

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAULA MARTINS DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE
QUITOSANA PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE ISONIAZIDA**

BRASÍLIA

2016

PAULA MARTINS DE OLIVEIRA

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de quitosana para administração pulmonar de isoniazida

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho

Brasília

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

OOL48d Oliveira, Paula Martins
Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de quitosana para administração pulmonar de isoniazida / Paula Martins Oliveira; orientador Guilherme Martins Gelfuso; co-orientador Marcílio Sérgio Soares Cunha Filho. -- Brasília, 2016.
67 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Farmácia. I. Gelfuso, Guilherme Martins, orient. II. Cunha Filho, Marcílio Sérgio Soares, co orient. III. Título.

Paula Martins de Oliveira

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE ISONIAZIDA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 15 de julho de 2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Universidade de Brasília - UnB

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Borin
Universidade de Brasília – UnB

Prof^a. Dr^a. Claudia da Silva Bitencourt
Centro Universitário das Faculdades Associadas ao Ensino - UNIFAE

AGRADECIMENTOS

A **Deus!** Por tudo o que sou e por tudo o que tenho, gratidão eterna! Obrigada por iluminar meus caminhos e me abençoar com saúde e sabedoria para continuar sempre em frente.

A minha **família!** Aos meus pais, **Regina e Paulo**, obrigada pelo apoio incondicional e por sempre me encorajarem a ser melhor. Sem vocês, nada seria possível! A minha irmã, **Juliana**, por ser minha melhor amiga e confidente! Ao **Pedro**, por todo amor, carinho e incentivo nos momentos bons e ruins! Aos meus **avós, tios, primos e amigos**, obrigada pela torcida de vocês!

Ao meu querido orientador (“meu pai” acadêmico), Prof. Dr. **Guilherme Martins Gelfuso!** Obrigada por todos os ensinamentos e por sempre estar presente e disponível. Obrigada por acreditar em mim até quando eu não acreditei. Daqui surgiu uma amizade que vou levar para sempre!

A todos meus **colegas de laboratório!** Passamos tantas horas ali dentro que formamos uma “família” acadêmica. Em especial: **Breno, Tamara, Lorena, Fernando, Thaiene e Felipe**, obrigada pelo companheirismo e por toda ajuda que me deram durante todo esse tempo. Aos professores **Marcílio, Lívia Barreto e Taís Gratieri**, pelas valiosas contribuições neste trabalho. O **LTMAC** me mostrou que, quando trabalhamos unidos, somos muito melhores. Tenho orgulho de fazer parte desse grupo.

A **UnB**, minha segunda casa, pela oportunidade de aperfeiçoamento e crescimento profissional. A **Capes**, pela concessão da bolsa de estudos. Aos **laboratórios:** Controle de Qualidade – UnB, Farmatec – UFG e LIIP – FCFRP/USP. A Priscilla e todas as outras pessoas que de alguma forma colaboraram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

... muito obrigada!

RESUMO

OLIVEIRA, P. M. **Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de quitosana para administração pulmonar de isoniazida.** Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Este trabalho objetivou o desenvolvimento e a caracterização de micropartículas de quitosana para a administração pulmonar da isoniazida (INH) como alternativa não invasiva e mais segura para o tratamento da tuberculose. Um método analítico para quantificação de INH por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado seguindo os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação preconizados pelo ICH e pela ANVISA. As micropartículas de quitosana foram preparadas pela técnica de *spray drying* utilizando-se diferentes proporções de polímero/fármaco (1:0; 1:1, 2:1, 3:1 p/p). Foram também preparadas micropartículas reticuladas com TPP, com e sem INH. O rendimento do processo de obtenção variou de 30,5 a 46,3%. As micropartículas obtidas apresentaram elevados valores de eficiência de encapsulação (entre 89% e 114%) e valores de potencial zeta superiores a +17,7 mV, tendo sido o potencial zeta inversamente proporcional à concentração de fármaco nas partículas e afetado negativamente pela presença do TPP nas amostras. A análise morfológica revelou partículas bastante esféricas, e mostrou que a presença de INH resultou em superfície mais lisa para as micropartículas de quitosana se comparada às micropartículas preparadas sem o fármaco. Todas as micropartículas, em média, apresentaram diâmetro em torno de 3,5 μm , o que deve favorecer sua deposição pulmonar após inalação do pó seco. Os dados de FTIR e DSC demonstraram a estabilidade química da INH com a quitosana e um elevado grau de interação do fármaco com o polímero. Os estudos *in vitro* de liberação de INH a partir das micropartículas de quitosana revelaram que as micropartículas reticuladas com TPP retardaram melhor a liberação do fármaco que as micropartículas preparadas com o polímero não reticulado. Todas as micropartículas demonstraram potencial mucoadesivo segundo estudos realizados *in vitro* com mucina. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* mostraram que as formulações produzidas não foram citotóxicas para macrófagos alveolares AMJ2-C11. Além disso, a dosagem de citocinas liberadas após tratamento das células com as micropartículas demonstrou que as micropartículas foram capazes de ativar os macrófagos alveolares, aumentando a produção de TNF- α e IL-10. Conclui-se, portanto, que as micropartículas de quitosana, reticuladas ou não, desenvolvidas neste trabalho apresentam-se como potenciais sistemas de liberação pulmonar do antimicrobiano INH para tratamento local da tuberculose.

Palavras-chave: Micropartículas; Quitosana; *Spray dryer*; Isoniazida; Administração pulmonar; Tuberculose.

ABSTRACT

This study aimed the development and characterization of chitosan microparticles for pulmonary administration of isoniazid (INH) as a non-invasive and safer alternative for the treatment of tuberculosis. An analytical method for quantification of INH by high-performance liquid chromatography was developed and validated according to the parameters of selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification, recommended by the ICH and ANVISA. The chitosan microparticles were prepared by spray drying technique using different ratios of polymer/drug (1:0; 1:1; 2:1; 3:1 w/w). Microparticles were also prepared with TPP, with and without INH. The yield of the production process ranged from 30.5 to 46.3%. The obtained microparticles presented high encapsulation efficiency values (between 89% and 114%) and zeta potential values greater than +17.7 mV, being zeta potential inversely proportional to the concentration of drug in the particles and negatively affected by the presence of TPP in the samples. Morphological analysis revealed spherical particles, and showed that the presence of INH resulted in smoother surface to the chitosan microparticles compared to microparticles prepared without drug. All microparticles, on average, had a diameter of about 3.5 μm , which should favor their lung deposition after inhalation of the dry powder. The FTIR and DSC data showed the chemical stability of chitosan and INH to a high degree of drug interaction with the polymer. The *in vitro* release of INH from chitosan microparticles revealed that the crosslinked microparticles better delayed release of the drug than microparticles prepared without the crosslinking agent. All microparticles demonstrated mucoadhesive potential, according to studies conducted *in vitro* with mucin. *In vitro* cytotoxicity assays showed that the formulations produced were not cytotoxic for alveolar macrophages AMJ2-C11. Moreover, the dosage cytokines released after treatment of the cells with microparticles demonstrated that the microparticles were able to activate alveolar macrophages, enhancing TNF- α and IL-10 production. It follows, therefore, that chitosan microparticles, crosslinked or not, developed in this work are presented as potential lung delivery systems for local INH antimicrobial treatment of tuberculosis.

Keywords: Microparticles; chitosan; Spray dryer; isoniazid; pulmonary administration; Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogênese da tuberculose pulmonar. Adaptada de Nunes-Alves et al. (2014).....	2
Figura 2. Bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Imagem disponível em:.....	3
Figura 3. Estruturas químicas da (A) rifampicina (PM = 822,94 g/mol) e da (B) INH (PM = 137,14 g/mol) (imagens disponíveis em: www.sigmaaldrich.com , acesso em 07/06/2016).....	4
Figura 4. O tamanho de partícula determina o local de deposição no trato respiratório. Adaptada de Manca (2009).....	7
Figura 5. Estruturas químicas do (A) PLGA e da (B) quitosana (imagens disponíveis em: www.sigmaaldrich.com , acesso em 07/06/2016).	8
Figura 6. Equipamentos <i>Spray dryer</i> (A) de escala laboratorial e (B) de escala industrial (imagem disponível em: www.labmaq.com.br , acesso em 07/06/2016; Ângelo (2012)).	9
Figura 7. Esquema de funcionamento da técnica de <i>spray drying</i> : (1) entrada do líquido/amostra, (2 e 3) entrada do ar de secagem, (4) bico atomizador, (5), câmara de secagem, (6) ciclone/separador, (7) coleta do pó seco, (8) saída de ar.	10
Figura 8. Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização dos estudos <i>in vitro</i> de liberação.	19
Figura 9. Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução aquosa de INH a 15 µg/mL.	23
Figura 10. Cromatogramas sobrepostos referentes a soluções aquosas de INH em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 µg/mL).....	24
Figura 11. Sobreposição dos cromatogramas referentes a uma solução aquosa de INH a 2,0 µg/mL e uma solução aquosa de INH, na mesma concentração, contaminada com quitosana.	25
Figura 12. Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para soluções aquosas de INH na faixa de concentração entre 0,1 e 15,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 39939x - 4585$, $r^2 = 0,991$	26
Figura 13. Aspecto macroscópico das micropartículas de quitosana formadas.	29
Figura 14. Distribuição de diâmetro em razão da porcentagem de volume diferencial das micropartículas de quitosana contendo ou não INH em diferentes proporções.	32
Figura 15. Fotomicrografias obtidas por MEV para as micropartículas de quitosana. (A) MP QS 1; (B) MP QS 2; (C) MP QS 3; (D) MP QS 0; (E) MP QS TPP 2; (F) MP QS TPP 0.	33
Figura 16. Termogramas da INH, das misturas físicas de INH e polímero, e das micropartículas, junto aos dados térmicos dessas amostras. Modificações relevantes nos eventos térmicos estão destacadas em negrito.....	34
Figura 17. FTIR da INH, das misturas físicas de INH e polímero, e das micropartículas desenvolvidas.....	35

Figura 18. Perfis de liberação *in vitro* da INH, em tampão fosfato pH 7,4, a partir das micropartículas de quitosana com fármaco encapsulado, preparadas com diferentes proporções de fármaco/polímero e com ou sem reticulação com TPP..... 36

Figura 19. Avaliação do potencial zeta das micropartículas MP QS 2 e MP QS TPP 2 em função do tempo de incubação com soluções de mucina. 38

Figura 20. Efeito das micropartículas sobre a viabilidade de macrófagos alveolares AMJ2-C11. A citotoxicidade relativa foi mensurada através do ensaio de MTT após 24 horas da incubação dos macrófagos com diferentes concentrações das micropartículas (A) para MP QS TPP 2 e MP QS TPP 0, ou (B) para MP QS 2 e MP QS 0; (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL), o fármaco solúvel (INH), Meio (controle negativo), DMSO e Etanol 60% (controles positivos). Os resultados são expressos em média \pm S.E.M. e representativo de dois experimentos independentes ($n = 4$ /poços/experimento) / $p < 0,05$, DMEM (Meio) versus demais grupos. One-way ANOVA (Tukey`s multiple comparisons test) foi utilizado..... 41

