeção da amostra de 40  $\mu$ L e o fluxo de fase móvel de 1mL/min.

Quadro 1 - Gradiente utilizado na quantificação de BI.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Condição
0-4,99	80	20	Estabilização
5,0-7,99	55	45	Rampa
8,0-12,99	55	45	Estabilização
13,0-15,0	20	20	Rampa

Fonte: A autora.

A solução estoque é constituída de 10 mg de BI e 10 mL de ácido acético 1,5 %, as diluições são realizadas em água ultrapura. Para extração do BI das formulações e posterior quantificação, são utilizados os mesmos meios, solução estoque com ácido acético 1,5% e diluições em água ultrapura. O ácido acético foi selecionado devido a solubilização dos complexos contendo QTS e por proporcionar um pH ácido às soluções, onde ocorre hidrólise dos complexos com CDs e liberação do BI para quantificação.

Para a validação do método de quantificação a RDC N° 166 (2017) foi utilizada como referência, além disso, a USP (2009) e a ICH (2005) auxiliaram nos ensaios experimentais. Essas literaturas norteiam acerca de parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, e robustez do método (BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP, 2009).

Três curvas analíticas independentes, em cinco concentrações (10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ g/mL), compuseram a linearidade. Utilizando as concentrações de BI e as respectivas áreas dos picos cromatográficos foi construída uma curva analítica, por meio da equação da reta estima-se a concentração do fármaco, desde que o coeficiente de correlação seja aproximadamente igual a um. Ademais, a regressão linear foi realizada para avaliar estatisticamente a relação entre as variáveis.

Utilizando dados de desvio padrão do intercepto e a média da inclinação das três curvas obtidas, foram calculados os limites de detecção (Equação 1) e quantificação (Equação 2) do BI. Esses parâmetros que indicam a sensibilidade do método cromatográfico.

Para a obtenção dos mesmos são aplicadas as equações matemáticas mostradas abaixo, em que  $\sigma$  representa a o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e S a inclinação da curva de calibração.

$$LD = \frac{3\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (2)$$

A especificidade foi determinada frente aos carreadores a serem utilizados para o desenvolvimento das formulações, foram esses a  $\beta$ -CD, a HP- $\beta$ -CD e a QTS. A propriedade de especificidade é validada quando não há interferência dos demais componentes da formulação na quantificação do fármaco ou dos fármacos de trabalho.

A precisão foi determinada por meio de três concentrações (baixa, média e alta), realizada em triplicata, expressa pela dispersão dos resultados, utilizando o desvio padrão relativo (DPR).

A exatidão deve contemplar três níveis de concentração de fármaco (baixa, média e alta), com três réplicas de cada nível. Para o preparo das amostras foram utilizadas as matrizes das formulações, com seus respectivos carreadores e o fármaco na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ . Foi realizada com a adição de padrão a 20, 40 e 80  $\mu\text{g/mL}$  nas amostras, a exatidão foi expressa em recuperação do analito e DPR.

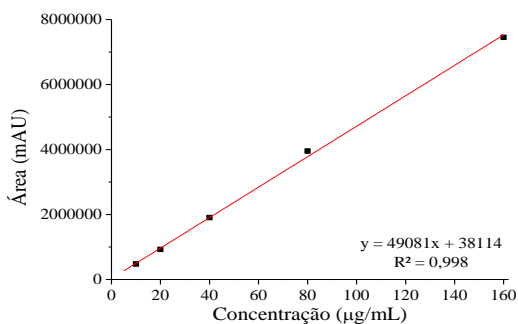
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de quantificação do BI adaptada de Simms e colaboradores (1998) apresenta tempo de retenção de 8 min e tempo total de análise de 15 min, o método original relata tempo de retenção do BI em 7,95 min e tempo de análise de 20 min. Devido ao autor realizar um estudo de degradação do BI, com a detecção de mais de um composto, o tempo de análise foi reduzido até suficiente formação do pico do BI e estabilização do gradiente da fase móvel.

A curva de calibração está representada na Figura 1, o coeficiente de correlação linear foi de 0,998 no intervalo de concentração 10 a 160  $\mu\text{g/mL}$ , a equação da reta foi igual a  $y = 49081x + 38114$ . A análise de regressão linear demonstrou que os dados possuem correlação, apresentando R múltiplo igual a 0,999,  $R^2$  de 0,998 e  $R^2$  ajustado igual a 0,998, no teste F apresentou  $F_{\text{calculado}}$  igual a 2641,22 e  $F_{\text{crítico}}$  de  $6,6 \times 10^{-7}$  e  $p < 0,05$ .

