

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

Partículas submicrométricas de fármaco obtidas por *Nano Spray Dryer*[®] destinadas à administração pulmonar

TAÍS LUSA DURLI

PORTO ALEGRE, 2012

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

Partículas submicrométricas de fármaco obtidas por *Nano Spray Dryer*[®] destinadas à administração pulmonar

Dissertação apresentada por **Taís Lusa Durli**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Coorientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 27.03.2012, aprovada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Clarice Rolim
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Durli, Taís Lusa
Partículas submicrométricas de fármaco obtidas por
Nano Spray Dryer® destinadas à administração pulmonar
/ Taís Lusa Durli. -- 2012.
132 f.

Orientador: Sílvia Stanisçuaski Guterres.
Coorientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Nano Spray Dryer. 2. partículas
submicrométricas. 3. corticóides. 4. deposição
pulmonar. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski, orient.
II. Beck, Ruy Carlos Ruver, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 405 e 103 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia e no Laboratório K 204 do Departamento de Química no Instituto de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos CAPES.

AGRADECIMENTOS

À professora Sílvia Guterres pela oportunidade, confiança, apoio, incentivo, ensinamentos, discussões científicas, paciência e pelo exemplo pessoal e profissional.

Aos professores Ruy Beck e Adriana Pohlmann pelas correções, discussões científicas, dicas, ensinamentos e por toda a atenção dispensada nesse trabalho.

Aos colegas Márcia Fontana e Frantiescoli Dimer pelo auxílio no desenvolvimento do primeiro capítulo desse trabalho, pelas discussões científicas, conversas, aprendizado, trabalho em equipe, parceria e amizade.

Aos demais colegas Tatiele, Karina, Renata, Cássia, Aline, Karine, Cris, Fernanda, Kelly, Evelise, Manoel e Noé pelo apoio, incentivo, conversas, ensinamentos, discussões científicas e pelos momentos de lazer e descontração.

Às colegas Cristiane Hoffmeister, Letícia Colomé e Renata Raffin por toda ajuda, ensino, paciência, dedicação e apoio dispensados durante a minha iniciação científica que foram fundamentais para eu me tornar pesquisadora e conseguir desenvolver esse trabalho com êxito.

À minha família, principalmente meu pai, minha mãe e meu irmão pelo apoio, incentivo, carinho, paciência e principalmente por terem acreditado e confiado em mim.

Aos meus amigos que estão ao meu lado desde a infância pelo apoio, incentivo, ajuda, momentos de lazer e paciência nos muitos momentos em que minha ausência fez-se necessária.

À Deus por todas as oportunidades recebidas até hoje.

À Capes, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente dissertação foi redigida na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução, contendo a apresentação do tema e a formulação das hipóteses de trabalho;
- Objetivos: geral e específicos;
- Revisão da literatura;
- Capítulo I: artigo em redação que se refere às diferentes etapas do trabalho realizado a ser submetido no periódico *Journal of Nanoparticle Reserch*;
- Capítulo II: artigo em redação que se refere às diferentes etapas do trabalho realizado a ser submetido em periódico ainda não definido;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Perspectivas do trabalho;
- Referências bibliográficas.

RESUMO

O *Nano Spray Dryer* é um equipamento desenvolvido recentemente pela empresa Büchi que utiliza a atomização vibracional para gerar partículas com tamanhos reduzidos (300 nm a 5 µm). O primeiro capítulo desse trabalho tem como objetivo desenvolver partículas sólidas com tamanho reduzido partindo-se de uma solução de fármaco (dexametasona), utilizando o equipamento *Nano Spray Dryer* e avaliar os fatores que influenciam na obtenção dos pós. O tipo de solvente utilizado influenciou na viscosidade e na tensão superficial das soluções e isso refletiu no rendimento do processo. A presença de tensoativos iônicos aumentou o rendimento do processo. As partículas foram obtidas na forma de aglomerados que se redispersam em partículas menores (difração de laser em meio aquoso) quando submetidos a uma força. O tamanho reduzido, em torno de 1 µm, também pode ser visualizado por microscopia eletrônica de varredura. Foi possível obter, de forma direta, partículas submicrométricas de fármaco com características ideais para administração pulmonar. A budesonida é um glicocorticóide muito potente utilizado no tratamento da asma, porém para as partículas se depositarem de forma efetiva no pulmão e não ficarem aderidas na cavidade orofaríngea, necessitam ter um diâmetro aerodinâmico compreendido entre 1 e 5 µm. Com base nisso buscou-se desenvolver partículas de budesonida com diâmetro aerodinâmico reduzido, por *Nano Spray Dryer*. Os pós NSD (budesonida + deoxicolato de sódio) e NSD LEU (budesonida + deoxicolato de sódio + leucina) apresentaram elevado rendimento (acima de 60%), elevado teor de fármaco (acima de 90%), baixo teor de umidade (inferior a 2%) e tamanho médio de partícula de 1 µm. A densidade foi de 0,3 g/cm³ e o diâmetro aerodinâmico teórico ficou em torno de 0,5 µm. Devido ao reduzido tamanho e elevada área superficial, a budesonida obtida por *Nano Spray Dryer* apresentou uma maior velocidade de dissolução comparada à matéria prima e ao produto comercial Busonid[®]. O processo de secagem provavelmente resultou na amorfização das substâncias, conforme analisado por calorimetria exploratória diferencial. Assim, concluímos que foi possível a obtenção de partículas de budesonida de reduzido diâmetro aerodinâmico por *Nano Spray Dryer* destinadas ao tratamento da asma.

Palavras chave: *Nano Spray Dryer*, dexametasona, budesonida, partículas submicrométricas, diâmetro aerodinâmico, pulmonar.

ABSTRACT

Drug submicron particles obtained by *Nano Spray Dryer* intended to pulmonary administration

Nano Spray Dryer is new equipment developed recently by Büchi that uses vibrational atomization to generate small particles (300 nm to 5 µm). The first chapter of this work aims to obtain solid particles with small size starting from a drug solution (dexamethasone) through the *Nano Spray Dryer* equipment and to assess the factors that influence the production. The kind of solvent influenced the viscosity and surface tension of solutions and this reflected in the process yield. The presence of ionic surfactants provides particles that deagglomerate into smaller ones when subjected to a force, as can be seen by laser diffractometry in aqueous medium. The small size, around 1 µm, can also be visualized by scanning electron microscopy. Thus, it was possible to obtain directly submicron drug particles that have characteristics suitable for pulmonary administration. Budesonide is a potent glucocorticoid used in the asthma treatment. One disadvantage with pulmonary drug delivery is the poor deposition efficiency, and to get pulmonary deposition the particles need to have an aerodynamic diameter in the range of 1-5 µm to bypass the mouth and throat. So, we sought to develop budesonide particles with reduced aerodynamic diameter by *Nano Spray Dryer*. The NSD (budesonide + sodium deoxycholate) and NSD LEU (budesonide + sodium deoxycholate + leucine) powders showed high yields (above 60%), high drug content (above 90%), low moisture content (less than 2%) and particle size of 1 µm. The particle density was about 0.3 g/cm³ and theoretical aerodynamic diameter was about 0.5 µm. Due to its small size and high surface area, budesonide obtained by *Nano Spray Dryer* dissolved faster than raw material and commercial product Busonid[®]. The *spray drying* process probably resulted in the amorphization of the substances that were analyzed by differential scanning calorimetry. Therefore, we conclude that it was possible to obtain budesonide small particles with low aerodynamic diameter by *Nano Spray Dryer* intended to asthma treatment.

Keywords: *Nano Spray Dryer*, dexamethasone, budesonide, submicron particles, aerodynamic diameter, pulmonary.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 <i>Spray Drying</i>	27
3.2 <i>Nano Spray Dryer</i>	29
3.3 Sistemas Nano e Microestruturados	32
3.4 Asma	34
3.5 Farmacoterapia utilizada no tratamento da asma	35
3.6 A via pulmonar e o uso do <i>Nano Spray Dryer</i>	36
4. CAPÍTULO I - Obtenção direta de partículas submicrométricas a partir de uma solução orgânica utilizando o equipamento <i>Nano Spray Dryer</i>.	41
Publicação 1: Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization <i>spray drying</i> : influence of the type of solvent and surfactant.....	45
5. CAPÍTULO II - Obtenção de partículas sólidas de budesonida por <i>Nano Spray Dryer</i>[®] destinadas ao tratamento da asma.	75
Publicação 2: Partículas sólidas de reduzido diâmetro aerodinâmico contendo budesonida preparadas por <i>Nano Spray Dryer</i> [®] destinadas ao tratamento da asma.	77
6. DISCUSSÃO GERAL	105
7. CONCLUSÕES GERAIS	113
8. PERSPECTIVAS	117
9. REFERÊNCIAS	123

1. INTRODUÇÃO

Spray drying é uma técnica de secagem que permite a conversão de líquidos em suas respectivas partículas sólidas (GOULA *et al.*, 2004) e vem sendo utilizada há muitos anos pela indústria farmacêutica (para aumentar a estabilidade física de soluções, suspensões e emulsões) e alimentícia (para facilitar o transporte e o armazenamento de quantidades elevadas de alimentos, contribuindo também no aumento da estabilidade) (CAL e SOLLOHUB, 2010). Esta técnica pode ser dividida em quatro etapas principais que são: (i) atomização da solução a ser convertida em partículas sólidas, (ii) secagem das gotículas obtidas após entrar em contato com o gás de secagem a elevadas temperaturas, (iii) evaporação do solvente e (iv) separação do pó obtido e coleta de forma adequada (MASTERS, 1968). Esta técnica permite a obtenção de partículas sólidas com estreita distribuição granulométrica e em uma única etapa.

A empresa suíça Büchi desenvolveu recentemente a última geração de *spray dryers* para escala laboratorial chamado *Nano Spray Dryer* que possibilita obter partículas com reduzidos diâmetros (300 nm a 5 μm), utilizando pequenas quantidades de amostras, diferentemente dos *Spray Dryers* convencionais. Em geral, as partículas obtidas através deste novo equipamento possuem um tamanho muito inferior ao tamanho das partículas obtidas por *Spray Dryer* convencional.

A principal modificação nesse equipamento diz respeito ao uso da tecnologia piezoelétrica no processo de atomização, que faz vibrar uma fina membrana de aço a velocidades ultrassônicas, forçando a passagem do líquido através dos seus estreitos poros (SCHMID *et al.*, 2010). Outra importante etapa modificada diz respeito à coleta de finas partículas que são depositadas em um cilindro coletor localizado na parte inferior do equipamento que, devido a geração de um campo elétrico, provoca a atração das partículas. Essa alteração possibilitou a coleta de partículas com tamanhos muito reduzidos porque é independente da massa da partícula (MOSEN *et al.*, 2004).