Figura 21. Citocinas detectadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) após a incubação dos macrófagos alveolares AMJ2-C11 com as micropartículas (MP QS TPP 2, MP QS TPP 0, MP QS 2, MP QS 0), o fármaco solúvel (INH), Meio (controle negativo), LPS (controle positivo). As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram mensuradas do sobrenadante de macrófagos alveolares 24 horas após a incubação com 1mg/mL das diferentes micropartículas. Os resultados são expressos em média \pm S.E.M. e representativo de dois experimentos independentes ($n = 3-4$ /poços/experimento)/ $p < 0,05$, DMEM (Meio) versus demais grupos. One-way ANOVA (Tukey`s multiple comparisons test) foi utilizado..... 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Quantidade de fármaco (INH) e polímero (quitosana) para 400 mL de cada uma das soluções (formulações) secas no *Spray dryer*..... 16
- Tabela 2:** Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação da INH. ...27
- Tabela 3:** Parâmetros utilizados e resultados da caracterização das micropartículas obtidas. 29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EE%	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
ICH	<i>International conference on harmonization</i>
IL	Interleucinas
INH	Isoniazida
LD	Limite de detecção
LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Limite de quantificação
MCN	Mucina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
PLGA	Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP	Tripolifosfato de sódio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. TUBERCULOSE	2
2.1.1. Fármacos utilizados no tratamento da doença	3
2.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE FÁRMACOS	5
2.2.1. Micropartículas poliméricas	7
2.2.1.1. Spray Drying	9
3. OBJETIVO	11
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4. MÉTODOS	12
4.1. MATERIAL	12
4.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INH	12
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	13
4.3.1. Seletividade	13
4.3.2. Linearidade	13
4.3.3. Precisão	14
4.3.4. Exatidão	14
4.3.5. Limites de detecção e quantificação	15
4.4. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INH	15
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	16
4.5.1. Rendimento do processo	16
4.5.2. Eficiência de encapsulação	17
4.5.3. Potencial zeta	17
4.5.4. Análise granulométrica das micropartículas	17
4.5.5. Morfologia	18
4.6. ESTUDO DA COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE A INH E OUTROS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO	18
4.6.1. Análise térmica	18
4.6.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	18
4.7. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO	19
4.8. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL MUCOADESIVO DAS MICROPARTÍCULAS	20
4.9. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MICROPARTÍCULAS	20
4.9.1. Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	21
4.9.2. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	21
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INH	23
5.1.1. Seletividade	24
5.1.2. Linearidade	25
5.1.3. Precisão e exatidão	26
5.1.4. Limites de detecção e quantificação	27
5.2. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INH	28
5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	29
5.3.1. Rendimento do processo	29
5.3.2. Eficiência de encapsulação	30
5.3.3. Potencial zeta	31
5.3.4. Análise granulométrica das micropartículas	31
5.3.5. Morfologia	33
5.4. ESTUDO DA COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE A INH E OS OUTROS COMPONENTES DAS MICROPARTÍCULAS	34
5.4.1. Análise térmica	34
5.4.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	35
5.5. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO	36
5.6. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA MUCOADESÃO DAS MICROPARTÍCULAS	38
5.7. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MICROPARTÍCULAS	40
5.7.1. Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	40
5.7.2. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	42
7. CONCLUSÕES	46
8. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Ela atinge principalmente os pulmões e é a segunda maior causa de mortes por doenças infecciosas no mundo (TURNER et al., 2011). Após o surgimento da AIDS houve um aumento no surgimento de cepas resistentes do *M. tuberculosis* devido à co-infecção com o vírus HIV. O protocolo de tratamento seguido atualmente é de longa duração e consiste na administração sistêmica, por via oral ou parenteral, de uma combinação de agentes antibióticos. Essa associação de medicamentos gera múltiplos efeitos adversos, além de importantes interações com outros fármacos (HARRIES e DYE, 2006). Além disso, as doses administradas oralmente são altas, uma vez que os fármacos são biodistribuídos e sofrem metabolização hepática antes de atingirem o local de ação, o que eleva ainda mais o efeito tóxico dos medicamentos (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). Nesse contexto, uma via de administração local para fármacos antibacterianos reduziria dose e efeitos tóxicos da terapia contra a tuberculose.

Nos últimos tempos, os sistemas de liberação de fármacos têm sido alvo de diversos estudos por apresentarem vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais (ALENCASTRE et al., 2006; STORPIRTIS et al., 2009). A possibilidade de modificar, controlar ou sustentar a liberação do fármaco no organismo, de proteger fármacos lábeis e ainda direcionar a ação do fármaco no local desejado são as principais vantagens desses sistemas inovadores (MORAIS, 2011).

Micropartículas poliméricas têm sido muito investigadas como veículos para administração pulmonar de fármacos. Elas são preparadas com polímeros biodegradáveis e têm se mostrado carreadores eficientes, capazes de atingirem as vias pulmonares inferiores de maneira rápida e não invasiva – a depender do tamanho e material com que são preparadas (BAILEY; BERKLAND, 2009). Além disso, são sistemas seguros, bastante estáveis e versáteis na maneira com que liberam o fármaco encapsulado. Estudos apontam que o tamanho e formato de micropartículas poliméricas favorecem sua fagocitose por macrófagos alveolares e os ativam, induzindo mecanismos imunes que potencializam a ação anti-infecciosa de fármacos (SHARMA et al., 2001, 2007).

O presente trabalho busca desenvolver e caracterizar micropartículas de quitosana para serem testadas como veículos para administração pulmonar da isoniazida (INH), como uma alternativa promissora e mais segura para o tratamento da tuberculose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença crônica conhecida há décadas e que, ainda hoje, atinge pessoas por todo o mundo. Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 8,6 milhões de casos incidentes de tuberculose, sendo que 1,3 milhões evoluíram para morte (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

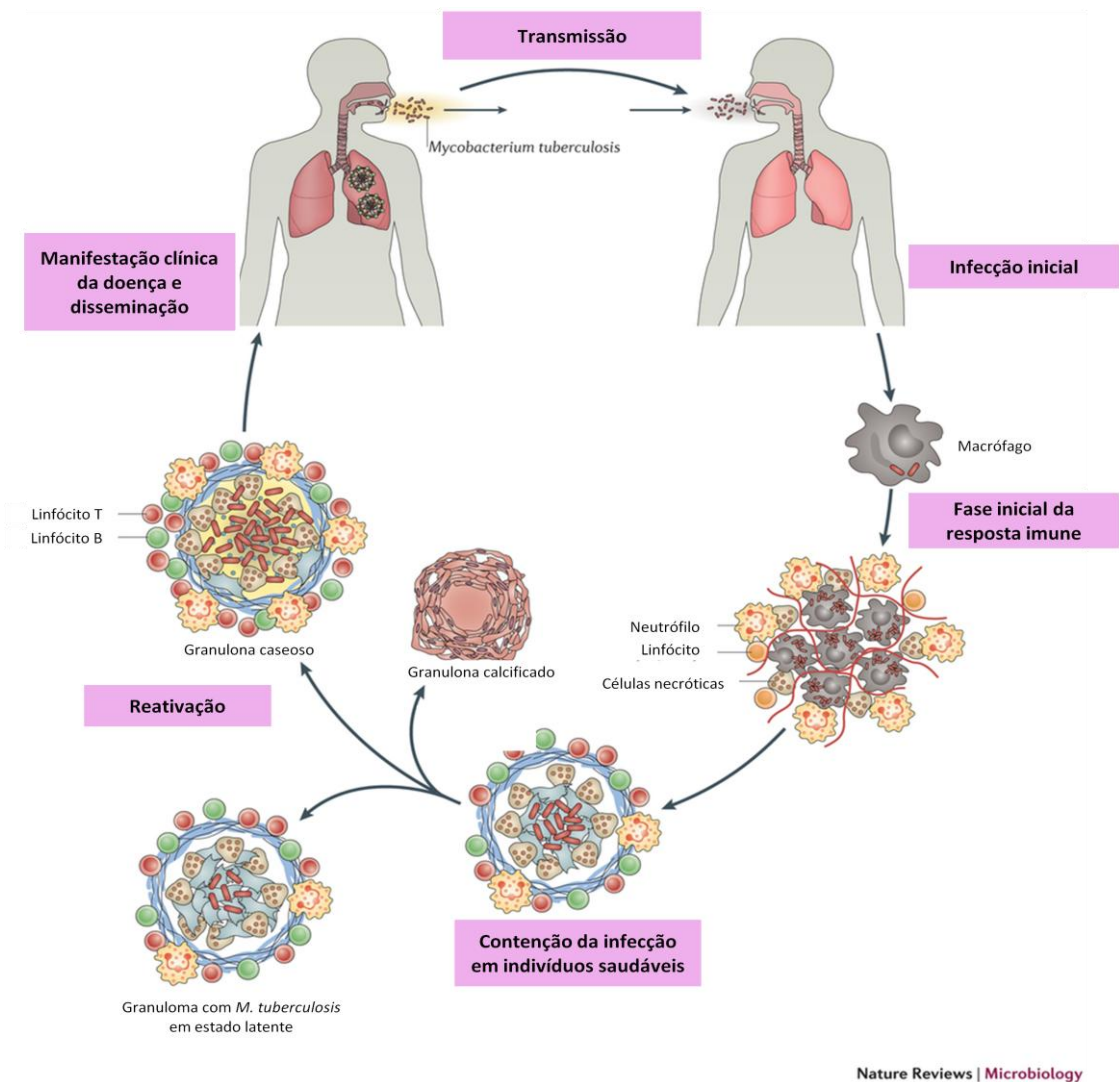


Figura 1. Patogênese da tuberculose pulmonar. Adaptada de Nunes-Alves et al. (2014).

A Figura 1 traz um esquema que resume a patogênese da tuberculose pulmonar. Os pulmões são a porta de entrada para a bactéria *M. tuberculosis* (Figura 2), causadora da

doença. A transmissão ocorre através da tosse ou do escarro de uma pessoa que esteja com a doença ativa (MINARINI, 2006). Uma pessoa saudável que inala as gotículas de um doente é infectada e o bacilo se instala nas vias aéreas inferiores, ou seja, nos alvéolos pulmonares. Os macrófagos alveolares fagocitam os bacilos numa tentativa de conter a infecção e, como resultado, há a formação dos granulomas, que são lesões pouco vascularizadas e circundadas por um tecido fibroso, característica da tuberculose.



Figura 2. Bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Imagem disponível em: <https://niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/understanding/pages/cause.aspx> (Acesso em: 07/06/2016).

O paciente infectado pode ou não desenvolver a doença, dependendo da situação do seu sistema imune, da virulência da bactéria, da quantidade de bacilos e das respostas imunológicas desencadeadas pelos macrófagos (LOPES, 2009; NG et al., 2007). O *M. tuberculosis* pode permanecer em estado latente dentro dos granulomas por anos e, a qualquer momento, evoluir e manifestar a doença.

O aumento de novos casos é decorrente do surgimento de cepas resistentes aos fármacos atualmente disponíveis, da infecção concomitante com o vírus do HIV, do longo tempo de tratamento, dos diversos efeitos adversos e, principalmente, devido à baixa adesão dos pacientes às terapias propostas (MORAIS, 2011).

2.1.1. Fármacos utilizados no tratamento da doença

Segundo HARRIES e DYE (2006), os principais objetivos do tratamento da tuberculose são: minimizar a duração da doença, interromper a transmissão, garantir a cura, prevenir recidivas e evitar a seleção de cepas resistentes aos medicamentos. O tratamento inicial dura seis meses em média, e quatro medicamentos constituem a primeira linha terapêutica para a tuberculose: INH, rifampicina, pirazinamida e etambutol (KATZUNG,

2010). Entretanto, para o tratamento de recidivas e manifestações causadas por bacilos resistentes, o tratamento pode durar até 36 meses (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015), sendo necessária a utilização de um esquema bem mais complexo de medicamentos para o tratamento. O esquema indicado nesses casos pode compreender o uso de outros medicamentos como: estreptomicina, levofloxacina e terizidona, além dos fármacos de primeira linha (BRASIL, 2011).

A INH e a rifampicina (Figura 3) são os dois fármacos mais ativos contra os bacilos causadores da doença e estão presentes nas duas fases do tratamento da tuberculose, a primeira chamada fase intensiva e a segunda chamada fase de manutenção (BRASIL, 2011).

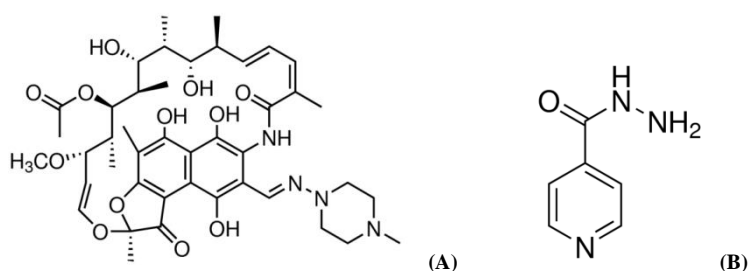


Figura 3. Estruturas químicas da (A) rifampicina (PM = 822,94 g/mol) e da (B) INH (PM = 137,14 g/mol) (imagens disponíveis em: www.sigmaaldrich.com, acesso em 07/06/2016).

A rifampicina ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, Figura 3A) é apresentada na forma de um pó cristalino de cor castanho-avermelhada, é pouco solúvel em água e muito solúvel em metanol (FARMACOPÉIA, 2010). Ela é um derivado semissintético da rifamicina e inibe os microorganismos sensíveis com doses menores que 1 $\mu\text{g/mL}$ (KATZUNG, 2010). Seu mecanismo de ação dá-se através da inibição da síntese de RNA bacteriano, sendo classificada como um fármaco bactericida (RANG et al., 2007). A rifampicina é bem absorvida após a administração oral e penetra facilmente na maioria dos tecidos e nos macrófagos; entretanto, é uma potente indutora das isoformas do citocromo P450, aumentando a eliminação de diversos outros fármacos, sendo assim responsável por inúmeras interações medicamentosas e muito hepatotóxica (KATZUNG, 2010).

A INH ($C_6H_7N_3O$; Figura 3B) apresenta-se na forma de um pó branco, bastante solúvel em água (aproximadamente 125 mg/mL) (BECKER et al., 2007). É pouco absorvida em pH baixo, porque se encontra na forma protonada em meio ácido ($pK_a = 2$), sendo melhor absorvida em meios mais básicos (BECKER et al., 2007; JOSHI et al., 2008; RASTOGI et al., 2007). O mecanismo de ação da INH dá-se pela inibição da síntese do ácido micólico, um importante constituinte da parede celular de micobactérias. Também é relatado que ela

interfere no metabolismo celular através da combinação com uma enzima presente no bacilo (RANG et al., 2007). A INH elimina a maioria dos bacilos do *M. tuberculosis* em baixas concentrações (0,2 µg/mL) e penetra nos macrófagos exercendo sua ação extra e intracelularmente (KATZUNG, 2010). Além de ser um dos fármacos mais ativos, a INH tem alta eficácia, é utilizada em baixas doses, é bem tolerada e possui baixo custo quando comparada à rifampicina (BECKER et al., 2007; DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006; HERYANTO; HASAN; ABDULLAH, 2008).