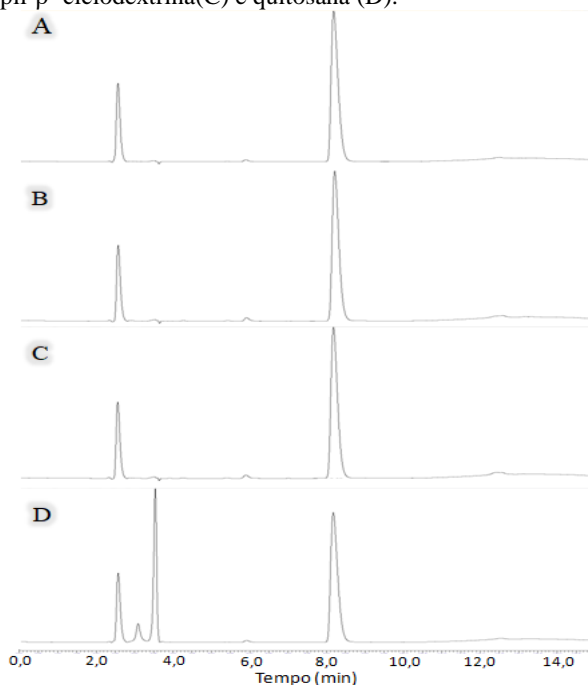


Figura 1 – Curva de calibração média obtida para o método de CLAE para quantificação de BI, equação da reta e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



Fonte: A autora.

Figura 2 – Cromatograma padrão do brometo de ipratrópio (A), cromatogramas da solução padrão com adição dos carreadores  $\beta$ -ciclodextrina (B), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (C) e quitosana (D).



Fonte: A autora.

O limite de detecção do método analítico foi de 2,55 µg/mL e o de quantificação 8,48 µg/mL, os quais foram calculados por meio dos dados das três curvas realizadas para linearidade.

Os cromatogramas das soluções contendo o fármaco a 80 µg/mL e cada um dos carreadores estão demonstrados na Figura 2. O método foi seletivo para o BI, quando os carreadores β-CD, HP-β-CD e QTS foram utilizados, não sendo detectados picos interferentes na quantificação do fármaco.

Foi possível observar que as CDs não são detectadas pelo método, entretanto, a QTS foi detectada no início do cromatograma, devido a absorção nesse comprimento de onda e condições que propiciaram sua retenção temporária na coluna cromatográfica.

Os resultados expostos na Tabela 1 indicam que o método é preciso, com resultados pouco dispersos.

Pela análise do DPR nota-se que concentrações baixas de BI geram maior dispersão dos resultados, ainda assim dentro da faixa aceitável.

Na concentração média estudada se obteve uma dispersão menor dos resultados, o que pode ser considerado uma vantagem do método, já que as concentrações de trabalho, para quantificação de BI nas formulações e outros ensaios, se encontra entre os valores médios da curva de calibração.

Tabela 1 – Dados de precisão obtidos para o BI, média de três concentrações realizada em triplicata.

Concentração (µg/mL)	Teor médio (%)	DPR (%)
10	99,78025	4,52
40	100,6476	0,15
160	98,76895	1,81

Fonte: A autora.

Para exatidão foram preparadas soluções das formulações finais, contendo BI a 80 µg/mL, a estas adicionadas concentrações de 20, 40 e 80 µg/mL de solução padrão de BI. Os resultados estão expressos na Tabela 2, os quais demonstram exatidão do método analítico, devido a recuperação de BI apresentar-se próxima a 100%.

Tabela 2 – Resultados relativos a exatidão do método analítico de quantificação do BI.

Matriz	Concentração adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
$\beta$ -CD	20	97,60	0,003
	40	99,95	1,333
	80	99,64	1,203
HP- $\beta$ -CD	20	95,70	0,402
	40	100,51	0,026
	80	103,95	0,009
QTS	20	97,31	0,182
	40	102,07	0,101
	80	106,48	2,960

Fonte: A autora.

Os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos limites aceitos pela legislação brasileira, sendo considerado validado quanto a linearidade, seletividade, precisão e exatidão.

### 3. CONCLUSÃO

O método adaptado de Simms e colaboradores (1998) para quantificação de BI foi considerado linear, seletivo, preciso e exato, detectando BI a concentração de  $2,55 \mu\text{g/mL}$  e quantificando-o a partir de  $8,48 \mu\text{g/mL}$ . A utilização de um pH baixo nas soluções amostras não interferiu as quantificações. A validação desta metodologia de quantificação do BI corrobora para aquisição de resultados confiáveis durante os ensaios realizados com o BI e as formulações finais.