O uso da nanotecnologia na área farmacêutica, seja para o desenvolvimento de medicamentos ou de cosméticos, vem crescendo nos últimos anos devido às inúmeras vantagens que os produtos nanotecnológicos oferecem. Na área de *drug delivery*, o uso de nanopartículas é mais promissor frente ao de micropartículas, devido ao seu reduzido tamanho e elevada área superficial. De acordo com alguns estudos, os autores concluíram que nanopartículas possuem vantagens com relação

às micropartículas como um perfil de dissolução mais rápido (HENG *et al.*, 2008), maior efeito oclusivo em cosméticos, o que contribui no aumento da hidratação (MULLER e DINGLER, 1998), maior penetração das partículas na pele e capacidade de atravessar membranas biológicas (SOUTO e MULLER, 2008) e, além disso, as nanopartículas são pelo menos 10 vezes menores que as micropartículas, o que permite que elas sejam administradas pela via intravenosa sem riscos de embolia (COUVREUR *et al.*, 2002).

Partículas sólidas de fármacos vêm sendo bastante utilizadas no tratamento da asma e outras doenças das vias respiratórias empregando dispositivos inalatórios (Dry Powder Inhaler- DPI) (LEAROYD *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2011; NOLAN *et al.*, 2011). A asma é uma doença caracterizada pela obstrução variável das vias aéreas que é secundária a um padrão de inflamação alérgico e tem se tornado uma das doenças mais prevalentes no mundo, sendo que o número de indivíduos afetados vem aumentando a cada ano (BARNES, 2011). Quando foi descrita em 1860 por SALTER, acreditava-se que as crises de falta de ar fossem causadas apenas pela contração dos músculos; hoje já se sabe que há também muitos mediadores inflamatórios envolvidos nessa patologia. A inflamação crônica pode levar a mudanças estruturais das vias aéreas, incluindo as células do músculo liso, fibrose, angiogênese e hiperplasia das células secretoras de muco (BARNES, 2011). Além disso, sabe-se também que a inflamação não se restringe apenas à área central, mas ocorre também nas vias aéreas inferiores (MARTIN, 2002).

Há duas classes principais de fármacos sendo utilizadas na terapia da asma: os broncodilatadores e os anti-inflamatórios. Dentre os agentes anti-inflamatórios, os corticóides são de longe os mais efetivos para controlar a doença, sendo que os inalatórios se tornaram o pilar para o tratamento dos pacientes com sintomas persistentes (BARNES, 2011).

A budesonida é um potente corticosteróide não halogenado com elevada afinidade pelo receptor glicocorticóide, elevada seletividade pelas vias aéreas e prolongada retenção tecidual, sendo considerado um dos agentes terapêuticos mais valiosos para o tratamento profilático da asma (EL-GENDI *et al.*, 2009). Entretanto, freqüentes administrações inalatórias podem ocasionar diversos efeitos indesejáveis como supressão do crescimento, afinamento da pele, redução da densidade mineral óssea e catarata (DAHL *et al.*, 2006) e seu uso sistêmico pode ocasionar severos

efeitos adversos como supressão adrenocortical, síndrome de Cushing e osteoporose (SAMARAS *et al.*, 2005). Este fármaco possui elevada taxa de ligação a proteínas plasmáticas (88%) e sua biodisponibilidade após administração oral é em torno de 10%, por isso seu uso pela via pulmonar é uma alternativa promissora.

A via pulmonar é utilizada como primeira escolha para o tratamento de doenças das vias aéreas. Porém, há uma forte resistência dos pacientes ao uso desta via devido ao número excessivo de repetições que devem ser realizadas (HOLGATE e POLOSA, 2008, 2006), resultando em uma baixa adesão ao tratamento e manuseio incorreto dos dispositivos (HOLGATE e POLOSA, 2006; BARNES, 2008). Além disso, acredita-se que apenas de 10 a 15% da dose chega efetivamente aos brônquios (RASENACK *et al.*, 2003), 10% atinge os alvéolos (EL-GENDI *et al.*, 2009) e o restante acaba se perdendo na cavidade orofaríngea. Desta forma, um dos maiores desafios para a terapia de doenças utilizando a via pulmonar é a distribuição do fármaco nas vias aéreas. Isso pode ser contornado com o uso de partículas com tamanhos menores que consigam evitar a adesão na cavidade orofaríngea e chegar até o local desejado, que são as partes mais profundas do pulmão (LEAROYD *et al.*, 2008).

Para conseguir ultrapassar a boca e a garganta e, conseqüentemente, alcançar os pulmões, as partículas devem ter um diâmetro aerodinâmico compreendido entre 1 e 5 μm (SHI *et al.*, 2007). Alguns autores relatam que partículas com tamanho inferior a 1 μm não são desejáveis pois seriam facilmente exaladas antes da deposição (LINDFORS *et al.*, 2006, SHI *et al.*, 2007).

Visto que o equipamento *Nano Spray Dryer* foi desenvolvido para possibilitar a obtenção de partículas sólidas com reduzido tamanho, esse trabalho tem como objetivo avaliar se é possível a obtenção, de maneira direta, de partículas de fármaco com reduzido diâmetro utilizando esse equipamento e avaliar também se esse pó obtido apresenta características adequadas para ser administrado através da via pulmonar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta dissertação tem como objetivo produzir partículas sólidas de tamanho submicrométrico partindo-se de uma solução de dexametasona como fármaco modelo utilizando o equipamento *Nano Spray Dryer*. Os fatores que podem afetar as propriedades físico-químicas e morfológicas das partículas produzidas serão estudados na primeira etapa do trabalho, o que permitirá uma melhor compreensão do funcionamento do equipamento. Subsequentemente, esses conhecimentos são aplicados à produção de partículas sólidas compostas majoritariamente pelo corticóide budesonida, buscando-se um reduzido diâmetro aerodinâmico de partícula e o desenvolvimento de um sistema adequado para administração pulmonar.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização da solução de partida quanto à viscosidade e tensão superficial, empregando análise fatorial do tipo 3^2 , sendo os fatores estudados: o tipo de solvente e de tensoativo;
- Caracterização das partículas produzidas quanto ao rendimento, teor de fármaco, tamanho de partícula, teor de umidade, morfologia e análise calorimétrica;
- Avaliação da influência do tipo de tensoativo (não iônico, aniônico e catiônico) no processo de atração das partículas ao coletor e consequentemente no rendimento do processo;
- Produção de partículas sólidas submicrométricas de budesonida utilizando o equipamento *Nano Spray Dryer*, empregando as condições otimizadas;
- Caracterização das partículas obtidas quanto ao rendimento do processo, diâmetro e polidispersão, diâmetro aerodinâmico, teor de fármaco, teor de umidade, morfologia, análises calorimétricas;
- Estudo do perfil de dissolução da budesonida obtida por *Nano Spray Dryer* em comparação a matéria-prima e um produto comercial, utilizando o modelo dos sacos de diálise.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Spray Drying*

A técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) é bastante conhecida e a primeira vez em que seu uso foi descrito foi no ano de 1860. Entretanto, na época, os equipamentos que realizavam a secagem ainda eram muito primitivos e apresentavam limitações quanto à eficiência e a continuidade do processo e essas adversidades contribuíam para retardar o desenvolvimento e a evolução das pesquisas. A partir de 1920 o seu desenvolvimento passou a ser aprimorado e o equipamento foi introduzido na indústria alimentícia no processo de obtenção do leite em pó (CAL e SOLLOHUB, 2010). O processo de secagem por aspersão consiste na conversão de líquidos contendo partículas sólidas em solução, emulsão ou suspensão na forma respectiva de pó seco (GOULA *et al.*, 2004).

O grande feito histórico responsável pelo aperfeiçoamento da técnica de secagem foi a Segunda Guerra Mundial, em 1945. A necessidade de transporte de grandes quantidades de alimentos com reduzido peso e volume e a necessidade de melhorar a sua conservação fez com que a técnica de secagem fosse aperfeiçoada, visto que ao reduzir o teor de água reduz-se também o risco de contaminação microbiana e o volume ocupado (CAL e SOLLOHUB, 2010). Após o aperfeiçoamento da técnica para o uso na indústria alimentícia durante a Segunda Guerra Mundial, seu uso passou a ser destinado também à indústria farmacêutica.

Entre as principais razões para o emprego da secagem por aspersão na produção de pós é a habilidade tecnológica de obtenção de partículas de forma contínua e com qualidade precisa do produto final (GOULA *et al.*, 2004). O processo de secagem pode ser dividido em quatro etapas principais: (i) atomização da solução a ser convertida em partículas sólidas, (ii) geração de finas gotículas que entram em contato com o gás de secagem a elevadas temperaturas, (iii) evaporação do solvente e (iv) separação do pó obtido a partir do gás de secagem e coleta de forma adequada (CAL e SOLLOHUB, 2011; MASTERS, 1968).

O processo de atomização é a etapa mais importante do processo e consiste na obtenção de pequenas gotículas a partir da solução de alimentação (MASTERS, 1968). A atomização pode ser obtida utilizando diferentes dispositivos como o atomizador rotatório, hidráulico, pneumático e ultrassônico (BITNER *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2004). A seleção do atomizador ideal é de extrema importância, pois deve haver uma máxima taxa de evaporação e uma elevada razão superfície de

spray/massa para garantir as características como homogeneidade e tamanho de gotícula (MASTERS, 1968).

Após a geração das gotículas, elas entram em contato com o gás de secagem, que nada mais é que um gás retirado da atmosfera por um sistema de filtros e pré-aquecido a determinadas temperaturas. O contato do gás de secagem com o atomizador pode ser de três tipos: (i) co-corrente, (ii) contracorrente ou (iii) misto, sendo que a diferença entre eles é a disposição do ar de secagem e do atomizador (CAL e SOLLOHUB, 2010). O fluxo de gás lançado para dentro da torre de secagem é do tipo não laminar, portanto as gotículas entram em contato com diferentes temperaturas e diferentes condições de umidade. Quando se trabalha com solvente orgânico, o uso de gás inerte se faz necessário a fim de que seja evitado o risco de explosão.

A geração de inúmeras gotículas com elevada área superficial faz com que haja uma maior troca de calor e massa. A ampla diferença de temperatura entre o líquido e o ar leva à secagem inicial da gotícula, sendo que o solvente é evaporado de forma muito rápida (TURCHIULI *et al.*, 2011). O solvente evapora a partir da superfície das gotículas que se tornam cada vez mais secas, e após a temperatura do ar diminui e aumenta a umidade relativa (TURCHIULI *et al.*, 2011). Portanto, o tempo de contato da partícula com o gás de elevada temperatura é muito baixo, por isso esse processo é permitido na secagem de substâncias termosensíveis.