As vias convencionais para a administração de fármacos contra a tuberculose são as vias oral e parenteral. Essas vias possuem desvantagens que contribuem para falhas no tratamento dessa doença. A via parenteral nunca é preferível por causa dos cuidados necessários para a aplicação e por ser uma via invasiva e dolorosa. A via oral é segura e os medicamentos desenvolvidos para este tipo de administração normalmente têm custo de produção reduzido; entretanto, ela possui diversas limitações. Na via oral, a demora para iniciar a ação dos medicamentos no local da infecção acontece devido à necessidade de uma distribuição sistêmica prévia (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). Além disso, alguns fármacos são pouco absorvidos devido às suas naturezas químicas ou devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado, em que a quantidade de fármaco é reduzida antes de atingir o seu local de ação. Para alcançar níveis terapêuticos adequados por essa via, portanto, são requeridas altas doses e longos períodos de tratamento, o que acaba por gerar ainda mais efeitos adversos e tóxicos ao paciente (NG et al., 2007; ZHOU et al., 2005). Entre os efeitos adversos ao tratamento da tuberculose, os mais comuns são: náuseas, vômitos, dor abdominal, cefaléia, hepatotoxicidade, prurido, dor nas articulações e neuropatia periférica (BRASIL, 2011).

É importante destacar que os granulomas (lesões pulmonares características da tuberculose) possuem características que dificultam ainda mais a permeação do fármaco para o interior dos pulmões. Isso acontece porque essas lesões são pouco vascularizadas e envolvidas por um tecido fibroso (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

Em geral, as vias convencionais utilizadas no tratamento da tuberculose são responsáveis por agravar os efeitos adversos do medicamento, diminuindo a adesão dos pacientes e aumentando a chance de selecionar cepas bacterianas resistentes.

2.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE FÁRMACOS

Uma das alternativas mais estudadas nos últimos tempos para o tratamento da tuberculose é a formulação de fármacos para o tratamento anti *M. tuberculosis* em sistemas de liberação inaláveis (KUNDAWALA et al., 2011a; MISRA et al., 2011). Com o avanço nas pesquisas, a via pulmonar voltou a ser uma via de administração de fármacos de amplo interesse tanto para tratamentos locais quanto sistêmicos.

A grande importância dessa via de administração está na pouca quantidade de barreiras que impedem a absorção e a grande superfície que ela possui para absorção de fármacos (BAILEY; BERKLAND, 2009). Além de liberar o fármaco no local de ação desejado, é possível reduzir as doses, a frequência de administração e reduzir ou eliminar os efeitos adversos dos medicamentos (MANCA et al., 2008; PAI et al., 2016; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). Todas essas vantagens contribuem para otimizar a terapia, melhorando a adesão dos pacientes, a eficácia do tratamento e, conseqüentemente, prevenindo o surgimento de bactérias resistentes.

Muitos sistemas de liberação já foram propostos e estão sendo estudados como alternativas para a administração pulmonar de fármacos. Entre eles, os sistemas particulados têm mostrado melhores resultados devido a suas características ideais para uma melhor deposição pulmonar, contribuindo para uma diminuição na dose, na frequência e no tempo de administração dos fármacos. Dentre os sistemas particulados mais comumente utilizados estão os lipossomas, as nanopartículas e as micropartículas.

Os lipossomas já foram estudados por diversos autores que propuseram seu uso em forma de pó seco (JUSTO; MORAES, 2003; KURUNOV et al., 1995; PANDEY; KHULLER, 2004; VYAS et al., 2004). Estes são formulados utilizando lipídios e fosfolipídios sintéticos, que são similares aos tensoativos endógenos encontrados nos pulmões. As nanopartículas poliméricas possuem a vantagem de ter uma melhor aderência à mucosa e de possuírem maiores taxas de encapsulação de fármacos (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). Elas normalmente são produzidas com polímeros biocompatíveis, sintéticos ou não, e também com lipídios sólidos e têm sido estudadas por vários pesquisadores (PANDEY; KHULLER, 2005; SHARMA; SHARMA; KHULLER, 2004). As micropartículas se apresentam como estruturas sólidas, esféricas e maciças e são preferíveis para a administração pulmonar de fármacos quando esta é feita via inaladores de pó seco (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

2.2.1. Micropartículas poliméricas

Micropartículas poliméricas contêm o fármaco homogeneamente disperso na matriz ou retido em sua superfície (SILVA et al., 2003; STORPIRTIS et al., 2009). As micropartículas poliméricas tendem a ser preferíveis às nanopartículas para administração pulmonar de fármacos por possuírem dimensões mais adequadas para se depositarem nas vias aéreas inferiores, quando administradas na forma de pós secos inaláveis. Estudos mostram que a faixa ideal de tamanho de partículas para atingirem as vias respiratórias mais baixas, ou seja, os alvéolos pulmonares, está compreendida entre 1 μm e 5 μm (HINDS, 1999), conforme pode ser observado no esquema apresentado na Figura 4.

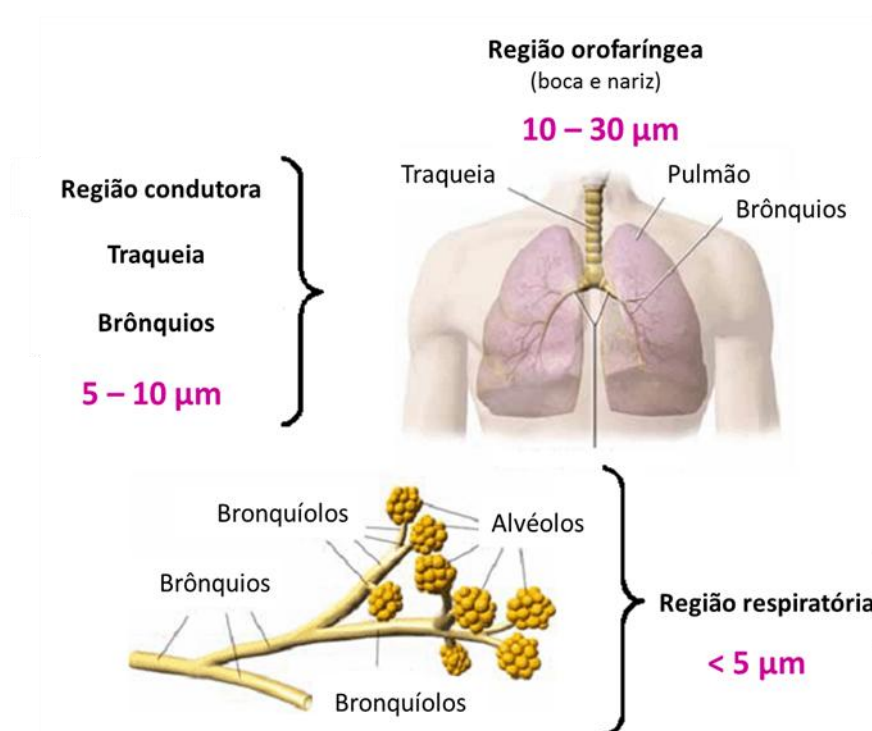


Figura 4. O tamanho de partícula determina o local de deposição no trato respiratório. Adaptada de Manca (2009).

Entre as vantagens de se utilizar micropartículas poliméricas como sistemas de liberação de fármacos, estão a capacidade de melhorar a estabilidade dos compostos – por se tratar de sistemas sólidos e que protegem os princípios ativos lábeis do contato com o oxigênio – (LIRA et al., 2009; MORAIS, 2011), a possibilidade de modificar, controlar e/ou sustentar a liberação de substâncias (FAROOQ; MALVIYA; SHARMA, 2014), além de permitir o direcionamento do fármaco para o seu sítio de ação (MARTINAC et al., 2005). As micropartículas geralmente são desenvolvidas com polímeros que podem ou não ser biodegradáveis (GELFUSO, 2009). As características dos polímeros e a possibilidade de

incorporação de outros ligantes em sua superfície conferem propriedades especiais às micropartículas. Os polímeros não-iônicos, por exemplo, são os mais biocompatíveis, enquanto os polímeros catiônicos apresentam importantes propriedades mucoadesivas (CALVO et al., 1997).

Os polímeros de PLGA [Poli (D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico), Figura 5B] são a classe de polímeros mais empregada na obtenção de sistemas nano e microparticulados por serem atóxicos, bem tolerados, biodegradáveis e biocompatíveis (GERT et al., 2016; UNGARO et al., 2012). Porém, por serem polímeros sintéticos, os PLGAs possuem preços altos, elevando os custos dos sistemas de liberação que o utilizam. A quitosana (Figura 5A) é um polímero natural que se apresenta como uma alternativa de uso na obtenção de nano e micropartículas. Ela é biocompatível, biodegradável, tem baixo custo, confere mucoadesividade ao sistema e, ainda, tem se mostrado capaz de abrir as *tight junctions* celulares, funcionando como um promotor de absorção de fármacos através de membranas (ISLAM et al., 2012; MORAIS, 2011; SHAH et al., 2008).

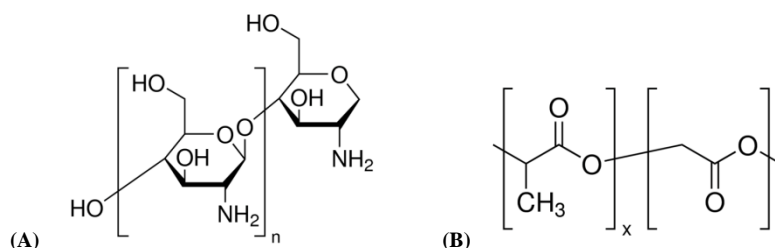


Figura 5. Estruturas químicas da (A) quitosana e do (B) PLGA (imagens disponíveis em: www.sigmaaldrich.com, acesso em 07/06/2016).

O controle da liberação de fármacos encapsulados nas micropartículas, aliado ao efeito mucoadesivo da quitosana – que prolonga o tempo de permanência da partícula em contato com a mucosa, prolongando a ação do fármaco encapsulado (ISLAM et al., 2012; QUAN et al., 2008) – torna esse tipo de partícula um sistema interessante para a liberação nasal e pulmonar de fármacos (HUANG; CHIANG; YEH, 2003; ISLAM et al., 2012; SINGLA; CHAWLA, 2001).

Dentre os métodos disponíveis para preparação de nano e micropartículas, são descritos na literatura desde métodos químicos de polimerização interfacial e polimerização *in situ*, passando por métodos físico-químicos de coacervação simples e complexa, emulsificação e evaporação do solvente, até métodos físicos de revestimento, extrusão e secagem por *spray drying* (GERT et al., 2016).

2.2.1.1. *Spray Drying*

O método de obtenção de micropartículas por atomização e secagem em *spray dryer* é uma das técnicas mais utilizadas na indústria farmacêutica e de alimentos desde a década de 1940 (PATEL; PATEL; CHAKRABORTY, 2014). Esta tecnologia foi utilizada inicialmente para a desidratação e conservação de produtos e, mais tarde, sua utilização no encapsulamento de substâncias dentro de diferentes materiais, como polímeros, veio à tona.

A técnica de *spray drying* oferece diversas vantagens quando comparada às demais técnicas de obtenção de micropartículas, principalmente porque o processo ocorre de forma simples e em apenas uma etapa. Em um único equipamento é possível atomizar, secar e coletar o material em forma de pó para ser estocado. Por ser rápido, o processo de secagem evita a degradação dos fármacos e materiais encapsulados, permitindo a conservação das propriedades do material após o processo de formação das partículas (SOSNIK; SEREMETA, 2015).

Além de ser rápida, a técnica possui baixo custo de produção e a facilidade de transposição de escalas, sendo possível a produção de poucos gramas ou de toneladas de um produto, a depender da capacidade do equipamento utilizado (MORAIS, 2011; SILVA et al., 2003). Entretanto, tem desvantagens como o baixo rendimento e a dificuldade de se trabalhar com materiais termolábeis. A Figura 6 mostra exemplos de equipamentos de *Spray Dryer* utilizados em escala laboratorial e industrial.