### REFERÊNCIAS

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC N<sup>o</sup> 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. 2017, Brasília: Anvisa, 2017. p. 11.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, p. 21–25, 1998.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. European Pharmacopeia 7.0.

2011, [S.I: s.n.], 2011. p. 2277–2278.

FANALI, Salvatore et al. **Liquid chromatography**. 2. ed. Estados Unidos: Elsevier, 2017.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005, Geneva, Switzerland: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

SIMMS, Peter J. et al. The separation of ipratropium bromide and its related compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 841–849, 1998.

USP. United States Pharmacopeia. 2009, [S.I: s.n.], 2009. p. 2685.

## APÊNDICE B - CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO E RESPOSTAS OBTIDAS PARA AS FORMULAÇÕES CONTENDO APENAS OS CARREADORES

Tabela 1 - Condições de produção das formulações ausentes de fármaco, selecionadas por metodologia de superfície de resposta, rendimento e tamanho de partícula obtidas como respostas.

	Condições de produção				Respostas	
	Aspiração (%)	Concentração (%)	Temperatura de entrada (°C)	Carreador	Rendimento (%)	Tamanho de partícula (µm)*
Q2	100	1	130	QTS	56,73	4,12
B1	70	1	130	β-CD	49,34	3,06
Q5	100	0,76	110	QTS	50,74	3,75
Q9	85	1	120	QTS	31,28	4,19
H5	87	3	110	HP-β-CD	78,62	3,53
B2	100	2	130	β-CD	47,93	4,54
Q1	70	0,5	130	QTS	44,28	2,46
Q7	89	1	118	QTS	58,81	4,65
H3	70	3	110	HP-β-CD	68,84	3,75
H6	100	1	130	HP-β-CD	62,4	2,91
B3	92	1	145	β-CD	52,04	2,23
B4	85	1,5	135	β-CD	47,31	2,69
B5	70	2	150	β-CD	55,72	2,73
H7	70	1	122	HP-β-CD	71,12	2,73
Q3	100	0,5	110	QTS	55,34	3,08
B1	70	2	150	β-CD	55,72	2,73
H2	85	2	120	HP-β-CD	70,19	3,37
H4	83	3	130	HP-β-CD	71,91	3,18
Q8	78	0,5	116	QTS	55,34	3,59
RH1	87	3	110	HP-β-CD	78,62	3,53
H8	100	3	117	HP-β-CD	50	3,4
Q6	70	0,56	110	QTS	50,57	4,39
H1	73	2,4	121	HP-β-CD	65,53	3,87

RQ1	70	0,56	110	QTS	50,57	4,39
B6	100	3	150	$\beta$ -CD	57,65	2,7
B7	85	2	140	$\beta$ -CD	53,07	2,13
Q4	70	0,76	130	QTS	42,24	3,67
B8	93	3	134	$\beta$ -CD	50,12	2,98
RH3	83	3	130	HP- $\beta$ -CD	71,91	3,18
B0	100	3	150	$\beta$ -CD	63,39	2,34
H0	100	3	130	HP- $\beta$ -CD	50	2,44
Q0	100	3	180	QTS	68,03	2,72

\*Obtido por análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: A autora.

## APÊNDICE C - CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO E RESPOSTAS OBTIDAS PARA AS FORMULAÇÕES CONTENDO O FÁRMACO, AVALIAÇÃO DA DENSIDADE E TAMANHO DE PARTÍCULA

Tabela 1 - Condições de produção das formulações contendo fármaco e respectivas respostas de rendimento e doseamento.

	Condições de produção					Respostas	
	Aspiração (%)	Carreador (%)	BI (%)	Temperatura de entrada (°C)	Carreador	Rendimento (%)	Doseamento de BI (%)
F1	89	1,357	0,39	175	β-CD	60,95	63,98
F2	89	1,357	0,39	150	β-CD	52,99	66,62
F3	73	1,016	0,27	150	HP-β-CD	59,05	85,67
<b>F4</b>	<b>73</b>	<b>1,016</b>	<b>0,27</b>	<b>175</b>	<b>HP-β-CD</b>	<b>66,31</b>	<b>90,99</b>
<b>F5</b>	<b>100</b>	<b>0,32</b>	<b>0,28</b>	<b>160</b>	<b>QTS</b>	<b>63,77</b>	<b>92,25</b>
<b>F6</b>	<b>93</b>	<b>0,56</b>	<b>0,2</b>	<b>160</b>	<b>β-CD/QTS</b>	<b>54,3</b>	<b>69,05</b>
F7	100	1	0,5	160	QTS	30,78	79,51
F8	99	1,5	0,38	146	QTS	44,24	56,02
F9	99	1,5	0,38	158	QTS	14,07	74,38
F10	93	1	0,25	131	QTS	14,37	66,41
F11	10	5,64	0,75	124	HP-β-CD	59,5	63,65
F12	88	1,39	0,25	136	β-CD	65,75	68,72
F13	83	5,1	0,68	119	HP-β-CD	58,81	62,03
<b>F14</b>	<b>89</b>	<b>1,6</b>	<b>0,29</b>	<b>150</b>	<b>β-CD</b>	<b>73,38</b>	<b>79,1</b>
F15	83	1,65	0,3	136	β-CD	61,87	36,38
F16	100	0	0,81	150	Ausente	14,47	100