Após a secagem, segue-se a coleta das partículas. As partículas são separadas do gás de secagem utilizando um ciclone ou filtros e são lançadas para a base do equipamento seja por dispositivos vibratórios, escovas mecânicas ou fluxo de ar comprimido, sendo coletadas em um dispositivo associado a uma parte do equipamento chamado de cone. Portanto, o processo de separação e deposição ocorre independentemente da massa e partículas com reduzido tamanho deixam de ser coletadas, pois são arrastadas pelo fluxo de ar.

Alterações nas condições operacionais de secagem, dentre elas a natureza do material a ser aspergido, velocidade de alimentação e a temperatura de secagem (CONTE *et al.*, 1994; HE *et al.*, 1999; BILLON *et al.*, 2000) ou até mesmo o modelo do equipamento, influenciam as características do produto obtido. A secagem por aspersão é um processo que compreende uma única etapa e permite que sejam feitos controles das variáveis como tamanho de partícula e morfologia e pode ser

menos destrutivo que outros métodos que também são utilizados para a produção de pós, como a micronização (RABBANI *et al.*, 2005). Além disso, esta técnica pode ser aplicada a fármacos e polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos e materiais sensíveis ao calor, além de permitir um controle do tamanho de partícula (PALMIERI *et al.*, 1994; ESPOSITO *et al.*, 2002), sendo atualmente muito utilizada para obtenção de pós para inalação (BOSQUILLON *et al.*, 2004a; GILANI *et al.*, 2004; NAJAFABADI *et al.*, 2004).

3.2 Nano Spray Dryer

A empresa Büchi desenvolveu recentemente a última geração de equipamentos para secagem por aspersão (*spray drying*) para escala laboratorial chamado *Nano Spray Dryer* (Figura 1) que possibilita obter partículas com reduzidos tamanhos (300 nm a 5 µm), diferentemente dos *Spray Dryers* convencionais. O processo de atomização (geração das gotículas) é realizado de forma inovadora e baseia-se no uso da tecnologia piezoelétrica (Figura 2) em que uma fina membrana de aço inoxidável, localizada no interior do *spray cap*, vibra a frequências ultrassônicas (60 KHz) gerando pequenas gotículas. Os tamanhos de poro da membrana são de 4,0 µm, 5,5 µm e 7,0 µm, dependendo do acessório utilizado, e a sua vibração ocasiona a ejeção de milhões de gotículas por segundo com uma estreita distribuição de tamanho (LI *et al.*, 2010).

Após a aspersão, essas partículas são lançadas para dentro da torre de secagem em um fluxo de ar laminar e ao entrarem em contato com o ar aquecido se tornam partículas sólidas, sendo direcionadas para o coletor de partículas eletrostático. Esse coletor é carregado positivamente na sua parte mais externa e negativamente na sua parte interna (eletrodo de alta voltagem), gerando um campo elétrico que faz com que as partículas sejam atraídas (SCHMID *et al.*, 2010). Essa tecnologia permite a coleta de finas partículas, pois ao contrário do ciclone, é independente da massa, e ainda, permite a obtenção de elevados rendimentos (superiores a 80%).

Esse equipamento, de forma contrária aos *Sprays Dryers* convencionais, não permite que o fluxo seja fixado em um valor. Ajusta-se a taxa de spray em um valor

compreendido entre 0 e 100% que diz respeito à força com que o jato de gotículas será lançado para dentro da torre de secagem, e o próprio equipamento ajusta o fluxo automaticamente dependendo da viscosidade da solução.

Desta forma, esse equipamento possui três inovações tecnológicas que são (i) o uso da tecnologia piezoelétrica para gerar partículas com estreita distribuição de tamanho, (ii) fluxo de ar laminar para promover uma secagem instantânea das gotículas de forma moderada e (iii) o coletor de partículas eletrostático que possibilita a coleta de finas partículas (SCHMID *et al.*, 2010). O *Nano Spray Dryer* pode ser utilizado na área tecnológica, biotecnológica, de materiais e nanotecnológica. O equipamento permite utilizar pequenos volumes de amostra, portanto, pode ser interessante quando se quer realizar estudos com fármacos de elevado valor agregado.

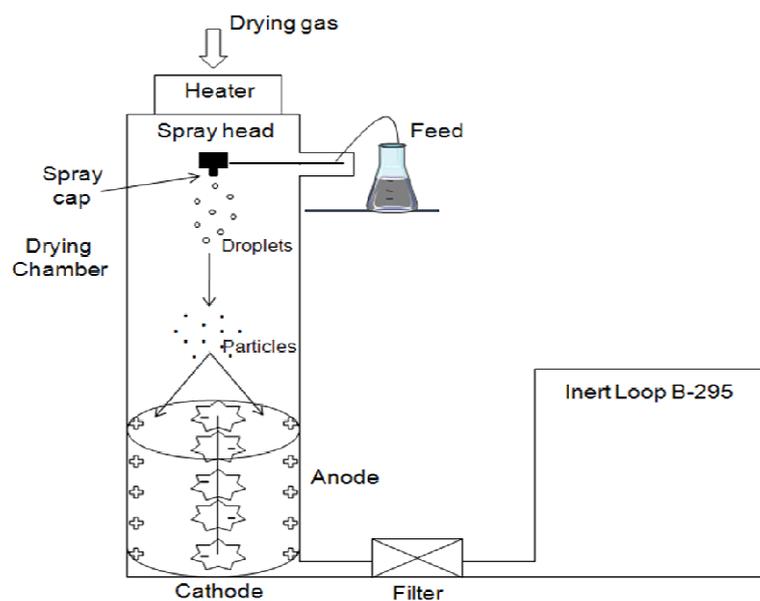


Figura 1. Diagrama esquemático do equipamento *Nano Spray Dryer B-90* desenvolvido pela empresa Büchi.

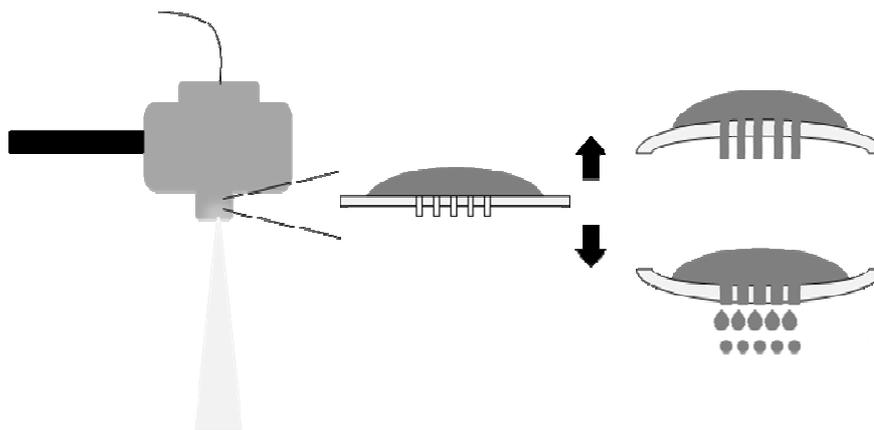


Figura 2. Geração das gotículas a partir da vibração da fina membrana de aço inoxidável através do uso da tecnologia piezoelétrica.

SCHMID e colaboradores (2009) avaliaram a possibilidade de se obter partículas com reduzido tamanho utilizando o equipamento *Nano Spray Dryer*. Soluções aquosas contendo trehalose desidratada nas concentrações de 0,1% e 1,0% sem e com a adição de 0,05% de polissorbato 20 foram secas no equipamento utilizando as temperaturas de 60, 80 e 100 °C e membranas com tamanho de poro de 4,0 e 7,0 μm . Após a dispersão das partículas em Miglyol 812 e análise de tamanho por difração a laser, os autores concluíram que partículas com reduzido tamanho (600 nm) foram obtidas quando foi utilizado o menor tamanho de poro de membrana (4,0 μm) e soluções menos concentradas (0,1%). Ainda, a adição de tensoativo não influenciou no formato esférico das partículas, que foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

SCHMID e colaboradores publicaram em 2010 um trabalho muito semelhante em que descrevem a avaliação da influência da concentração de sólidos, a presença de tensoativo e o tamanho de poro da membrana do *spray cap* no tamanho de partícula. Foram preparadas soluções aquosas de trehalose nas concentrações de 0,1%, 1,0% e 10,0% sem e com a adição de 0,05% de polissorbato 20. Os pós foram preparados utilizando o *spray cap* de 4,0 μm . Eles concluíram, de forma semelhante ao estudo anterior, que a menor concentração de sólidos possibilita a obtenção do menor tamanho de gotícula (800 nm) e concluíram que a adição de tensoativo facilita a formação da gotícula e aumenta a força com que o spray é lançado para dentro da torre de secagem.

LI e colaboradores (2010) prepararam nanoemulsões utilizando acetato de vitamina E como fase oleosa e um tensoativo do tipo não iônico. Após a adição de diferentes adjuvantes de secagem (goma arábica, proteína de soja, álcool polivinílico, amido modificado e maltodextrina) nas concentrações de 0,1%, 1,0% e 10,0% as nanoemulsões foram levadas ao *Nano Spray Dryer* a fim de avaliar a influência no tamanho de partícula obtido. Os autores concluíram que foi possível a obtenção de partículas utilizando diferentes adjuvantes de secagem e que a menor concentração possibilitou a formação de partículas com menores tamanhos (todas permaneceram com tamanhos abaixo de 1 μm). Os mesmos autores avaliaram ainda a possibilidade de obter nanocristais do fármaco a partir de uma solução orgânica contendo o fármaco modelo furosemida solubilizado em acetona. Porém, de acordo com as fotomicrografias obtidas por MEV, as partículas apresentaram-se na forma de agregados sem uma delimitação visível das bordas.

LEE e colaboradores (2010) avaliaram a possibilidade de secar no *Nano Spray Dryer* uma solução aquosa contendo proteína (albumina sérica bovina) e o tensoativo polissorbato 80. Os autores concluíram que o fator que mais influenciou no tamanho de partícula foi o tamanho do poro da membrana, sendo que o cap de 4,0 μm possibilita a obtenção de partículas menores (460 nm) e a concentração de tensoativo influencia na morfologia, sendo que concentrações de 0,05% possibilitaram a obtenção de partículas esféricas.

Portanto, a partir destes estudos iniciais, observa-se que esse equipamento representa um importante avanço tecnológico na obtenção de partículas com tamanho submicrométrico, cuja aplicação poderá ocorrer nas mais diferentes áreas, seja na farmacêutica, biotecnológica ou de materiais. Por outro lado, ainda não há dados na literatura relatando uma profunda caracterização destes sistemas, tampouco seu desempenho após administração *in vivo*.