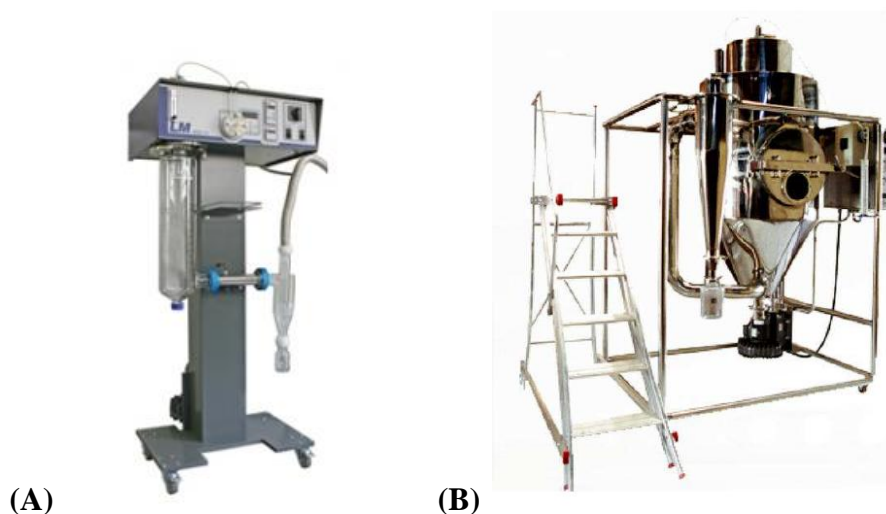


Figura 6. Equipamentos *Spray dryer* (A) de escala laboratorial e (B) de escala industrial (imagem disponível em: www.labmaq.com.br, acesso em 07/06/2016; Ângelo (2012)).

Por definição, a técnica de *spray drying* transforma materiais que se encontram no estado líquido em pós secos através da simples secagem de uma solução ou suspensão

(PATEL; PATEL; CHAKRABORTY, 2014). As micropartículas são obtidas através da secagem da amostra por meio do ar aquecido. A partir da substância que se deseja encapsular (fármaco) e do material que faz a encapsulação (polímero), prepara-se uma emulsão, solução ou suspensão, que é injetada no bico atomizador, produzindo gotas. Na câmara de secagem, a grande área de contato entre o ar de secagem e a superfície das gotas permite a utilização de altas temperaturas para secagem do solvente. No fim do processo, já no separador, o ar sai do equipamento por um lado do ciclone, enquanto o produto final (o pó) sai pelo outro lado e pode ser recolhido em um recipiente coletor acoplado ao equipamento (ÂNGELO, 2012). A Figura 7 mostra o esquema de funcionamento do equipamento *Spray Dryer*.

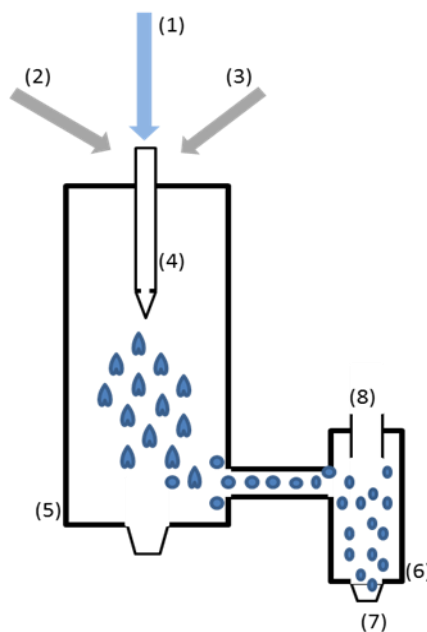


Figura 7. Esquema de funcionamento da técnica de *spray drying*: (1) entrada do líquido/amostra, (2 e 3) entrada do ar de secagem, (4) bico atomizador, (5), câmara de secagem, (6) ciclone/separador, (7) coleta do pó seco, (8) saída de ar.

Cada variável do processo de secagem por *spray drying* é crítica, sendo possível controlar e alterar parâmetros para se produzir partículas com diferentes especificações de tamanho, morfologia e eficiência de encapsulação. As propriedades do material a ser seco (viscosidade, densidade, concentração), os parâmetros selecionados (fluxo, temperatura) e o tipo de equipamento (tamanho, capacidade) são algumas das variáveis que podem afetar as características do produto final (SOSNIK; SEREMETA, 2015). Em geral, a técnica de *spray drying* é conhecida pela obtenção de partículas esféricas, com relativa uniformidade de tamanho e com boa eficiência de encapsulação (SILVA et al., 2003), sendo uma das metodologias mais difundidas e empregadas na produção de micropartículas poliméricas (GELFUSO, 2009).

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar micropartículas poliméricas de quitosana contendo INH para serem empregadas como alternativa terapêutica localizada, não-invasiva e mais segura no tratamento da tuberculose utilizando a via pulmonar.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar um método analítico seletivo para quantificação da INH;
- Obter diferentes micropartículas de quitosana contendo INH e verificar o rendimento do processo de obtenção;
- Caracterizar as micropartículas quanto a eficiência de encapsulação, potencial zeta, distribuição granulométrica e morfologia;
- Verificar a compatibilidade química entre a INH e os excipientes utilizados no preparo das micropartículas;
- Determinar os perfis de liberação *in vitro* da INH a partir das micropartículas obtidas;
- Verificar o potencial mucoadesivo das micropartículas;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das micropartículas frente a linhagens de macrófagos alveolares;
- Avaliar *in vitro* a possível ativação de macrófagos alveolares quando incubados com as micropartículas de quitosana.

4. MÉTODOS

4.1. MATERIAL

A INH (99%), o ácido acético (99%), a quitosana (de baixo peso molecular, 75-85% desacetilação e com alto grau de pureza) e o tripolifosfato sódico (TPP) utilizados para o preparo das micropartículas foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O etanol PA usado nos estudos de caracterização das partículas foi obtido da Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram adquiridos metanol e acetonitrila de grau HPLC da J.T.Baker (Philisburg, USA) e ácido fosfórico da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). A mucina suína utilizada foi a de tipo III (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e o hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido da Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). A membrana de acetato de celulose (PM 12000 a 4000 Da) usada nos testes *in vitro* de liberação eram da Fisherbrand (Leicestershire, UK). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e o DMSO (dimetilsulfóxido) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O soro fetal bovino (SFB) e o meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) foram adquiridos na Gibco (Grand Island, NY, USA) e o Azul de Trypan na InvitroGen (San Diego, USA). O LPS (lipopolissacarídeo) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e os kits para os ensaios de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Todas as análises foram realizadas com água tipo Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INH

Inicialmente, para se determinar o comprimento de onda no qual a INH possui máxima absorção, foi utilizado um espectrofotômetro de UV/Vis Shimadzu, modelo UV-1800. As cubetas eram de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de absorção máxima para o fármaco no UV/Vis foi determinado realizando-se uma varredura de uma solução aquosa de INH a 15 µg/mL no espectrofotômetro, na faixa de comprimento de onda (λ) entre 200 nm e 800 nm. O comprimento de onda de máxima absorção no UV/Vis ($\lambda_{MÁX}$) para este fármaco foi então selecionado para a análise de INH nas amostras em CLAE.

O doseamento da INH foi realizado por CLAE utilizando-se um equipamento da marca Shimadzu, modelo LC 20-AD. O equipamento era composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm Shim pack, Shimadzu) e fase móvel composta por uma mistura de água acidificada e metanol (85:15) (v/v). A água foi acidificada com ácido fosfórico, 0,01M, pH 3.3. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20 µL, o forno foi utilizado à temperatura ambiente e a detecção foi feita em comprimento de onda igual a 263 nm (KUNDAWALA et al., 2011a; RAFEEQ et al., 2010, UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015).

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método cromatográfico foi validado considerando os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão e precisão intermediária, limite de detecção e quantificação, de acordo com as orientações da ICH (do inglês *International Conference of Harmonisation*) Q2B (1996) e Resolução 899 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2003).

4.3.1. Seletividade

A seletividade (ou especificidade) do método analítico foi verificada por meio da análise de INH em amostras a 100 µg/mL contaminadas ou não com soluções do polímero quitosana a uma mesma concentração. Parâmetros de tempo de retenção e área do pico do fármaco obtidos das corridas foram então comparados.

4.3.2. Linearidade

Três soluções-mãe de INH na concentração de 100 µg/mL foram preparadas em água partindo-se de pesagens independentes do fármaco e, a partir de cada uma delas, foram feitas sete diluições em água para se obter amostras nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 µg/mL. A curva analítica foi obtida relacionando-se a área do pico gerado pelo equipamento com a respectiva concentração de INH. A análise estatística dos dados foi obtida utilizando-se o método de regressão linear, resultando em uma reta no formato $y = ax + b$, em

que (*a*) corresponde ao coeficiente angular e (*b*) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (*r*), de acordo com o parâmetro mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2003).

4.3.3. Precisão

A precisão do método foi verificada pela análise em triplicata de amostras de INH em três concentrações diferentes (baixa, média e alta) da curva analítica (0,5; 2,0 e 15,0 µg/mL). A precisão do método foi avaliada através do estudo da repetibilidade – concordância entre os resultados obtidos em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesmo instrumento – e da precisão intermediária – concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV%) calculado através da seguinte fórmula:

$$CV\% = \left(\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média}} \right) \times 100$$

(Equação I)

Em que: CV% corresponde ao coeficiente de variação; *Desvio Padrão* é a estimativa do desvio padrão da média; e a *Concentração Média* é a média dos valores obtidos em triplicata para cada concentração analisada (FDA, 2001).

4.3.4. Exatidão

A exatidão foi analisada a partir das mesmas amostras utilizadas para análise de precisão. O cálculo da exatidão, no entanto, foi apresentado em função da porcentagem do erro relativo, calculado segundo a seguinte equação:

$$E\% = \left[\frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \right] \times 100$$

(Equação II)

Em que: E% corresponde à porcentagem de erro relativo; *Concentração obtida* corresponde à concentração real obtida após a análise; e *Concentração teórica* corresponde à concentração que teoricamente está presente na amostra analisada.

4.3.5. Limites de detecção e quantificação

Os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são os menores valores de INH que pode ser detectadas e quantificadas pelo método analítico desenvolvido. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio das equações teóricas (ICH, 2005) descritas abaixo:

$$LD = \left(\frac{3 \times s}{S} \right)$$

(Equação III)

$$LQ = \left(\frac{10 \times s}{S} \right)$$

(Equação IV)

Em que: *LD* corresponde ao limite de detecção; *LQ* corresponde ao limite de quantificação; *s* é o desvio padrão dos valores de intercepção do eixo Y das curvas de calibração; e *S* corresponde ao coeficiente angular da curva de calibração.

4.4. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INH

As micropartículas de quitosana foram preparadas pela técnica de atomização e secagem por *spray drying*, partindo-se do método proposto por Gelfuso et al. (2011). Para isso, foram preparadas 400 mL de soluções aquosas ácidas (1% v/v de ácido acético) com 2% (m/v) de quitosana de baixo peso molecular. Depois de dispersar o polímero na solução e manter 24 h sob agitação magnética, diferentes quantidades de INH foram dissolvidas e as soluções resultantes foram levadas para serem secas no equipamento *Spray dryer* (modelo MSD 1.0, Labmaq, Brasil). As soluções de quitosana e INH foram secas utilizando os seguintes parâmetros: fluxo = 6,8 mL/min; bico atomizador = 1,0 mm de diâmetro; fluxo do ar de atomização = 30 L/min; fluxo do ar de secagem = 4.50 m³/min; temperatura de entrada = 130 °C; temperatura de saída = 100 °C. As quantidades de quitosana e INH em cada uma das soluções que passaram pelo processo de secagem estão descritas na Tabela 1.

Também foram preparadas micropartículas reticuladas com TPP (Tripolifosfato de sódio) utilizando a mesma técnica de obtenção. Essas micropartículas foram desenvolvidas a fim de modificar a taxa de liberação do fármaco, melhorar a dispersibilidade aquosa das micropartículas formadas e avaliar possíveis diferenças no efeito biológico das partículas formadas. Para isso, antes do processo de secagem por *spray drying*, foi adicionada à dispersão polimérica 15 mL de uma solução aquosa de TPP a 1% (m/v) (CHHONKER et al.,

2015). A adição foi feita por gotejamento sob agitação mecânica a 1.500 rpm (Agitador Mecânico RW 20 Digital, IKA, Alemanha).

Tabela 1: Quantidade de fármaco (INH) e polímero (quitosana) para 400 mL de cada uma das soluções (formulações) secas no *Spray dryer*.

Formulação	Proporção polímero:fármaco	Quantidade de quitosana (g)	Quantidade de INH (g)	TPP (g)
MP QS 0	1:0	8,0	---	---
MP QS 1	1:1	8,0	8,0	---
MP QS 2	2:1	8,0	4,0	---
MP QS 3	3:1	8,0	2,7	---
MP QS TPP 0	1:0	8,0	---	0,15
MP QS TPP 2	2:1	8,0	4,0	0,15

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

As micropartículas formadas foram coletadas secas, estocadas e levadas à caracterização, que foi feita avaliando-se o rendimento do processo de obtenção, a eficiência de encapsulação do fármaco, o potencial zeta, a distribuição do tamanho de partículas e a morfologia.