**Destacadas em negrito as formulações selecionadas.**

Fonte: A autora.

Tabela 2 - Densidades *bulk* e *tapp*, classificação quanto ao fluxo e dados de tamanho de partícula obtidos para as formulações contendo brometo de ipratrópio.

	Densidades*					Tamanho de partícula**					
	$\sigma_{bulk}$ (g/mL)	$\sigma_{tapp}$ (g/mL)	Índice de Carr	Relação de Hausner	Classificação	D <sub>m</sub> ( $\mu$ m)	D <sub>50</sub> ( $\mu$ m)	D <sub>10</sub> ( $\mu$ m)	D <sub>90</sub> ( $\mu$ m)	Span	Daer ( $\mu$ m)
F1	0,23	0,37	36,76	1,58	Muito pobre	6,79	7,28	3,89	11,34	1,1	5,38
F2	0,24	0,37	36,51	1,58	Muito pobre	6,97	7,49	4,02	11,64	1,09	5,39
F3	0,34	0,48	28,21	1,39	Pobre	5,71	6,24	2,82	10,43	1,33	4,54
<b>F4</b>	<b>0,29</b>	<b>0,49</b>	<b>40,24</b>	<b>1,67</b>	<b>Extremamente pobre</b>	<b>5,28</b>	<b>4,98</b>	<b>2,2</b>	<b>8,68</b>	<b>1,3</b>	<b>5,12</b>
<b>F5</b>	<b>0,23</b>	<b>0,33</b>	<b>31,34</b>	<b>1,46</b>	<b>Pobre</b>	<b>6,15</b>	<b>6,59</b>	<b>3,55</b>	<b>10,35</b>	<b>1,11</b>	<b>4,68</b>
<b>F6</b>	<b>0,31</b>	<b>0,47</b>	<b>33,33</b>	<b>1,5</b>	<b>Muito pobre</b>	<b>6,85</b>	<b>7,27</b>	<b>4,23</b>	<b>11,01</b>	<b>0,99</b>	<b>5,46</b>
F7	0,45	0,59	23,16	1,3	Aceitável	7,4	7,84	4,64	11,73	0,96	6,29
F8	0,32	0,76	57,48	2,35	Extremamente pobre	7,15	7,62	4,44	11,59	1	5,45
F9	0,24	0,47	48,15	1,93	Extremamente pobre	8,09	8,69	4,89	13,55	1,07	6,17
F10	0,21	0,39	46,15	1,86	Extremamente pobre	8,45	9,12	4,85	14,53	1,15	6,1
F11	0,34	0,54	36,07	1,56	Extremamente pobre	6,13	6,51	3,56	10	1,05	5,42
F12	0,25	0,43	41,1	1,7	Extremamente pobre	6,53	6,97	3,85	10,76	1,06	5,41
F13	0,31	0,58	47,42	1,9	Extremamente pobre	5,73	6,09	3,24	9,49	1,09	4,7
<b>F14</b>	<b>0,27</b>	<b>0,39</b>	<b>31,94</b>	<b>1,47</b>	<b>Muito pobre</b>	<b>6,13</b>	<b>6,54</b>	<b>3,48</b>	<b>10,19</b>	<b>1,09</b>	<b>5,39</b>
F15	0,25	0,35	29,73	1,42	Pobre	6,45	6,87	3,77	10,61	1,06	5,41
F16	0,31	0,71	56,25	2,29	Extremamente pobre	12,2	13,46	6,73	22,51	1,29	10,24

\*Realizadas pelo método da proveta.

\*\*Obtidos por difração a laser e relações matemáticas.

**Destacadas em negrito as formulações selecionadas.**

Fonte: A autora.