3.3 Sistemas nano e microestruturados

O uso da nanotecnologia tanto na área farmacêutica, seja para o desenvolvimento de medicamentos ou de cosméticos, vem crescendo nos últimos anos devido às inúmeras vantagens que os produtos nanotecnológicos podem nos

oferecer. O conceito de tamanho para as nanopartículas depende muito da área em que estamos nos referindo; na indústria farmacêutica, nanopartículas são definidas como tendo um tamanho compreendido entre alguns nanômetros até 1 μm (HENG *et al.*, 2008). Já na química coloidal, nanopartículas possuem um tamanho inferior a 100 nm. Porém, quando se utilizam polímeros e fármacos, como é o caso das indústrias farmacêuticas, esse tamanho de partícula é muito difícil de ser obtido.

As modificações na superfície e no tamanho das partículas têm sido utilizadas como uma ferramenta importante para evitar a depuração e aumentar o tempo de circulação das partículas, melhorar o transporte através de barreiras físicas (hematoencefálica ou mucosas) ou prolongar o tempo de permanência no local de ação (SUNG *et al.*, 2007).

O uso da nanotecnologia tem se tornado uma ferramenta importante para melhorar a taxa de dissolução de alguns fármacos que possuem biodisponibilidade limitada e baixa solubilidade em água, por isso, muito tem se falado e discutido sobre a engenharia de fármacos. Portanto, em se tratando de melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos, partículas com tamanhos nanométricos são preferíveis às partículas com tamanhos micrométricos. HENG e colaboradores (2008) compararam o perfil de dissolução de nanopartículas de cefuroxima com o seu material bulk utilizando diferentes aparatos de dissolução e concluíram que o equipamento que melhor descreveu e diferenciou a dissolução do fármaco foi a célula de fluxo e o percentual de fármaco dissolvido foi maior para as nanopartículas.

Na área cosmética, o efeito oclusivo dos produtos é um fator importante a ser observado, pois proporciona uma melhor hidratação da pele. Foi realizado um estudo (MULLER e DINGLER, 1998) em que foi comparado o efeito oclusivo de nanopartículas (200 nm) com micropartículas ($> 1,0 \mu\text{m}$) presentes em nanopartículas lipídicas e concluiu-se que o efeito oclusivo das micropartículas corresponde a apenas 10% do efeito das nanopartículas. De acordo com os autores, quanto menor for o tamanho da partícula maior será a barreira para conter a evaporação da água, logo, o efeito oclusivo será maior.

Nesse mesmo estudo foi avaliado o grau de penetração da coenzima Q10 e do α -tocoferol após a veiculação em nanopartículas (200 nm) e micropartículas (4,5

µm) lipídicas. Após a realização da técnica de *tape stripping*, houve um aumento de 40% na penetração dos ativos na pele quando foram utilizadas as nanopartículas lipídicas e isso pode ser interessante quando o objetivo é ultrapassar o estrato córneo e depositar a substância nas camadas mais profundas da pele (SOUTO e MULLER, 2008).

Portanto, o uso de nanopartículas em sistemas de liberação de fármacos apresenta inúmeras vantagens com relação às micropartículas, por isso, os métodos de obtenção e caracterização devem ser profundamente estudados e investigados a fim de que se possa aumentar consideravelmente o emprego destes sistemas em produtos comerciais.

3.4 Asma

A asma é uma doença crônica causada por uma complexa interação do meio ambiente com fatores genéticos, que induz uma inflamação das vias aéreas ocasionando chiado, aperto no peito e tosse (KUMAR *et al.*, 2001). Exacerbações podem ocorrer em pacientes com todos os graus de severidade da doença e são na maioria das vezes iniciadas por uma infecção do trato respiratório superior (geralmente com rinovírus humano) ou por alérgenos ambientais. Esta patologia possui três componentes identificáveis que são: (i) inflamação aguda, (ii) crônica e (iii) remodelação das paredes das vias aéreas. Estes fatores contribuem para o desenvolvimento da broncoconstrição, hiperreatividade não-específica e obstrução das vias aéreas, respectivamente (BOUSQUET *et al.*, 2000).

A asma não é um problema de saúde pública, sendo que ocorre em todos os países, independente do seu desenvolvimento, e possui uma taxa de mortalidade relativamente baixa em comparação com outras doenças crônicas. Porém, de acordo com o último levantamento da Organização Mundial da Saúde, em torno de 300 milhões de pessoas sofrem com a asma no mundo, sendo esta a doença crônica mais comum entre as crianças (www.who.int).

Durante um ataque de asma, o revestimento dos brônquios incha, causando estreitamento das vias aéreas e reduzindo o fluxo de ar para dentro e para fora dos pulmões. As causas para o desenvolvimento da doença ainda não são completamente conhecidas, mas acredita-se que seja uma combinação de

predisposição genética com a exposição ambiental de substâncias que possam causar reação alérgica como: ácaros presentes na cama, tapetes ou móveis, poluição, pêlos de animais, pólen, fumaça de cigarro e irritantes químicos. Outros fatores como frio, excitação emocional, exercícios físicos e alguns medicamentos também podem desencadear o processo alérgico (www.who.int).

3.5 Farmacoterapia utilizada no tratamento da asma e seus desafios

Os glicocorticóides são os fármacos mais efetivos utilizados no tratamento da asma, sendo que quando utilizados pela via inalatória são os melhores controladores da asma crônica e possuem um baixo risco de apresentarem efeitos adversos (HIRANO *et al.*, 2011). Os corticosteróides são utilizados para prevenir exacerbações agudas da doença e atuam reduzindo a inflamação das vias aéreas, edema, vazamento microvascular, secreção de muco e a hiper-reatividade do músculo bronquial. Seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, mas pode-se dizer que atuam a nível subcelular em uma variedade de células pulmonares incluindo mastócitos, linfócitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e células epiteliais das vias aéreas.

A budesonida é um glicocorticóide não halogenado, utilizado no tratamento da asma, que possui elevada afinidade pelo receptor glicocorticóide. Atua inibindo os sintomas inflamatórios como edema e hiperpermeabilidade vascular (KOMPELLA *et al.*, 2003), sendo considerada um dos agentes terapêuticos mais valiosos para o tratamento da asma, mesmo apresentando uma baixa solubilidade em água (21,5 mg/mL) (JACOBS *et al.*, 2002).

Para o tratamento da asma os medicamentos podem ser administrados pelas vias oral, intravenosa e inalatória. A dose inalatória usual de budesonida para o tratamento da asma varia de 160 a 640 µg diários de acordo com a severidade da doença. Entretanto, o uso a longo prazo e freqüentes administrações pela via inalatória podem ocasionar diversos efeitos indesejáveis como a supressão do crescimento, o afinamento da pele, redução da densidade mineral óssea e catarata (DAHL *et al.*, 2006).

Entre outras desvantagens, a budesonida possui uma elevada taxa de ligação a proteínas plasmáticas (88%) e, além disso, seu uso sistêmico pode ocasionar

severos efeitos adversos como supressão adrenocortical, síndrome de Cushing e osteoporose (SAMARAS *et al.*, 2005). A biodisponibilidade após a administração oral é em torno de 10% devido ao extensivo metabolismo pré-sistêmico e por isso o uso desse fármaco em formas farmacêuticas de liberação pulmonar pode ser uma alternativa promissora para reduzir o seu metabolismo e aumentar a sua biodisponibilidade (DONNELLY *et al.*, 2001).

3.6 A via pulmonar e o uso do *Nano Spray Dryer*

A via pulmonar se apresenta como sendo uma via de primeira escolha para o tratamento de doenças das vias aéreas, pois apresenta diversas vantagens como a elevada área superficial alveolar (100 m²), a baixa atividade metabólica e um elevado fluxo sanguíneo (5 l/min), que rapidamente distribui as partículas pelo organismo (WALL *et al.*, 1995; SUNG *et al.*, 2007). Além disso, é considerada uma via do tipo não invasiva.

Além de ser utilizada para a liberação sistêmica de fármacos, a via pulmonar pode ser empregada também para o tratamento localizado, o que no caso de doenças pulmonares se torna ainda mais interessante. A liberação localizada pode diminuir a dose de fármaco, bem como diminuir o número de efeitos adversos resultantes de altas doses administradas pela via sistêmica. Porém, mesmo sendo uma das vias mais utilizadas para o tratamento de doenças respiratórias, apresenta algumas desvantagens como a rápida depuração mucociliar e a necessidade de aplicação de 3 ou 4 doses diárias de fármaco (ROUSE *et al.*, 2007). Em doenças como a asma, a forma ideal de tratamento seria uma única aplicação diária de fármaco com prolongada ação terapêutica (ROUSE *et al.*, 2007).

De acordo com a fisiopatologia da asma, a inflamação pode ocorrer em toda a via aérea. Visto que alguns estudos mostraram que a inflamação nas porções mais distais do pulmão possui um papel significativo na persistência e no desenvolvimento da asma (MARTIN, 2002), é fundamental que as partículas consigam atingir essas partes mais distais.

As propriedades físico-químicas dos aerossóis inaláveis que determinam a sua deposição nas vias aéreas são: o tamanho, a distribuição de tamanho, forma, carga, densidade e higroscopicidade, sendo o diâmetro de partícula o fator mais determinante para a deposição (PILCER e AMIGHI, 2010). As partículas podem ser

depositadas por impactação, sedimentação ou difusão. No caso da impactação, as partículas possuem um tamanho maior e se encontram suspensas no ar, se depositando nas partes mais superiores das vias aéreas. A sedimentação é dependente da gravidade e a difusão ocorre quando as partículas possuem um tamanho tão reduzido que adquirem movimentos aleatórios (browniano), levando a sua expulsão das vias aéreas através da expiração (CARVALHO *et al.*, 2011).

O diâmetro aerodinâmico de uma partícula pode ser definido como o diâmetro de uma esfera com densidade unitária que, ao ser submetida a um jato de ar, alcança a mesma velocidade que uma partícula não esférica de densidade arbitrária (CHOW *et al.*, 2004). A determinação do diâmetro aerodinâmico é realizada principalmente através dos impactadores, sendo que essa caracterização é essencial para avaliar a deposição das partículas nos pulmões (DE BOER *et al.*, 2002). Diversos autores estudaram a relação que há entre o diâmetro aerodinâmico das partículas com a sua deposição a nível pulmonar, porém, as informações muitas vezes são contraditórias e mais estudos se tornam necessários.