4.5.1. Rendimento do processo

As micropartículas obtidas foram pesadas e o rendimento foi calculado em função da quantidade de sólidos (fármaco + polímero) adicionados na solução inicial a ser seca a partir da equação:

$$R\% = \left(\frac{Q_i}{Q_f} \right) \times 100$$

(Equação V)

Em que: $R\%$ é o rendimento do processo; Q_i é a quantidade de sólidos adicionados no início (na solução a ser seca); e Q_f é a quantidade de micropartículas formadas ao final do processo de secagem.

4.5.2. Eficiência de encapsulação

Para avaliar a quantidade de INH que foi encapsulada nas micropartículas de quitosana, foram pesadas alíquotas de 10 mg de cada uma das micropartículas desenvolvidas. Cada uma dessas alíquotas foi dispersa em 10 mL de uma solução aquosa ácida (1% v/v de ácido acético) e deixada sob agitação magnética a 500 rpm por 24 h. Ao final desse período, os sistemas foram colocados em banho de ultrassom por 30 minutos, filtrados e a solução final foi quantificada por CLAE-UV. A quantidade de INH encapsulada nas micropartículas foi calculada a partir da equação a seguir:

$$EE\% = \left(\frac{Q_{obtida}}{Q_{teórica}} \right) \times 100$$

(Equação VI)

Em que: EE% é a eficiência de encapsulação de INH nas micropartículas; Q_{obtida} é a quantidade de INH extraída das micropartículas; e $Q_{teórica}$ é a quantidade de INH que teoricamente estaria presente em 10 mg das micropartículas desenvolvidas.

4.5.3. Potencial zeta

Aproximadamente 5 mg de cada uma das micropartículas foram suspensas em uma solução hidroalcoólica (60% v/v etanol em água) contendo 10 mM de NaCl para garantir a condutividade do meio (GELFUSO et al., 2011). A análise de potencial zeta foi feita por determinação da mobilidade eletroforética das partículas utilizando-se o equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, EUA).

4.5.4. Análise granulométrica das micropartículas

A distribuição do tamanho de cada uma das amostras de partículas foi determinada por difração a *laser* em um equipamento *Beckman Coulter LS 13 320*. Para a análise, aproximadamente 5 mg das micropartículas foram suspensas em 2 mL de etanol. As suspensões preparadas foram levadas para análise no equipamento utilizando o módulo líquido universal (ULM – *Universal Liquid Module*) e, como meio dispersante, foi usado o etanol.

4.5.5. Morfologia

A morfologia das micropartículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os diferentes tipos de micropartículas desenvolvidas foram colocadas em um suporte de latão (liga metálica de cobre e zinco) e revestidas com ouro para então serem levadas ao equipamento MEV (Quanta 250 FEG, FEI, EUA) para análise. As imagens foram analisadas utilizando-se aumento de 1000 a 10000 vezes.

4.6. ESTUDO DA COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE A INH E OUTROS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO

4.6.1. Análise térmica

A caracterização térmica para verificar se há alguma interação do fármaco com os outros componentes das micropartículas foi realizada por calorimetria diferencial exploratória (DSC – do inglês: *differential scanning calorimetry*). A análise de DSC foi realizada utilizando o equipamento DSC-60A (Shimadzu, Japan). Amostras de 2 a 4 mg foram colocadas em suportes “*pans*” de alumínio e analisadas sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10°C/min, entre a faixa de temperatura entre 25° C e 300° C.

O grau de cristalinidade da INH (C) foi calculado a partir das entalpias associadas à fusão do fármaco, empregando a seguinte equação (CUNHA-FILHO et al., 2007):

$$C = \frac{100 \times \Delta H_f}{\Delta H_i}$$

(Equação VII)

Em que: ΔH_i é a entalpia de fusão do fármaco em seu estado cristalino original e ΔH_f é a entalpia de fusão do INH obtida após a obtenção das micropartículas.

Foram analisados os componentes das formulações separadamente (INH, quitosana, TPP), as micropartículas obtidas por *spray drying* (MP QS 1, MP QS 2, MP QS 3 e MP QS TPP 2) e as misturas físicas dos componentes nas proporções usadas para produzir as micropartículas.

4.6.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterizar a estrutura molecular e elucidar as interações fármaco – excipientes, foram feitos estudos de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*). As análises foram feitas no equipamento Spectrum 100 (PerkinElmer, EUA). Os espectros foram registrados em comprimentos de onda que variaram de 4000 a 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

Para as análises de FTIR, foram utilizados como amostras os componentes das formulações separadamente (INH, quitosana, TPP), as micropartículas obtidas por *spray drying* (MP QS 1, MP QS 2, MP QS 3 e MP QS TPP 2) e as misturas físicas dos componentes nas proporções usadas para produzir as micropartículas.

4.7. ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO

Os perfis de liberação do fármaco a partir das micropartículas desenvolvidas foram determinados *in vitro* utilizando-se células de difusão de Franz modificadas (Figura 8).

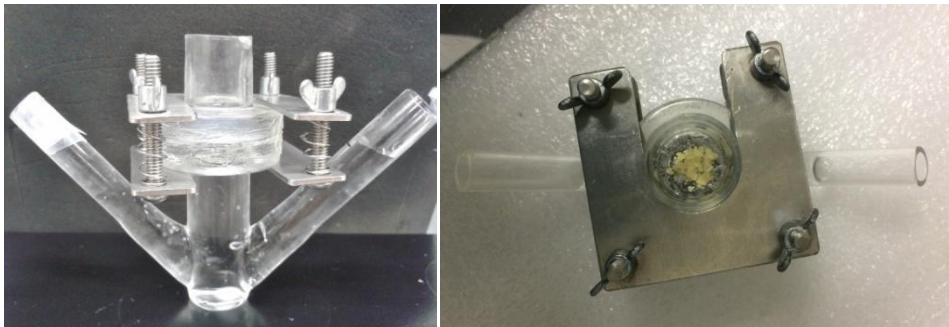


Figura 8. Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização dos estudos *in vitro* de liberação.

Para o ensaio, uma membrana sintética hidrofílica de acetato de celulose foi posicionada entre o compartimento doador e receptor de cada uma das células. O compartimento receptor foi preenchido com uma solução tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,4, enquanto 20 mg das micropartículas secas foram colocadas sobre a membrana de acetato de celulose no compartimento doador. Amostras (1 mL) da solução receptora foram coletadas em intervalos de tempos definidos (20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240, 300, 360 e 720 minutos), filtradas e levadas para análise em CLAE-UV. À medida que as amostras eram coletadas, o mesmo volume de solução tampão era repostado no compartimento receptor. Durante todo o experimento as células de Franz foram mantidas em temperatura ambiente ($\sim 30^\circ \text{C}$).

O perfil de liberação da INH foi determinado construindo-se gráficos que relacionaram a quantidade de fármaco liberada (μg) em função do tempo (minutos).

4.8. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL MUCOADESIVO DAS MICROPARTÍCULAS

O potencial mucoadesivo das micropartículas foi avaliado por meio da medida do potencial zeta, tendo como base o método usado por Chonker et al. (2015) com algumas modificações.

Mucina suína do tipo III (MCN) foi hidratada em água, a temperatura de 4°C , *overnight*, na proporção de 1:10 (m/v) e, posteriormente, teve o pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1,0 M. A solução foi diluída a uma concentração final de MCN igual a 1% (m/v).

Foram adicionadas 5 mg de micropartículas em 5 mL de solução de MCN. As dispersões foram agitadas em vortex (IKA, Alemanha) por aproximadamente 1 min e analisadas quanto ao potencial zeta no aparelho Zetasizer Nano Series. As análises foram realizadas em intervalos de tempo definidos: 10, 30, 60, 90, 120 minutos.

A capacidade mucoadesiva das micropartículas foi determinada através de gráficos que relacionaram a variação do potencial zeta (mV), após a incubação com a solução de mucina, em função do tempo (minutos).

4.9. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MICROPARTÍCULAS

Para os estudos com células foram utilizados macrófagos alveolares pertencentes à linhagem murina AMJ2-C11 (ATCC-CRL-2456, BCRJ, banco de células do Rio de Janeiro). As células foram cultivadas a 37°C , 5% CO_2 em garrafas contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). A garrafa de cultura foi então raspada, as células coletadas em tubos de 50 mL e submetidas à centrifugação por 10 minutos a 1.500 rpm. Após a centrifugação, foram ressuspensas em meio DMEM incompleto para contagem e verificação da viabilidade celular. A contagem do número de células e sua viabilidade foram realizadas usando corante Azul de Trypan em câmara de Neubauer.

As micropartículas selecionadas para serem utilizadas nesses estudos foram as MP QS 2, MP QS 0, MP QS TPP 2 e MP QS TPP 0.

4.9.1. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade celular através da atividade mitocondrial das células (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011). O ensaio se baseia na conversão do MTT em formazan pela enzima succinato desidrogenase que está presente na mitocôndria das células ativas. A quantidade de formazan (precipitados de cor roxa) produzida é proporcional ao número de células que possuem atividade metabólica e que, conseqüentemente, estão viáveis (MANCA et al., 2013). A quantificação do formazan é feita através da medida de absorbância por análise espectrofotométrica em 550 nm.

Os macrófagos alveolares AMJ2-C11 foram plaqueados em placa de 96 poços em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% SFB, na proporção de 2×10^5 células/poço/200 μ L. As células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂, *overnight* para aderirem ao fundo do poço. Após a adesão das células, o meio de cultura foi trocado por 200 μ L de meio DMEM completo contendo 0,01; 0,1 e 1,0 mg/mL de micropartículas. Depois de adicionar as micropartículas, a placa foi incubada por 24 horas a 37°C, 5% CO₂. No dia seguinte, o meio de cultura foi coletado e separado para posterior dosagem de citocinas. Foram adicionados 150 μ L de meio DMEM sem vermelho de fenol e 10 μ L de MTT na concentração 5 mg/mL. As células foram incubadas por 4 horas, nas mesmas condições, para que o sal de MTT fosse reduzido, possibilitando a avaliação da viabilidade das células. A absorbância referente a cada poço foi determinada em espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax, Molecular Advices) a 550 nm. O DMSO (puro) e LPS (0,25 μ g/mL) foi usado como controle positivo, e para controle negativo macrófagos foram incubados apenas com meio DMEM (BITENCOURT et al., 2015; PEREIRA et al., 2015).

4.9.2. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Sobrenadantes de cultura de macrófagos alveolares AMJ2-C11 tratados com as micropartículas, conforme descrito no item anterior, foram coletados e armazenados até o momento da dosagem. Empregando o método de ELISA, a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram realizadas utilizando-se anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e citocinas padrões, de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância

(densidade óptica) foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax, Molecular Advices) com filtro a 450 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão, sendo o limite de variação de detecção das citocinas de 4000 pg/mL a 20 pg/mL. Como controle positivo para produção de citocinas inflamatórias, foi utilizado o LPS (0,25 µg/mL) e para comparação com fármaco encapsulado nas micropartículas foi utilizado o próprio fármaco (INH) solubilizado no meio.

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados quantitativos de, pelo menos, três replicatas foram representados nas Tabelas e Figuras como média \pm desvio padrão. As regressões lineares e equações de reta foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2007. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism v.3.00. As diferenças significativas entre conjunto de dados foram verificadas por análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INH

Foi realizada varredura de uma solução aquosa de INH a 15 $\mu\text{g/mL}$ para definir o comprimento de onda de absorção máxima do fármaco. O espectro de varredura na região do UV/Vis está apresentado na Figura 9. O valor de comprimento de onda de máxima absorção encontrado para a INH foi de 263 nm, e está de acordo com o descrito na literatura (KUNDAWALA et al., 2011a; RAFEEQ et al., 2010). Sendo assim, esse comprimento de onda foi selecionado para a detecção da INH durante a quantificação do fármaco por CLAE-UV.

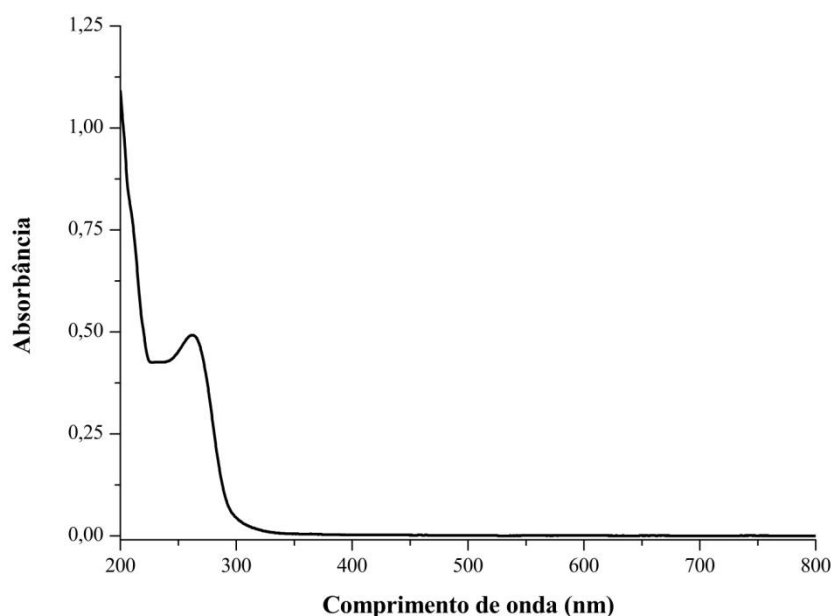


Figura 9. Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução aquosa de INH a 15 $\mu\text{g/mL}$.

O principal objetivo de se validar um método analítico é demonstrar, por meio de estudos experimentais, que os resultados obtidos com a sua execução são confiáveis (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007; TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). O método analítico padronizado em CLAE-UV para a quantificação de INH em ensaios de caracterização das micropartículas de quitosana e ensaios *in vitro* de liberação foi validado seguindo parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

Para a obtenção de um pico cromatográfico com características aceitáveis de simetria e tempo de retenção, foram testadas combinações de fase móvel com diferentes proporções. A

combinação de água com acetonitrila na proporção 90:10 (v/v) resultou em uma baixa interação da INH com a coluna (fase estacionária), fazendo com que o fármaco eluísse junto com o pico referente aos solventes. A combinação água e metanol (90:10, 70:30 e 60:40 v/v) resultou em picos com resolução inadequada, formando caudas e ombros. Já a acidificação da água com 0,01 M de ácido fosfórico e a mistura com uma proporção de 85:15 (v/v) com metanol proporcionou um pico adequado do fármaco, com boa resolução.

Para as análises cromatográficas do INH, dessa forma, a fase móvel foi composta por água acidificada com 0,01 M de ácido fosfórico e metanol na proporção de 85:15 (v/v), a coluna utilizada foi uma C₁₈ de fase reversa, a vazão de fase móvel foi de 1 mL/min, o volume de injeção de amostras foi igual a 20 µL e a detecção foi feita em 263 nm. Foi possível observar que o pico da INH foi obtido com 1,7 minutos de eluição, conforme é mostrado na Figura 10.

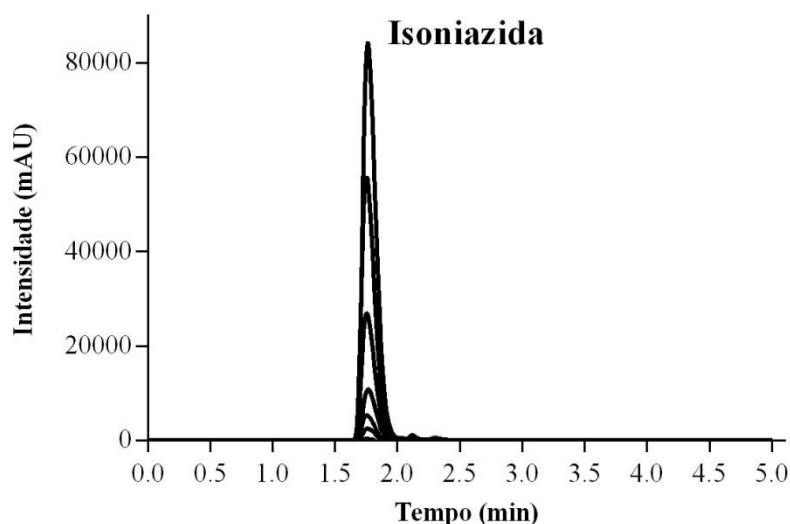


Figura 10. Cromatogramas sobrepostos referentes a soluções aquosas de INH em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 µg/mL).

5.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi analisada para garantir a exata quantificação do fármaco na presença de outros componentes da formulação. Na Figura 11 está representada a sobreposição dos cromatogramas referentes à injeção da solução de INH na presença e ausência de uma solução de quitosana.

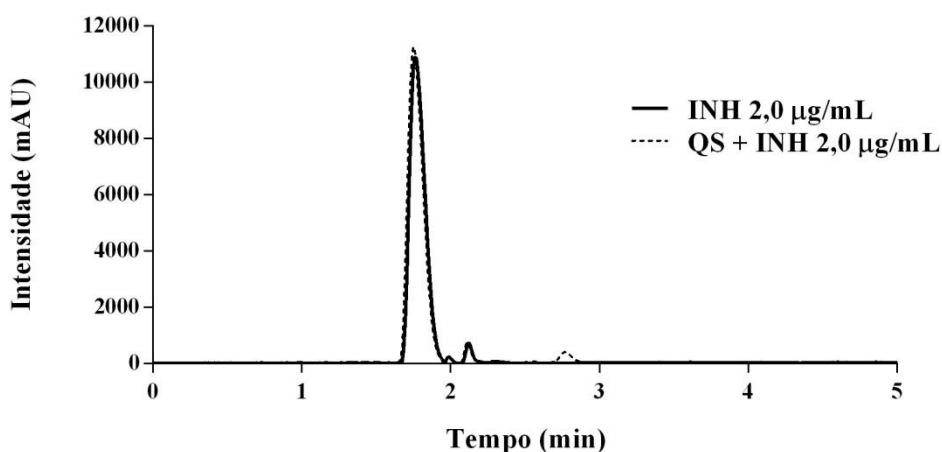


Figura 11. Sobreposição dos cromatogramas referentes a uma solução aquosa de INH a 2,0 µg/mL e uma solução aquosa de INH, na mesma concentração, contaminada com quitosana.

Verificou-se que a presença do polímero quitosana, principal excipiente usado na formulação das micropartículas, não gerou diferença significativa ($p < 0,05$) nem no tempo de retenção, nem na magnitude do pico referente ao fármaco INH. Desta forma, conclui-se que o polímero não interferiu na quantificação do fármaco, o que prova a seletividade do método para determinação de INH formulado em micropartículas de quitosana.

5.1.2. Linearidade

A linearidade de um método verifica que os resultados das amostras analisadas estão dentro de um intervalo de concentração definido (curva analítica) e que, nesse intervalo, a resposta obtida na análise é linearmente proporcional à concentração do analito (fármaco) na amostra em estudo (GREEN, 1996). A curva analítica obtida para o estudo de linearidade do método para a quantificação da INH está representada na Figura 12.

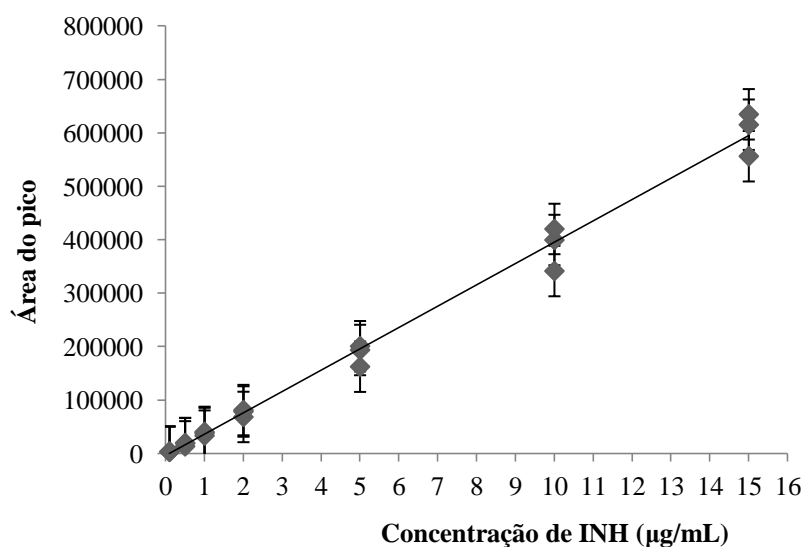


Figura 12. Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para soluções aquosas de INH na faixa de concentração entre 0,1 e 15,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 39939x - 4585$, $r^2 = 0,991$.

Por meio do cálculo da regressão linear, verificou-se que o coeficiente de correlação linear (r^2) obtido foi igual a 0,991, valor que está de acordo com o limite estabelecido pela RE n° 899 de 2003 da ANVISA. O método desenvolvido, portanto, pode ser considerado linear para quantificação de INH na faixa de concentração que vai de 0,1 µg/mL a 15 µg/mL.

5.1.3. Precisão e exatidão

A precisão é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos a partir de análises repetidas e independentes utilizando um mesmo método e uma mesma amostra (ANVISA, 2003). Já a exatidão de um método é o grau de concordância entre os resultados esperados (teóricos) com os resultados reais obtidos após a análise (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). Precisão e a exatidão para o presente método analítico foram determinadas e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação da INH.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida (experimental)	Precisão CV (%)	Exatidão E (%)
Intracorrída (n=9)			
0,5	0,523	0,853	104,683
2,0	1,970	4,939	98,524
15,0	14,717	4,038	98,117
Intercorrída (n=9)			
0,5	0,515	4,321	103,037
2,0	2,014	4,376	100,709
15,0	14,612	4,219	97,411

A precisão foi avaliada e os valores de coeficiente de variação (CV%) foram de 0,85 a 4,93%, estando de acordo com os limites determinados, em que o valor máximo aceitável para o CV é 5% (ICH, 2005; MATOS et al., 2015). Os valores de exatidão encontrados variaram de 97,41 a 103,03%. Esses valores também estão de acordo com os limites estabelecidos pelas agências regulatórias (ANVISA, 2003; GRATIERI et al., 2012; ICH, 2005).

5.1.4. Limites de detecção e quantificação

O LD é definido como a menor concentração de analito (fármaco) que pode ser detectada e distinguida do zero (ruído do equipamento), mas não necessariamente quantificada (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007). Já o LQ representa a menor concentração de analito (fármaco) que pode ser quantificada de forma confiável utilizando um determinado método experimental (RIBANI et al., 2004). Os limites de detecção e quantificação encontrados para o método foram iguais a 0,176 $\mu\text{g/mL}$ e 0,532 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estes valores representam as menores quantidades do fármaco que podem ser detectadas e quantificadas com precisão e exatidão pelo método desenvolvido, sendo adequados para análise de INH nas amostras a serem estudadas.

5.2. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INH

Micropartículas de quitosana têm sido desenvolvidas com o objetivo de controlar a liberação, proteger, aumentar a estabilidade e melhorar a biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (SINHA et al., 2004). Além disso, as características bioadesivas do polímero, que podem resultar na formação de micropartículas mucoadesivas, traria avanços ao tratamento, uma vez que aumentam o tempo de residência do medicamento em contato com mucosas.

Os parâmetros utilizados neste trabalho para a preparação das micropartículas de quitosana pelo método de secagem por *spray drying* foram baseados no trabalho realizado por Gelfuso et al. (2011), que desenvolveram micropartículas de quitosana para a administração tópica do minoxidil sulfato. Algumas condições foram modificadas com o objetivo de reduzir as dimensões das micropartículas formadas, como a seleção da quitosana de baixo peso molecular ao invés da de médio peso e a concentração inicial de quitosana na formulação inicial. A vazão de alimentação das amostras no aparelho, do ar de atomização e do ar de secagem também sofreram pequenas modificações, bem como a temperatura de secagem, que foi aumentada em 5°C.

Optou-se também, neste trabalho, por preparar micropartículas de quitosana previamente reticulada com o poliânion TPP. A escolha desse agente reticulante deu-se pelo fato dele ser atóxico (ARAL; AKBUĞA, 1998; DESAI; PARK, 2005a; KO et al., 2002), diferente das outras alternativas normalmente utilizadas, como glutaraldeído. A reticulação das micropartículas de quitosana foi testada com o objetivo de facilitar a dispersão das partículas em meio aquoso, uma vez que a neutralização parcial das cargas do polímero deve reduzir o intumescimento da matriz de quitosana (DESAI; PARK, 2005a; HE; DAVIS; ILLUM, 1999). A reticulação do polímero também deverá ter influência na cinética de liberação do fármaco pelo sistema microencapsulado.

A Figura 13 mostra as características macroscópicas das micropartículas de quitosana formadas. Todas apresentaram-se como um pó claro, fino e de coloração levemente amarelada, diferente do polímero utilizado para o preparo, que possui granulometria mais grossa e coloração amarela mais forte.



Figura 13. Aspecto macroscópico das micropartículas de quitosana formadas.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A Tabela 3 apresenta os resultados para os parâmetros avaliados para caracterização das micropartículas de quitosana obtidas.

Tabela 3: Parâmetros utilizados e resultados da caracterização das micropartículas obtidas.