STAHLHOFEN e colaboradores (1989) avaliaram a deposição pulmonar das partículas em alguns pacientes e concluíram que partículas com 6 μm se depositam no trato aéreo superior e com 3 μm no trato aéreo inferior. SANGWAN e colaboradores (2003) avaliaram o grau de deposição de aerossóis com diâmetro aerodinâmico de 3,1 μm e 2,2 μm , concluindo que a deposição pulmonar foi duas vezes menor para os aerossóis com maior tamanho de partícula e, além disso, apresentaram um aumento proporcional na deposição da cavidade orofaríngea.

Outros autores (USMANI *et al.*, 2005; GLOVER *et al.*, 2008) também avaliaram o grau de deposição das partículas no pulmão e concluíram que partículas com menor diâmetro aerodinâmico se depositam na porção inferior do pulmão. BHAVNA e colaboradores (2009) realizaram um estudo para avaliar o grau de deposição de partículas de salbutamol com diâmetro aerodinâmico de 1,6 μm e 3,1 μm marcadas com $\text{Tc}^{99\text{m}}$ radioativo em indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram que a deposição foi duas vezes maior para as partículas de 1,6 μm que para as 3,1 μm . Desta forma, sabe-se que partículas com reduzido diâmetro aerodinâmico tendem a se depositar nas porções mais profundas do pulmão, mas o

que não é completamente esclarecido e consensual é o limite de tamanho que favorece essa deposição.

Uma das principais queixas relatadas pelos pacientes que fazem o uso da terapia para o controle da asma é o número excessivo de repetições que devem ser feitas utilizando três ou mais tipos de dispositivos diferentes para o tratamento desta doença (HOLGATE e POLOSA, 2008, 2006). Além disso, com o tempo ocorrem exacerbações da doença e isso pode estar relacionado com a baixa adesão ao tratamento ou ao manuseio incorreto dos dispositivos (HOLGATE e POLOSA, 2006; BARNES, 2008). Além disso, acredita-se que apenas de 10 a 15% da dose chega efetivamente aos brônquios (RASENACK *et al.*, 2003) e que 10% atinja os alvéolos (EL-GENDI *et al.*, 2009). O restante acaba se perdendo na cavidade orofaríngea, sendo esse um dos maiores desafios para a terapia de doenças utilizando a via pulmonar.

Este obstáculo pode ser contornado com o uso de partículas com tamanhos menores, que consigam ultrapassar esse processo de adesão na cavidade orofaríngea e chegar até o local desejado, que são as partes mais profundas do pulmão (LEAROYD *et al.*, 2008). Em outras palavras, de acordo com a maioria dos autores, as partículas devem ter um diâmetro aerodinâmico compreendido entre 1 e 5 μm para conseguir ultrapassar a boca e a garganta e conseqüentemente alcançar os pulmões (SHI *et al.*, 2007). Há autores que restringem ainda mais essa faixa, assumindo que para atingir os alvéolos, o diâmetro aerodinâmico das partículas deve estar compreendido entre 1 e 3 μm (GONDA, 1981). Partículas com tamanho inferior a 1 μm também não são desejáveis pois são facilmente exaladas antes da deposição (LINDFORS *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2007).

Partículas sólidas com reduzido tamanho e baixo diâmetro aerodinâmico podem ser obtidas por *Nano Spray Dryer*, visto que esse equipamento foi desenvolvido para possibilitar a obtenção de partículas com tamanhos submicrométricos a partir de soluções ou dispersões. O controle do tamanho de partícula é uma questão importante para a obtenção de partículas com diâmetro aerodinâmico desejável (HU *et al.*, 2008). Além disso, o tamanho reduzido pode auxiliar na solubilização de fármacos hidrofóbicos como a budesonida.

As duas principais modificações realizadas pela empresa que desenvolveu o equipamento, que possibilitaram a obtenção de partículas com reduzido diâmetro,

foram: (i) o uso da tecnologia piezoelétrica, em que a vibração da membrana a frequências ultrassônicas (60 KHz) faz com que a solução seja ejetada através das aberturas da membrana (4,0; 5,5 e 7,0 μm) gerando milhões de gotículas com reduzido tamanho de partícula e (ii) a implementação de um coletor de partículas eletrostático, que devido a presença de diferentes cargas no seu interior, gera um campo elétrico fazendo com que as partículas produzidas sejam atraídas, contribuindo para aumentar o rendimento do processo (SCHIMID *et al.*, 2010). Esse coletor permite que finas partículas sejam depositadas independentemente da sua massa, ao contrário dos *Spray Dryers* convencionais em que partículas com tamanho inferior a 2 μm não são coletadas (MOSEN *et al.*, 2004).

BECK-BROICHSITTER e colaboradores (2011) produziram nanopartículas de 5-fosfodiesterase pelo método de evaporação do solvente utilizando PVA (álcool polivinílico) e PLGA (ácido polilático-co-glicólico) como polímeros e obtiveram partículas sólidas utilizando o *Nano Spray Dryer*. O trabalho foi realizado com o objetivo de administrar as partículas pela via pulmonar para o tratamento de hipertensão pulmonar. Foram obtidas partículas com diâmetro aerodinâmico de 4 μm (impactação inercial) que controlaram a liberação do fármaco devido a presença do polímero, retardando em até 480 minutos a liberação de 100% do fármaco em comparação com o fármaco livre (90 minutos).

**4. CAPÍTULO I- OBTENÇÃO DIRETA DE PARTÍCULAS
SUBMICROMÉTRICAS A PARTIR DE UMA SOLUÇÃO ORGÂNICA
UTILIZANDO O EQUIPAMENTO *NANO SPRAY DRYER*[®]**

“Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization *spray drying*: influence of the type of solvent and surfactant”

Manuscrito submetido ao periódico científico Journal of Nanoparticle Research.

Carta de submissão do artigo:

----- Mensagem original -----

Assunto:NANO: SubmissionConfirmation

Data:2012-06-12 09:57

Remetente:"Journal of Nanoparticle Research (NANO)" <janani.kalidasan@springer.com>

Para:"Silvia Guterres" <silvia.guterres@ufrgs.br>

Dear Dr Silvia Guterres,

Thank you for submitting your manuscript, Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization spray drying: influence of the type of solvent and surfactant, to Journal of Nanoparticle Research.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://nano.edmgr.com/>

Your username is: SGuterres-346

Your password is: guterres5386

Should you require any further assistance please feel free to contact the Editorial Office by clicking on the "contact us" in the menu bar to send an email to us.

Alternatively, please call us at +91 44 42197752 anytime between 9.00 - 17.00 hrs IST/5.00 - 13.00 hrs CET.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

Journal of Nanoparticle Research

--

Silvia Staniscuaski Guterres

silvia.guterres@ufrgs.br

As páginas 45 a 73 desta Dissertação referem-se ao artigo “Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization *spray drying*: influence of the type of solvent and surfactant”

Abstract

Spray drying is a technique used to produce solid particles from liquid solutions, emulsions or suspensions. Recently, Buchi Labortechnik developed the latest generation of spray dryers Nano Spray Dryer B-90. This aim of this study was to obtain, directly, submicron drug particles from an organic solution, employing the *Nano Spray Dryer* and using dexamethasone as a model drug. In addition, we evaluated the influence of both the type of solvent and surfactant on the properties of the product. The experiments were carried out according to a 3² full factorial analysis. The particles were obtained with high yields (above 60%), low water content (below 2%) and high drug content (above 80%). The type of solvent was the main factor which influenced the surface tension and the viscosity. The highest powder yields were obtained for the highest surface tension and the lowest viscosity of the drug solutions. The use of ionic surfactants led to higher process yields. The laser diffraction technique applied in aqueous medium revealed that the particles tend to agglomerate, but when subjected to a force they deagglomerate into small particles with submicrometric size. The small size, around 1 µm, was also observed by scanning electron microscopy. Interaction between the raw materials in the *spray-dried* powders was verified by calorimetric analysis, through the disappearance of the drug peak. Thus, it was possible to confirm that dexamethasone submicrometric particles were obtained by vibrational atomization (Nano Spray Dryer) from organic solution. The type of solvent and surfactant influenced the process yield.

Keywords: *Nano Spray Dryer*, vibrational atomization, dexamethasone, organic solution, submicrometric particles, ionic surfactants.

5. CAPÍTULO II- OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS SÓLIDAS DE BUDESONIDA POR *NANO SPRAY DRYER*[®] DESTINADAS AO TRATAMENTO DA ASMA

“Partículas sólidas de reduzido diâmetro aerodinâmico contendo budesonida preparadas por *Nano Spray Dryer* destinadas ao tratamento da asma” que será submetido à um periódico a ser definido.

As páginas 77 a 103 desta Dissertação referem-se ao manuscrito.

Resumo

A asma é uma doença crônica inflamatória causada por uma complexa interação do meio ambiente com fatores genéticos. A budesonida (glicocorticóide) é considerada um dos agentes terapêuticos mais valiosos para o tratamento da asma. O tratamento utilizando a via pulmonar apresenta ainda alguns desafios a serem vencidos como aumentar a quantidade de fármaco que atinge os brônquios e alvéolos ou melhorar a eficiência dos dispositivos de entrega dos medicamentos. Com base nisso, esse trabalho tem como objetivo produzir partículas de budesonida com reduzido diâmetro aerodinâmico por *Nano Spray Dryer* a fim de obter uma melhor deposição pulmonar e reduzir o número de aplicações. A budesonida foi solubilizada em uma solução alcoólica, seguido da adição do tensoativo deoxicolato de sódio (NSD) ou da adição do deoxicolato de sódio e leucina (NSD LEU). As partículas foram caracterizadas quanto ao rendimento, teor de umidade, teor de fármaco, tamanho de partícula, morfologia, densidade, perfil de dissolução. Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura também foram conduzidas. As partículas obtidas apresentaram um tamanho de 1 μm , elevado rendimento (acima de 60%), elevado teor de fármaco (acima de 90%) e baixo teor de umidade (abaixo de 2 %). O tamanho submicrométrico também pode ser visualizado através da microscopia eletrônica de varredura. Após a determinação da densidade das partículas, que ficou em torno de 0,3 g/cm^3 , foram determinados os seus diâmetros aerodinâmicos teóricos que ficaram em torno de 0,5 μm . Devido ao seu reduzido tamanho e elevada área superficial, a velocidade de dissolução da budesonida obtida por *Nano Spray Dryer* foi superior a velocidade de dissolução da sua forma *bulk* e do produto comercial Busonid[®]. Com base nas análises calorimétricas pode-se concluir que o processo de secagem por aspersão resultou na amorfização das substâncias que antes eram cristalinas. Portanto, pode-se concluir que foi possível a obtenção de partículas de budesonida de reduzido diâmetro aerodinâmico por *Nano Spray Dryer* com potencial para utilização no tratamento da asma.

Palavras-chave: budesonida, leucina, *Nano Spray Dryer*, pó seco inalado, reduzido diâmetro aerodinâmico, dissolução.