Formulação	Proporção polímero:fármaco	Rendimento (%)	Eficiência de encapsulação (%)	Potencial zeta (mV)	Diâmetro médio (μm)
MP QS 0	1:0	46,3	---	+ 29,8 \pm 14,2	3,26 \pm 3,86
MP QS 1	1:1	37,5	89,0 \pm 7,3	+ 23,0 \pm 16,0	3,21 \pm 2,47
MP QS 2	2:1	40,0	94,9 \pm 5,4	+ 24,9 \pm 14,6	3,29 \pm 2,77
MP QS 3	3:1	39,9	96,8 \pm 13,0	+ 27,5 \pm 21,0	3,54 \pm 3,61
MP QS TPP 0	1:0	38,25	---	+ 25,0 \pm 24,1	3,89 \pm 4,06
MP QS TPP 2	2:1	30,5	114,9 \pm 0,2	+ 17,7 \pm 29,1	3,83 \pm 3,72

5.3.1. Rendimento do processo

O rendimento do processo de obtenção das micropartículas de quitosana preparadas utilizando-se a técnica de *spray drying* variou de 30,5 a 46,3% (Tabela 3). Valores relativamente baixos de rendimento como esses aqui apresentados têm sido relatados quando se utiliza a quitosana como polímero para a formação de micropartículas utilizando-se essa técnica. Isto porque, quando as gotículas da solução polimérica são pulverizadas para dentro do *spray dryer*, elas chocam-se com a parede do equipamento, formando um filme que fica fortemente aderido à câmara de secagem, o que tem impacto no rendimento de obtenção de partículas (GELFUSO et al., 2011).

Outro fator que parece afetar a questão do rendimento é a quantidade de material a ser seco. Ao ser realizado em grandes escalas, o processo de secagem resultaria em um maior rendimento devido a maior quantidade de produto e, assim sendo, a formação do filme não influenciaria o rendimento final de maneira tão significativa.

Apesar dos inconvenientes, a técnica de obtenção de micropartículas por *spray drying* foi escolhida devido ao fato de ser um método que ocorre em uma única etapa, sendo um processo simples, rápido e de baixo custo (SILVA et al., 2003). O processo é também de fácil transposição de escala e resulta em um pó seco, facilitando o armazenamento e contribuindo para a estabilidade do produto. Além disso, as micropartículas preparadas por *spray drying* normalmente possuem forma esférica, uniformidade na distribuição de tamanho e alta eficiência de encapsulação (HE; DAVIS; ILLUM, 1999), que são características tecnológicas altamente desejáveis.

5.3.2. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) é um importante parâmetro da caracterização, pois define a quantidade de fármaco efetivamente associada ao carreador microestruturado. Os resultados de EE% encontrados para cada uma das micropartículas obtidas estão apresentados na Tabela 3. Todas as micropartículas apresentaram altos valores de EE%, conforme o esperado para a técnica de obtenção (SILVA et al., 2003).

Os valores de EE% para as micropartículas de quitosana sem agente reticulante variaram de 89,05 a 96,87%, porém não apresentaram diferença estatística significativa entre si ($p < 0,05$). Outros autores também obtiveram altos valores de eficiência de encapsulação: Kundawala et al. (2011) obtiveram micropartículas de quitosana contendo INH por *spray drying* e encontraram valores de EE% que variaram de 87 a 107%, e Naikwade et al. (2009) obtiveram micropartículas carregadas com budesonida, que superaram a taxa de 115% de eficiência de encapsulação.

As micropartículas reticuladas com TPP apresentaram o maior valor absoluto de eficiência de encapsulação. Durante o preparo, foi observado que TPP proporcionou um aumento de viscosidade da solução polimérica de quitosana, o que pode ter retido mais o fármaco na matriz polimérica no decorrer da secagem por *spray drying* (KO et al., 2002). As micropartículas de quitosana reticuladas com TPP que foram produzidas por Densai e Park (2005) para encapsularem o fármaco hidrofílico acetaminofeno apresentaram valores de EE%

próximos a 99% (DESAI; PARK, 2005b), o que corrobora os altos valores também encontrados em nossos experimentos.

5.3.3. Potencial zeta

Com relação ao potencial zeta das micropartículas (Tabela 3), é possível observar que as formulações que apresentam maior quantidade de polímero em relação à quantidade de INH apresentaram maior concentração de carga superficial. O fármaco, desta forma, parece neutralizar as cargas da partícula provenientes do polímero quitosana; logo, quanto maior a quantidade de INH, menos positiva foi a partícula formada. Huang, Chiang e Yen (2003) também verificaram uma redução do potencial zeta de suas partículas de quitosana com o aumento da proporção de fármaco em sua composição.

As micropartículas preparadas com o agente reticulante em sua composição tiveram seus potenciais zeta ainda mais diminuídos quando comparadas às partículas sem TPP. Isso ocorre devido à interação eletrostática que ocorre entre o TPP (carga negativa) e a quitosana (carga positiva), resultando em uma neutralização iônica e fazendo com que a carga residual final das partículas obtidas seja menos positiva (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004).

Apesar das diferenças nos valores de potencial zeta das micropartículas obtidas, todas elas apresentaram carga superficial positiva. Isso ocorre devido à alta positividade dos grupamentos amino da quitosana, os quais estão em grande número em suas cadeias, e que deverão contribuir para a bioadesividade do sistema formado (HARRIS; LECUMBERRI; HERAS, 2010; ISLAM et al., 2012).

5.3.4. Análise granulométrica das micropartículas

Na Tabela 3 também estão apresentados os valores de diâmetro médio das micropartículas obtidas a partir das diferentes formulações desenvolvidas. É possível observar que os valores de diâmetro médio encontrados para as formulações MP QS 1, MP QS 2 e MP QS 3 são muito semelhantes entre si.

Na Figura 14 está apresentado o gráfico de distribuição granulométrica das partículas obtidas.

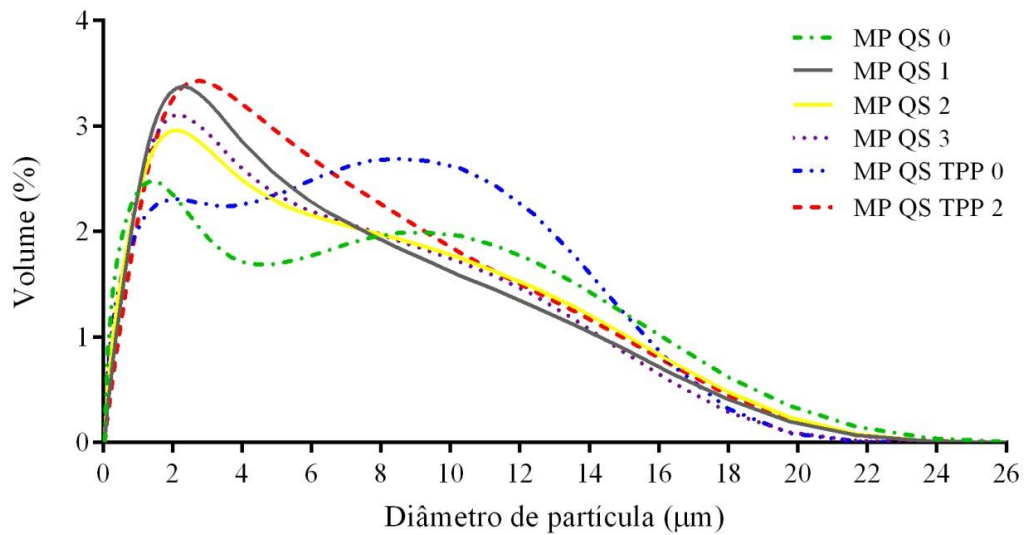


Figura 14. Distribuição de diâmetro em razão da porcentagem de volume diferencial das micropartículas de quitosana contendo ou não INH em diferentes proporções.

Conforme discutido anteriormente, o tamanho das partículas é característica primordial para o desenvolvimento de produtos adequados para a administração pulmonar de fármacos na forma de pó seco. Para alcançar os alvéolos pulmonares, as micropartículas precisam estar em uma faixa de tamanho considerada ideal, variando de 1 – 5 µm (HINDS, 1999; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). Partículas menores que 1 µm podem ser expulsas na expiração pois não conseguem se depositar adequadamente no tecido alveolar, e partículas maiores que 5 µm correm o risco de ficarem retidas no epitélio mucociliado que reveste todo o trato respiratório (TAYLOR, 2005). Apesar do diâmetro médio apresentado por todas as micropartículas contendo INH terem sido em torno de 3 µm, os sistemas microparticulados não foram homogêneos quanto às dimensões de partículas, apresentando partículas de dimensões superiores à faixa de tamanho requerido para promover a correta deposição pulmonar do pó seco após inalação (Figura 14). Entretanto, os estudos realizados mostraram que a maioria das micropartículas presentes nas formulações estão dentro da faixa tamanho considerada adequada para inalação. As formulações MP QS 1, MP QS 2, MP QS 3 e MP QS 0 apresentaram 75% das partículas com tamanho inferior a 4,70 µm, ao passo que as micropartículas que foram produzidas com TPP (MP QS TPP 2 e MP QS TPP 0) apresentaram em sua composição 75% das partículas com tamanhos menores que 5,22 e 6,06 µm, próximos a faixa de tamanho considerada ideal. Estes resultados mostram que as micropartículas produzidas possivelmente se depositarão de maneira eficaz nas vias aéreas inferiores; porém estudos que avaliam a aerodinâmica das partículas serão necessários para confirmar estes achados.

5.3.5. Morfologia

A morfologia das micropartículas foi analisada por MEV e as fotomicrografias capturadas estão apresentadas na Figura 15.

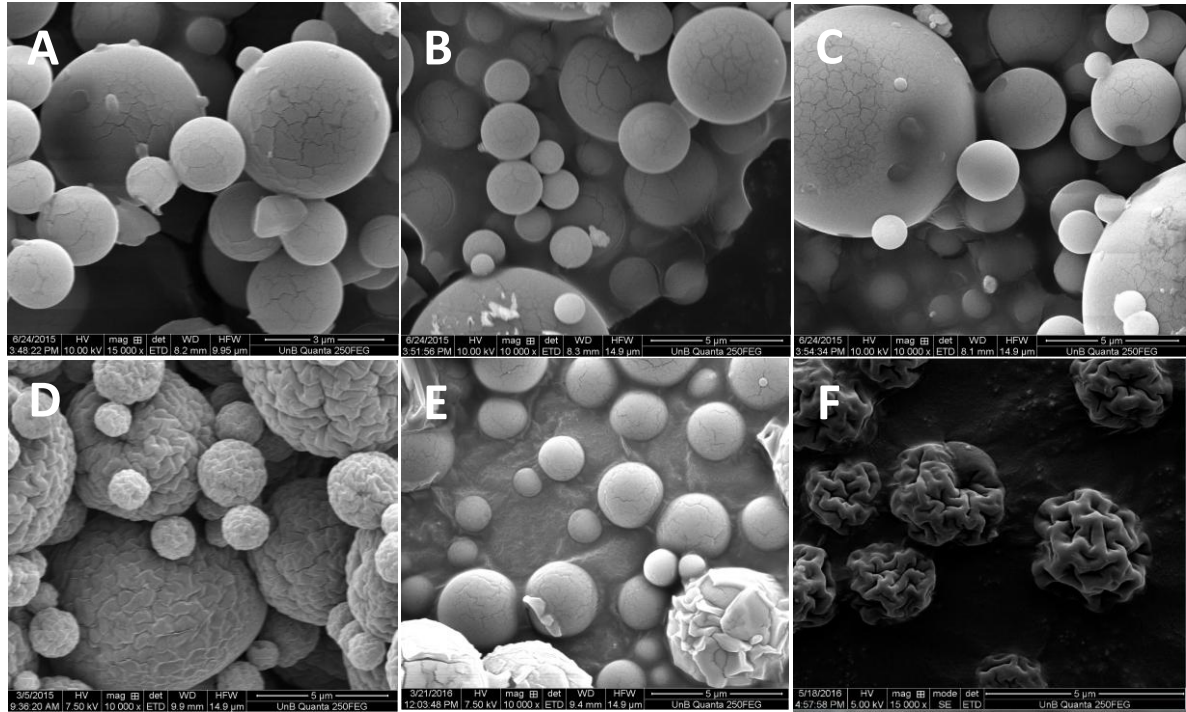


Figura 15. Fotomicrografias obtidas por MEV para as micropartículas de quitosana. (A) MP QS 1; (B) MP QS 2; (C) MP QS 3; (D) MP QS 0; (E) MP QS TPP 2; (F) MP QS TPP 0. Aumento de 10000 a 15000 vezes.

De maneira geral, todas as micropartículas obtidas foram esféricas e com dimensões variadas, mas inferiores a 5 μm . As micropartículas de quitosana preparadas sem a INH (MP QS 0 e MP QS TPP 0) apresentaram uma superfície rugosa e irregular, morfologia semelhante à observada anteriormente por Gelfuso e colaboradores (GELFUSO et al., 2011). Já as micropartículas que continham o fármaco encapsulado (MP QS 1, MP QS 2 e MP QS 3) apresentaram uma superfície lisa, sem rugosidades. As rachaduras superficiais observadas em algumas fotos podem ser artefatos da análise como resultado do aumento do potencial elétrico para aproximação das imagens.

As micropartículas que foram obtidas com agente reticulante TPP apresentaram características muito semelhantes àsquelas produzidas sem TPP, ou seja, as micropartículas reticuladas associadas ao fármaco apresentaram superfície lisa ao passo que as micropartículas sem o fármaco apresentaram superfície rugosa e irregular.