5. DISCUSSÃO GERAL

De acordo com o primeiro trabalho realizado nessa dissertação de mestrado, a principal conclusão que pode depreender-se da análise dos resultados experimentais é que foi possível a obtenção de partículas sólidas com tamanhos submicrométricos através do equipamento *Nano Spray Dryer*, partindo-se de uma solução de fármaco e sem a utilização de adjuvantes de secagem.

Para tal, foram estudados alguns parâmetros que podem explicar os fatores que influenciam a obtenção destas partículas, que para o primeiro capítulo eram constituídas de dexametasona, o fármaco modelo utilizado no estudo. Com relação à solução de alimentação, foi demonstrado que o tipo de solvente utilizado influenciou no rendimento do processo em razão das suas viscosidades diferentes. A solução preparada a partir do solvente mais viscoso (2-propanol) foi a que teve o menor rendimento de processo, o que concorda com outros relatos da literatura (RABBANI, 2005). Por outro lado, o tipo de tensoativo utilizado (aniônico, catiônico e não iônico) não influenciou na viscosidade da solução.

Resultados semelhantes foram observados para a tensão superficial, onde o tipo de solvente foi o fator que demonstrou maior influência. A solução contendo acetona foi a que apresentou o maior valor de tensão superficial. Dados da literatura demonstram que reduzindo a tensão superficial da solução é possível facilitar a passagem da solução através dos poros da membrana (SCHMID *et al.*, 2010), o que poderia resultar num aumento no rendimento do processo. Entretanto, ao contrário do que se havia postulado, a solução contendo acetona apresentou a maior tensão superficial e o maior rendimento de processo. Assim, foi levantada a hipótese de que o tipo de tensoativo pudesse ter uma maior influência no rendimento, considerando a forma de separação das partículas do ar de secagem. Diferentes tensoativos foram adicionados às soluções de partida com o objetivo também de reduzir a tensão superficial. Essa redução foi mais pronunciada para as soluções contendo o tensoativo LSS (lauril sulfato de sódio), cujos pós apresentaram os maiores rendimentos.

Portanto, o fator mais determinante no rendimento do processo não foi a viscosidade e nem a tensão superficial da solução, mas sim o tipo de tensoativo utilizado. Com base no desenvolvimento do equipamento, o cilindro coletor possui cargas no seu interior que ao serem submetidas a um campo elétrico promovem a

atração das partículas. A presença de tensoativos com carga (tanto catiônicos quanto aniônicos) facilitou esse processo de atração e promoveu os maiores rendimentos, confirmando uma das hipóteses iniciais do trabalho.

Com relação às análises de tamanho tanto por difratometria de laser quanto por microscopia eletrônica de varredura, foi observado que as partículas primárias obtidas possuem um diâmetro muito reduzido e em torno de 1 μm , mas que ao serem dispersas em água tendem a se aglomerar devido ao seu reduzido diâmetro. As forças coesivas para partículas com tamanhos muito reduzidos são bem maiores que para partículas com tamanhos superiores (WEILER *et al.*, 2010). Partículas com reduzido tamanho tendem a formar um aglomerado muito estável e precisam ser submetidas a um estresse mecânico para desaglomerar (WEILER *et al.*, 2010). Assim, os pós foram redispersos e submetidos à agitação no dispersor do equipamento para a análise de tamanho em função do tempo. Este protocolo demonstrou que utilizando a agitação mecânica é possível desfazer os aglomerados, recuperando o comportamento das partículas primárias.

Esses dados foram confirmados pela análise do percentual de partículas que possuíam tamanhos acima e abaixo de 1 μm no início e no final de duas horas do processo de agitação. No início do processo os pós contendo P188 em acetona (SD3), CTAC (SD5) e P188 (SD6) em etanol eram os únicos que possuíam mais de 95% da sua população de partículas com tamanhos inferiores a 1 μm ; após duas horas de agitação, todos os pós passaram a apresentar mais de 90% das partículas com tamanho inferior a 1 μm , com exceção do pó CTAC em isopropanol (SD9) que não desaglomerou.

A idéia de utilizar essas partículas sólidas obtidas por *Nano Spray Dryer* para administração de fármacos através da via pulmonar foi devido ao tamanho de partícula obtido. Quando iniciamos o trabalho, o objetivo era obter partículas únicas e exclusivamente nanométricas, porém não foi o que obtivemos, visto que também estão presentes partículas com tamanhos acima de 1 μm . Com base neste resultado, delineamos a etapa seguinte (Capítulo 2) visto que essas partículas apresentariam um tamanho adequado para serem administradas pela via pulmonar.

A budesonida é um glicocorticóide utilizado no tratamento da asma, e por possuir baixa biodisponibilidade oral, elevado metabolismo de primeira passagem e

elevada taxa de ligação a proteínas plasmáticas sua administração é feita pela via pulmonar. Para serem administrados pela via pulmonar, as partículas devem ter um diâmetro aerodinâmico compreendido entre 1 e 5 μm , mas mesmo com esse reduzido diâmetro, sabe-se que somente de 10 a 15% das partículas conseguem atingir o pulmão (RASENACK *et al.*, 2003; EL-GENDI *et al.*, 2009), as demais se depositam no trato orofaríngeo.

Com base nisso e nos conhecimentos já adquiridos com o trabalho anterior foram produzidas partículas de budesonida com reduzido diâmetro aerodinâmico por *Nano Spray Dryer*. A solução a ser convertida em partículas sólidas foi constituída por fármaco, leucina e tensoativo aniônico deoxicolato de sódio, visto que no trabalho anterior foi verificado que a presença de tensoativos que possuíam carga levava a uma melhor formação das partículas, com maior rendimento. A proporção de fármaco:tensoativo (10:1 p/p) também já havia sido estabelecida no trabalho anterior e não foi alterada.

Como já esperado, os rendimentos foram elevados e acima de 60% e o teor de fármaco se manteve acima de 90%. Durante o processo de secagem não foi observada perda significativa de pó que se aderiria ao spray cap do equipamento, como aconteceu com os pós de dexametasona, sendo que esse fator deve ter contribuído para o aumento no teor.

Com relação ao tamanho de partícula, diferentemente do trabalho anterior, os pós foram analisados através da técnica de difratometria a laser, porém utilizando também a via seca do equipamento. A idéia inicial foi obter partículas sólidas para serem administradas pela via pulmonar utilizando dispositivos inalatórios, portanto esse tipo de análise teve importância fundamental. O tamanho das partículas após a redispersão a seco foi em torno de 1 μm , tanto para o pó com ou sem leucina. Entretanto, quando os pós foram colocados no meio dispersor contendo água, foi novamente observado o comportamento de aglomeração das partículas.

Como requisito importante na determinação do diâmetro aerodinâmico das partículas, também foi realizada a determinação da densidade (bruta e de compactação). As partículas foram obtidas com valores de densidade de compactação em torno de 0,28 g/cm^3 . De acordo com dados da literatura, podemos considerar essas partículas como sendo de elevada densidade, visto que há

partículas descritas na literatura como tendo densidade de 0,02 g/cm³. A presença de etanol em elevadas proporções pode ter resultado em partículas com densidades superiores, como já foi descrito na literatura (BOSQUILLON *et al.*, 2004b; RABBANI *et al.*, 2005).

Essa elevada densidade teve uma influência significativa no diâmetro aerodinâmico. Considerando que as partículas obtidas possuem um diâmetro geométrico muito baixo, e se a densidade fosse baixa também, esse valor de diâmetro aerodinâmico ficaria reduzido demais. O diâmetro aerodinâmico obtido ficou em torno de 0,5 e 0,65 µm para os pós SD e SD LEU, respectivamente. Embora tendo ficado abaixo dos valores mais comumente utilizados na literatura, alguns autores também aceitam essa faixa inferior de tamanho, que vai de 0,5 a 5 µm. Com esse valor de diâmetro aerodinâmico inferior pretende-se avaliar futuramente se as partículas irão realmente se depositar de forma mais efetiva no trato respiratório.

Alterações na velocidade de dissolução da budesonida através de experimento realizado em sacos de diálise também puderam ser observadas. A budesonida obtida por *Nano Spray Dryer* se solubilizou de forma mais rápida que a budesonida (matéria-prima) e a comercial (Busonid[®]). Visto que a budesonida é um fármaco muito hidrofóbico, esse achado é de grande relevância para um possível aumento da biodisponibilidade e conseqüentemente melhora no tratamento da asma.

Provavelmente o fator que mais influenciou no processo de dissolução do fármaco esteja relacionado com os constituintes da formulação, que estão relacionados com o processo de desaglomeração e tamanho de partícula determinados pela via úmida. De acordo com as análises calorimétricas, o processo de secagem por *spray drying* alterou o estado organizacional dos pós de cristalino para amorfo, não havendo diferenciação entre o pó NSD e NSD LEU. Com base na análise de tamanho de partícula utilizando a via seca do difratômetro a laser, o resultado obtido para ambos os pós *nano spray dried* foi muito próximo e em torno de 1 µm; porém quando submetidos à análise utilizando a via úmida desse mesmo equipamento, os tamanhos de partícula foram diferentes. O pó NSD apresentou um tamanho em torno de 140 µm e o pó NSD LEU apresentou um tamanho muito

inferior, em torno de 60 μm . Portanto, sugere-se que a leucina, por ter uma leve ação tensoativa, tenha auxiliado no processo de desaglomeração via úmida dos pós NSD LEU e, conseqüentemente, na velocidade de dissolução do fármaco.

Finalizando, esse trabalho demonstrou que é possível utilizar o equipamento *Nano Spray Dryer* para produzir partículas sólidas de fármaco com reduzido diâmetro, com potencial aplicação por diferentes vias, entre elas a via pulmonar. Além disso, do ponto de vista da aplicação pulmonar, as nanopartículas de budesonida desenvolvidas neste estudo podem representar uma melhora no tratamento e eficácia da terapia da asma, que devido ao seu reduzido tamanho, ficariam retidas em menor proporção no trato orofaríngeo. Estudos utilizando o Impactador em Cascata, que simula a deposição de partículas no trato respiratório, estão em andamento e são de fundamental importância para avaliar se essas partículas com reduzido diâmetro aerodinâmico irão se depositar de maneira mais efetiva nas vias aéreas inferiores.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- O equipamento *Nano Spray Dryer* se mostrou eficaz na obtenção direta de partículas com tamanhos submicrométricos, partindo-se de soluções de fármaco contendo tensoativos.
- O tipo de solvente e de tensoativo utilizados influenciou em parâmetros como viscosidade e tensão superficial, que de forma indireta influenciam no rendimento do processo. A presença de tensoativos com carga, tanto aniônica quanto catiônica, foi o fator crucial na obtenção de partículas com elevado rendimento, visto que o cilindro coletor possui cargas no seu interior que ao serem submetidas a um campo elétrico promovem a atração das partículas recém-formadas.
- Os pós foram obtidos com reduzido teor de umidade (abaixo de 2%), elevados teores de fármaco (acima de 80% para os pós de dexametasona e acima de 90% para os pós de budesonida). As partículas foram obtidas com valores de densidade de compactação em torno de 0,3 g/cm³.
- Com relação à análise de tamanho por difratometria a laser, após redispersão aquosa as partículas tendem a se aglomerar devido ao seu reduzido tamanho, mas ao serem submetidas a um processo de agitação, tendem a desaglomerar (mais de 90% das partículas passam a ter diâmetro inferior a 1µm). Esse processo de aglomeração não ocorre a seco, utilizando o mesmo princípio de medida.
- Os pós obtidos foram visualizados por Microscopia Eletrônica de Varredura, onde foi observado que as partículas primárias possuem diâmetros em torno de 1µm e que se encontram na forma de aglomerados. As partículas apresentaram diferentes formatos, sendo algumas esféricas e outras no formato *donut*.
- A análise calorimétrica demonstrou que houve interação entre o fármaco e os demais constituintes das partículas visto que houve uma redução na entalpia de fusão do fármaco para os pós secos por aspensão no *Nano Spray Dryer*. O processo de produção de partículas sólidas pelo *Nano Spray Dryer* resultou, em parcial, na amorfização do fármaco, que antes era cristalino.

- Através do experimento de dissolução empregando a técnica dos sacos de diálise pode-se perceber que os constituintes do pó influenciaram na taxa de dissolução da budesonida em comparação com a sua forma *bulk* e o produto comercial (Busonid[®]) por facilitar a desaglomeração quando esses pós são colocados em meio aquoso.

- Partículas submicrométricas de budesonida, com reduzido diâmetro aerodinâmico (em torno de 0,5 μm), foram produzidas, com potencial aplicação no desenvolvimento de sistemas de liberação pulmonar de fármacos para o tratamento da asma.

7. PERSPECTIVAS

Avaliação do perfil de deposição pulmonar das partículas utilizando o Impactador em Cascata de Andersen (ACI- sigla em inglês)

O Impactador em Cascata de Andersen (Figura 3) é um equipamento utilizado para avaliar o grau de distribuição das partículas a partir do fluxo gerado pelos MDI (medidor de dose individual) e DPI (pós secos inalatórios) quando são aspirados e entram em contato com o trato respiratório. O equipamento é subdividido em 7 ou 8 estágios (depende do modelo) que simulam o trato orofaríngeo e respiratório, sendo que cada estágio contém um disco e uma placa que retém partículas com tamanhos específicos. As partículas ficam depositadas nos discos e placas do equipamento de acordo com a sua distribuição de tamanho, sendo que cada disco contém um tamanho de poro específico.

O equipamento foi desenvolvido de modo tal que à medida que o fluxo de aerossol passa através de cada fase, partículas com inércia suficiente terão um impacto sobre o prato de coleta, enquanto as partículas com inércia insuficiente (menores) seguirão as linhas da corrente de ar e passarão à fase seguinte impactação.

Os 8 estágios correspondem aproximadamente às várias partes do sistema respiratório humano (Figura 4), como segue:

- Estágio 0: 9,0 – 10,0 μm
- Estágio 1: 5,8 – 9,0 μm
- Estágio 2: 4,7 – 5,8 μm (faringe)
- Estágio 3: 3,3 – 4,7 μm (traquéia e brônquios primários)
- Estágio 4: 2,1 – 3,3 μm (brônquios secundários)
- Estágio 5: 1,1 – 2,1 μm (bronquíolos terminais)
- Estágio 6: 0,7 – 1,1 μm (alvéolos)
- Estágio 7: 0,4 – 0,7 μm (alvéolos)



Figura 3. Impactador em Cascata de Andersen com 8 estágios já com porta de indução e atuador acoplados.

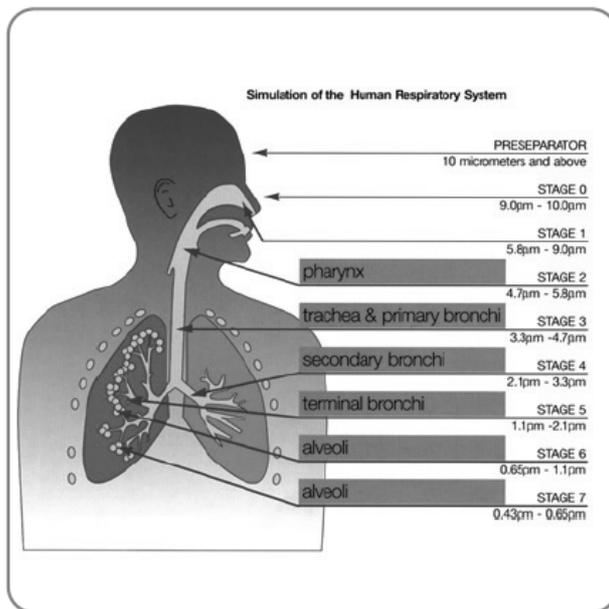


Figura 4. Grau de distribuição das partículas no trato respiratório simulado pelo equipamento ACI de acordo com o tamanho de abertura de cada poro do disco.

Após a deposição, segue-se a fase de extração e quantificação sendo que a quantidade de fármaco depositada em cada estágio deverá ser quantificada de acordo com método específico.

Portanto, como perspectiva de continuidade do trabalho, pretende-se avaliar o grau de deposição das partículas dos pós NSD e NSD LEU obtidas por *Nano Spray Dryer*. As análises serão realizadas em triplicata e o resultado expresso como o percentual médio de massa depositada em cada estágio, que representa a deposição pulmonar. Serão pesados 2 mg de cada pó em uma cápsula gelatinosa de tamanho número 2. O fluxo de ar utilizado será de 28,3 L/min (que corresponde a uma pressão de 4 KPa) durante um processo que simula a inspiração por 2,5 s representando a capacidade inspiratória normal de um homem adulto de 70 kg que é de 4L. O atuador será utilizado para liberar o pó para dentro do equipamento, sendo que a cápsula deve ser perfurada segundos antes do processo que simula a inalação.

O fármaco depositado nos diferentes níveis será extraído com o solvente apropriado, levado ao ultrassom e diluído a volumes apropriados para ser analisado por CLAE e quantificado de acordo com o método descrito previamente. O pó depositado no *mouthpiece* e na porta de indução também será quantificado juntamente com o estágio zero. O pó depositado no estágio 1 corresponde a quantidade depositada na boca e garganta. A massa de pó depositada a partir do estágio 2 até o filtro do equipamento é chamada de FPD (da sigla em inglês, dose de partículas finas) e a razão da soma dessas massas dividida pela massa inicial de pó expressa em porcentagem é chamada de FPF (da sigla em inglês, fração de partículas finas) (GERVELAS *et al.*; 2007). Para fins comparativos, o grau de deposição do produto comercial Busonid[®] também será avaliado.

Cabe ressaltar que o nosso grupo de pesquisa recentemente adquiriu um Impactador de Cascata de Andersen, sendo que o equipamento já se encontra instalado e disponível para as análises.

Avaliação da toxicidade pulmonar *in vivo*

Após a obtenção e caracterização das partículas de budesonida produzidas por *Nano Spray Dryer* (NSD e NSD LEU) para o tratamento da asma, torna-se

imprescindível avaliar a sua toxicidade. A análise do fluido de lavagem broncoalveolar (FLBA) é um método efetivo para a detecção de resposta inflamatória pulmonar, o qual permite amostrar células e componentes bioquímicos do trato respiratório inferior (HENDERSON *et al.*, 1985), sendo considerada um dos métodos mais descritos na literatura para a identificação de agentes citotóxicos (HENDERSON, 2005; HUSSAIN e AHSAN, 2005).

O aumento de proteínas e um influxo de neutrófilos (polimorfonucleares) são as alterações no FLBA mais sensíveis de uma resposta inflamatória (HENDERSON *et al.*, 1985). Portanto, podem-se detectar mudanças na permeabilidade do epitélio pulmonar através da determinação da concentração de proteínas totais. Substâncias inaladas podem afetar a barreira epitelial pela abertura das junções celulares ou pelo aumento da permeabilidade da membrana celular. Além disso, o FLBA pode ser estudado quanto ao número de células, presença de enzimas indicadoras de dano celular, tais como desidrogenase láctica (DHL), fosfatase alcalina (FA) e Nacetilglucosaminidase (NAG), bem como quanto aos níveis de citosinas, interleucinas e óxido nítrico (HENDERSON, 2005).

Essa análise se torna importante porque as formulações contêm um tensoativo aniônico, e sabe-se que os tensoativos aumentam o transporte paracelular e transcelular de fármacos devido a perda das junções entre as células ou devido a solubilização dos componentes da membrana celular (LIU *et al.*, 1999), logo podem causar algum dano.

A DHL é uma enzima citoplasmática que atua como catalisador na oxidação de L-lactato a piruvato e está presente na maioria dos tecidos do corpo humano. Quando ocorre morte celular, esta enzima é liberada para o meio extracelular. Deste modo, níveis extracelulares aumentados de DHL estão relacionados com dano e morte celular (KRUGTEN *et al.*, 1996).

A determinação da concentração de proteínas totais no fluido broncoalveolar é outro importante indicador de integridade celular, pois, frente a um agente irritante, proteínas podem ser liberadas no espaço alveolar devido à perda da integridade da barreira epitelial alvéolos-capilares (ZHANG *et al.*, 1996). Estudos com animais têm demonstrado que a avaliação do teor de proteínas totais é um marcador sensível para inflamação (HUSSAIN e AHSAN 2005).

8. REFERÊNCIAS

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 183–192, 2008.

BARNES, P. J. Biochemical Basis of Asthma Therapy. **The journal of biological chemistry**, v. 286 (38), p. 32899–32905, 2011.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHWEIGER, C.; SCHMEHL, T.; GESSLER, T.; SEEGER, W.; KISSEL, T. Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. **Journal of Controlled Release**, doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.030.

BILLON, A.; BATAILLE, B.; CASSANAS, G.; JACOB, M. Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203 (1-2), p. 159-168, 2000.

BITTNER, B.; KISSEL, T. Ultrasonic atomization for spray drying: a versatile technique for the preparation of protein loaded biodegradable microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p.325–341, 1999.

BOSQUILLON, C.; ROUXHET, P.G.; AHIMOU, F.; SIMON, D.; CULOT, C.; PRÉAT, V.; VANBEVER, R. Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 357– 367, 2004b.

BOSQUILLON, C.; PREAT, V.; VANBEVER, R. Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 233–244, 2004a.

BOUSQUET, J.; JEFFERY, P.K.; BUSSE, W.W.; JOHNSON, M.; VIGNOLA, A. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.161, p.1720-45, 2000.

CAL, K. SOLLOHUB, C. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99 (2), p. 575-586, 2010

CARR, A.G.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N.R. Particle formation of budesonide from alcohol-modified subcritical water solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p.169–180, 2011.

CARVALHO, T.C.; PETERS, J.I.; WILLIAMS, R.O. Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, p.1–10, 2011.

CONTE, U.; CONTI, B.; GIUNCHEDI, P.; MAGGI, L. Spray-dried polylactide microsphere preparation – influence of the technological parameters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20 (3), p. 235-258, 1994.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, 19 (2), 99-134 (2002).

CRUZ, L.; FATTAL, E.; TASSO, L.; FREITAS, G.C.; CARREGARO, A.B.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; TSAPIS, N. Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 152, p. 370–375, 2011.

DAHL, R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma, **Respiratory Medicine**, v.100 (8), p.1307–1317, 2006.

DE BOER, A.H.; GJALTEMA, D.; HAGEDOORN, P.; FRIJLINK, H.W. Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 219–231, 2002.

DONNELLY, R.; SEALE, J.P. Clinical pharmacokinetics of inhaled budesonide. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40 (6), p. 427–40, 2001.

EL-GENDY, N.; GORMAN, E. M.; MUNSON, E. J.; BERKLAND, C. Budesonide Nanoparticle Agglomerates as Dry Powder Aerosols With Rapid Dissolution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98 (8), p. 2731-46, 2009.

ESPOSITO, E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmacy**, v. 242, p.329-334, 2002.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Ultrasonic atomization into reduced pressure atmosphere—envisaging aseptic spray-drying for microencapsulation. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 185–195, 2004.

GILANI, K.; NAJAFABADI, A. R.; BARGHI M.; RAFIEE-TEHRANI, M. Aerosolisation of beclomethasone dipropionate using spray dried lactose/polyethylene glycol carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 595–606, 2004.

GLIŃSKI, J.; CHAVEPEYER, G.; PLATTEN, J.-K. Surface properties of aqueous solutions of l-leucine. **Biophysical Chemistry**, v. 84, p. 99–103, 2000.

GONDA, I. Study of the effect of polydispersity of aerosols on regional deposition in the respiratory tract. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.33, 1981.

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, K.G.; KAZAKIS, N.A. Influence of Spray Drying Conditions on Tomato Powder Properties. **Drying Technology**, v. 22 (5), p. 1129-1151, 2004.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLNUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 53-65, 1999.

HENDERSON, R. F.; BENSON, J. M.; HAHN, F. F.; HOBBS, C. H.; JONES, R. K.; MAUDERLY, J. L.; MCCLELLAN, R. O.; PICKRELL, J. A. New approaches for the evaluation of pulmonary toxicity: bronchoalveolar lavage fluid analysis. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 451-458, 1985.

HENDERSON, R. F. Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, p. 155-159, 2005.

HENG, D., CUTLER, D.J., CHAN, H.K., YUN, J., RAPER, J.A. What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 1696–1701, 2008.

HIRANO, Y.; SHICHIJO, M.; IKEDA, M.; KITaura, M.; TSUCHIDA, J.; ASANUMA, F.; YANAGIMOTO, T.; FURUE, T.; IMURA, K.; YASUI, K.; ARIMURA, A. Prostanoid DP receptor antagonists suppress symptomatic asthma-like manifestation by distinct actions from a glucocorticoid in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 666, p.233–241, 2011.

HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. **Lancet**, v.368, p.780–793, 2006.

HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 218–230, 2008.

HOLGATE, S. T. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? **Journal of allergy and Clinical immunology**, p. 495-505, 2011.

HU,T.T.; ZHAO,H.; JIANG,L.C.; LE,Y.; CHEN,J.F; YUN, J. Engineering Pharmaceutical Fine Particles of Budesonide for Dry Powder Inhalation (DPI). **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.47, p. 9623–9627, 2008.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. State of insulin self-association does not affect its absorption from the pulmonary route. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 289–298, 2005.

JACOBS, C.; MULLER, R.H. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. **Pharmaceutical Research**, v.19, p.189– 194, 2002.

KOMPELLA, U.B.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA, S.P. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of

inhibiting VEGF expression. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, p.1192– 1201, 2003.

KRUGTEN, M.V.; COBBEN, N.A.M.; LAMERS, R.J.S.; VAN DIEIJEN-VISSER, M.P.; WAGENAAR, S.J.S.C.; WOUTERS, E.F.M.; DRENT, M. Serum LDH: a marker of disease activity and its response to therapy in idiopathic pulmonary fibrosis. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 48, p.220-223, 1996.

KUMAR, R.K.; FOSTER, P.S. Murine model of chronic human asthma. **Immunology and Cell Biology**, v. 79, p.141–144, 2001.

LEAROYD, T.P.; BURROWS, J.L.; FRENCH, E.; SEVILLE, P.C. Modified release of beclometasone dipropionate from chitosan-based spray-dried respirable powders. **Powder Technology**, v.187, p. 231–238, 2008.

LEAROYD, T.P.; BURROWS, J. L.; FRENCH, E.; SEVILLE, P.C. Sustained delivery by leucine-modified chitosan spray-dried respirable powders. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 97–104, 2009.

LEE, S.H.; HENG, D.; NG, W.K.; CHAN, H.; TAN, R.B.H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403 (1-2), p. 192-200, 2011.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T.F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 304–310, 2010.

LINDFORS, L.; FORSSEN, S.; SKANTZE, P.; SKANTZE, U.; ZACKRISSON, A.; OLSSON, U. Amorphous drug nanosuspensions. 2. Experimental determination of bulk monomer concentrations. **Langmuir**, v.22, p.911–916, 2006.

LIU, D.Z.; LECLUYSE, E. L.; THAKKER, D.R. Dodecylphosphocholine- mediated enhancement of paracellular permeability and cytotoxicity in Caco-2 cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88, p.1161-1168, 1999.

MARTIN, R.J. Therapeutic significance of distal airway inflammation in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 447–460, 2002.

MASTERS, K. Successful application of spray drying is due in part to much improved knowledge and control of drop atomization, spray/air contact, and drop evaporation. **Industrial and engineering chemistry**, v. 60 (10), p. 53-63, 1968.

MOSEN, K.; BACKSTROM, K.; THALBERG, K.; SCHAEFER, T.; KRISTENSEN, H.G.; AXELSSON, A. Particle formation and capture during spray drying of inhalable particles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.9, p.409–417, 2004.

MULLER, R.H. AND DINGLER, A. The next generation after the liposomes: solid lipid nanoparticles (SLN™ Lipopearls™) as dermal carrier in cosmetics. **Eurocosmetics**, v. 7 (8), p. 18–26, 1998.

NAJAFABADI, A.; GILANI, K.; BARGHI M.; RAFIEE-TEHRANI, M. The effect of vehicle on physical properties and aerosolisation behavior of disodium cromoglycate microparticles spray dried alone or with l-leucine, **International Journal of Pharmaceutics**, v.285, p. 97–108, 2004.

NOLAN, L. M.; LI, J.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O.I.; HEALY, A.M. Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. II—Sodium cromoglycate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 36–46, 2011.

PALMIERI, G. F.; WEHRLE, P.; STAMM, A. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, p. 2859-2879, 1994.

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

QUINTANAR, D., ALLÉMANN, E., FESSI, H., DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113–1128, 1998a.

RABBANI, N.R.; SEVILLE, P.C. The influence of formulation components on the aerosolisation properties of spray-dried powders. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 130–140, 2005.

RASENACK,N.; STECKEL, H.; MULLER, B.W. Micronization of anti-inflammatory drugs for pulmonary delivery by a controlled crystallization process. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p.35–44, 2003.

RÉ, M.I. Formulating drug delivery systems by spray-drying. **Drying Technology**, v. 24 (4) p. 433-446, 2006.

ROUSE, J.J.; WHATELEY, T.L.; THOMAS, M.; ECCLESTON, G.M. Controlled drug delivery to the lung: Influence of hyaluronic acid solution conformation on its adsorption to hydrophobic drug particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.330, p.175–182, 2007.

SAMARAS, K.; PETT, S.; GOWERS, A.; MCMURCHIE, M.; COOPER, D.A. Iatrogenic Cushing's syndrome with osteoporosis and secondary adrenal failure in human immunodeficiency virus-infected patients receiving inhaled corticosteroids and ritonavir- boosted protease inhibitors: six cases. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 4394–4398, 2005.

SANGWAN, S.; CONDOS, R.; SMALDONE, G.C. Lung deposition and respirable mass during wet nebulization. **Journal of Aerosol Medicine**, v. 16, p. 379-386, 2003.

SCHMID, K.; ARPAGAUS, C.; FRIESS, W. Evaluation of a Vibrating Mesh Spray Dryer for Preparation of Submicron Particles. **Respiratory Drug Delivery Europe**, p. 323-326, 2009.

SCHMID.K.; ARPAGAUS. C.; FRIESS. W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1–8, 2010.

SCHÖPE, H.J.; MARNETTE, O.; VAN MEGEN, W.; BRYANT, G. Preparation and Characterization of Particles with Small Differences in Polydispersity. **Langmuir**, v. 23, p. 11534-11539, 2007.

SHI, L.; PLUMLEY, C.J.; BERKLAND, C. Biodegradable nanoparticle flocculates for dry powder aerosol formulation. **Langmuir**, v. 23, p.10897–10901, 2007.

STAHLHOFEN, W.; RUDOLF, G.; JAMES, A.C. Intercomparison of experimental regional aerosol deposition data. **Journal of Aerosol Medicine**, v. 2, p. 285–308, 1989.

SOUTO, E. B.; MULLER R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN[®] NLC[®]). **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 157–165, 2008.

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

TURCHIULI, C.; GIANFRANCESCO, A.; PALZER, S.; DUMOULIN E. Evolution of particle properties during spray drying in relation with stickiness and agglomeration control. **Powder Technology**, v. 208, p. 433–440, 2011.

WALL, D.A. Pulmonary absorption of peptides and proteins. **Drug Delivery**, v.2, p.1–20, 1995.

WEILER, C.; WOLKENHAUER, M.; TRUNK, M.; LANGGUTH, P. New model describing the total dispersion of dry powder agglomerates. **Powder Technology**, v. 203, p. 248–253, 2010.

ZHANG, Q.; KUSAKA, Y.; ZHANG, Q.; HE, L.; ZHANG, Z.; SATO, K. Dynamic Changes of Constituents in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Experimental Silicotic Rats. **Industrial Health**, v. 34, p. 379-388, 1996.