A interação do fármaco com o polímero na formação das micropartículas parece ter, portanto, influência na alteração da morfologia das micropartículas. No trabalho realizado por He, Davis e Illum (1999), também foi observado que as micropartículas de quitosana vazias apresentaram uma superfície irregular, ao contrário das micropartículas que continham fármaco em sua composição, que apresentaram uma superfície mais lisa sem irregularidades. Huang, Chiang e Yeh (2003) também obtiveram micropartículas de quitosana vazias com superfície irregular e ligeiramente enrugada, entretanto, quando tinham betametasona encapsulada, a superfície das partículas se apresentaram lisas e sem rugas.

5.4. ESTUDO DA COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE A INH E OS OUTROS COMPONENTES DAS MICROPARTÍCULAS

5.4.1. Análise térmica

Os dados térmicos obtidos a partir das análises em DSC (Figura 16) mostram que INH apresenta um único evento térmico no intervalo de temperatura representado, a fusão a 172,2° C, associada a uma entalpia de aproximadamente 57 cal g⁻¹.

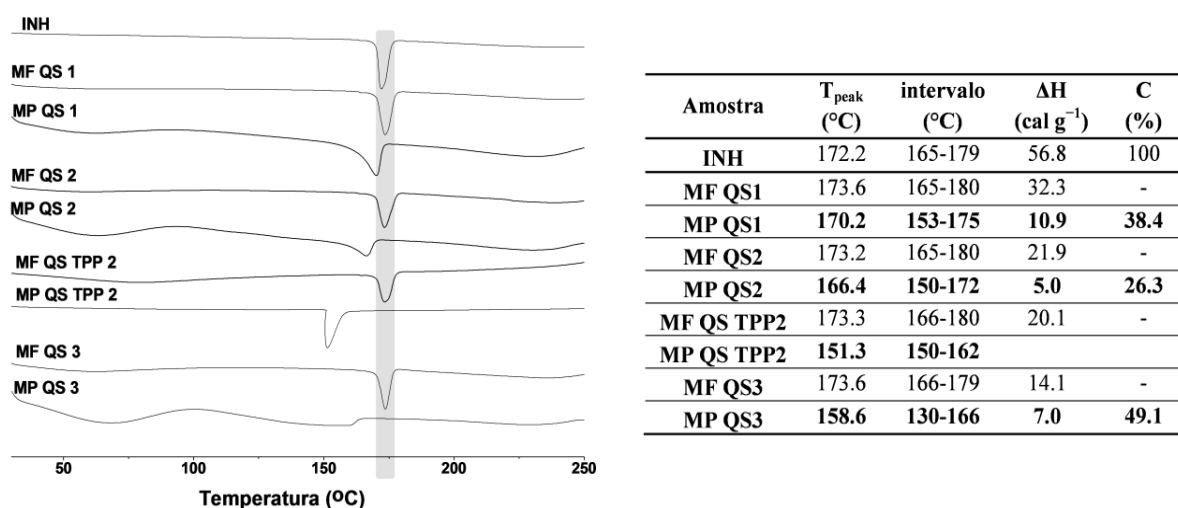


Figura 16. Termogramas da INH, das misturas físicas de INH e polímero, e das micropartículas, junto aos dados térmicos dessas amostras. Modificações relevantes nos eventos térmicos estão destacadas em negrito.

Nas misturas físicas de INH e quitosana, inclusive na presença de TPP, não há qualquer modificação importante no perfil térmico das amostras. Observa-se que esses termogramas são o somatório dos eventos térmicos de seus componentes individuais, sendo as

entalpias envolvidas na fusão do fármaco muito próximas às entalpias teóricas esperadas, considerando a massa de fármaco em cada amostra.

Em contrapartida, as micropartículas revelam forte interação entre o fármaco e o polímero, com modificações no intervalo de fusão do fármaco, no t_{peak} e na entalpia associada. Observa-se uma antecipação do fenômeno de fusão do fármaco, de forma mais intensa para a amostra reticuladas com TPP, que apresentou uma fusão do fármaco com antecipação de cerca de 20° C. Esse achado evidencia de que a reticulação promovida pelo TPP aumenta o grau de interação entre o fármaco e a quitosana.

As entalpias associadas à fusão do INH permitiram calcular o grau de cristalinidade (C) das micropartículas. Observa-se que, no processo de micronização do fármaco, há uma conversão parcialmente de INH ao estado amorfo. A amorfização do fármaco é mais intensa quando as micropartículas são preparadas na proporção 2:1 (p/p) na relação quitosana e INH. Esse efeito é comumente descrito na literatura para sistemas microparticulados obtidos com quitosana (BANIK et al., 2012; DEVI; MAJI, 2009).

5.4.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Na Figura 17 são mostradas as bandas características dos grupos funcionais de INH após análise de FITR das amostras.

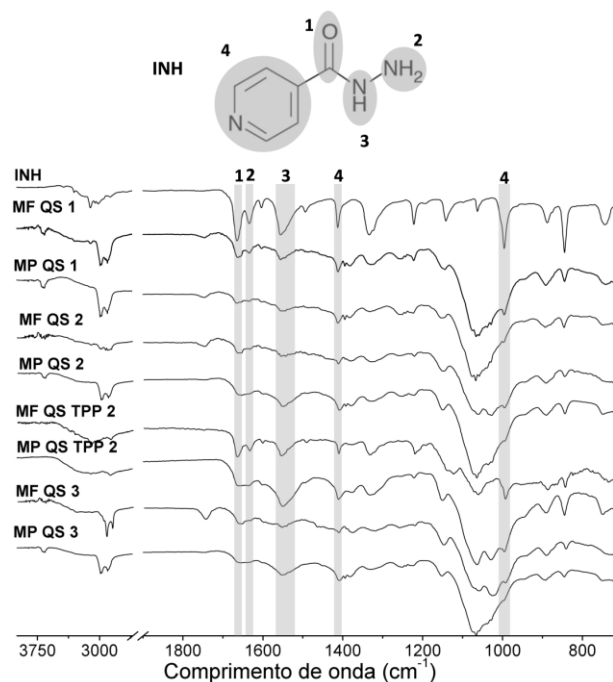


Figura 17. FTIR da INH, das misturas físicas de INH e polímero, e das micropartículas desenvolvidas.

Observa-se a 1664 cm^{-1} a vibração do estiramento da carbonila do grupo amida e a 1634 cm^{-1} a deformação do grupamento NH_2 da INH. Identificam-se ainda vibrações da flexão da ligação N-H a 1555 cm^{-1} , além de sinais correspondentes ao anel aromático a 1412 cm^{-1} (C-CH) e a 996 cm^{-1} (deformação no plano do anel aromático) estando de acordo com o descrito na literatura. (AKYUZ; AKYUZ, 2008; GUPTA; JABRAIL, 2008; PANDEY et al., 2014).

Há uma clara atenuação das bandas dos grupos funcionais de INH tanto nas misturas físicas quanto nas micropartículas devido a um efeito de diluição. Contudo, essas bandas podem ser identificadas em todas as amostras, o que indica que o fármaco se mantém estável quimicamente nas formulações obtidas.

5.5. ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO

A liberação de um fármaco a partir de micropartículas de quitosana compreende o intumescimento da matriz polimérica ao entrar em contato com o meio aquoso externo, e a difusão da molécula do fármaco através da matriz da partícula (DESAI; PARK, 2005b). Parâmetros como: proporção fármaco/polímero, EE%, tipo de quitosana e quantidade de agente reticulante podem influenciar o perfil de liberação de um fármaco a partir de micropartículas de quitosana (SINHA et al., 2004). Na Figura 18 são mostrados os perfis de liberação de INH a partir das micropartículas obtidas.

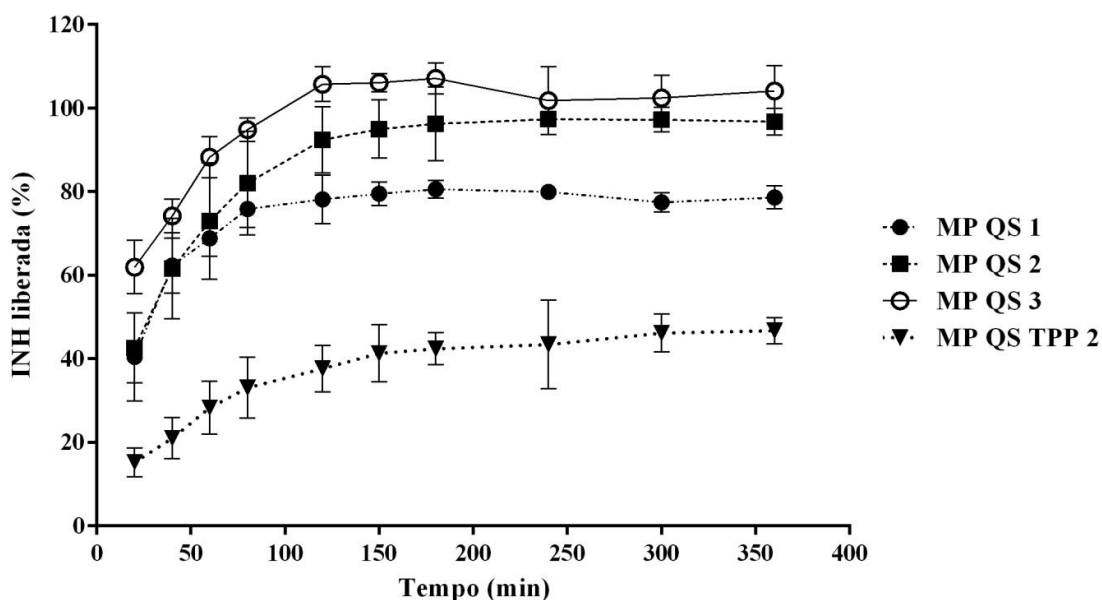


Figura 18. Perfis de liberação *in vitro* da INH, em tampão fosfato pH 7,4, a partir das micropartículas de quitosana com fármaco encapsulado, preparadas com diferentes proporções de fármaco/polímero e com ou sem reticulação com TPP, n=4.

É possível observar que as micropartículas produzidas apenas com quitosana liberaram rapidamente quase a totalidade do fármaco encapsulado, ou seja, em 120 minutos de ensaio praticamente 100% de INH foi liberada pelas três formulações (MP QS 1, MP QS 2 e MP QS 3) e o perfil de liberação da MP QS 2 não foi significativamente diferente dos perfis das formulações MP QS 1 e MP QS 3 ($p < 0,05$). A liberação acelerada do fármaco a partir das micropartículas de quitosana foi também descrita por Pham, Fattal e Tsapis (2015) e por Kundawala et al. (2012). Os autores relataram que as partículas de quitosana apresentam uma liberação inicialmente “brusca” quando comparada com as micropartículas produzidas com outros polímeros, como exemplo o PLGA, que sustenta de maneira mais efetiva a liberação de INH.

Já as micropartículas de quitosana reticuladas (MP QS TPP 2) sustentaram mais efetivamente a liberação da INH, sendo que, após 6 h de estudo, menos de 50% de INH foi liberada para o meio receptor. Outros autores já haviam descrito que a reticulação da quitosana com TPP seria capaz de retardar a liberação do fármaco (DESAI; PARK, 2005b; KO et al., 2002; SHU; ZHU, 2000). Uma possível explicação para o fato é que a adição de TPP na formulação resulta em micropartículas de quitosana mais rígidas, que se molham mais lentamente, retardando assim a liberação do fármaco (KUNDAWALA et al., 2011c).

Uma liberação inicial muito acentuada do fármaco pode ser interessante para o sistema, pois uma grande quantidade de INH liberada para os alvéolos resultaria em um rápido efeito inibidor sobre os micro-organismos causadores da tuberculose. Porém, após poucas horas a concentração de INH tenderia a reduzir, necessitando de administrações repetidas do medicamento. Por outro lado, a liberação sustentada de INH a partir das micropartículas reticuladas evitaria a necessidade de se fazer múltiplas administrações do medicamento, o que resultaria em uma maior adesão dos pacientes ao tratamento (BIGGS et al., 2003; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). A utilização de um ou outro sistema microparticulado, portanto, dependerá do que se espera com a terapia, vise ela um início de ação mais potente e rápido ou um controle prolongado da concentração terapêutica de INH no local de ação.

Uma alternativa para o emprego das micropartícula no tratamento da tuberculose seria a utilização das MP QS 2 na primeira fase do tratamento (fase intensiva) e a utilização das MP QS TPP 2 na segunda fase do tratamento, que é a fase de manutenção. Outra possibilidade é a utilização as duas formulações em um único medicamento, fornecendo as duas vantagens ao mesmo produto.

Para os estudos posteriores foram escolhidas as formulações MP QS 2 e MP QS TPP 2 para comparar o comportamento das micropartículas reticuladas ou não reticuladas com o TPP.

5.6. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA MUCOADESÃO DAS MICROPARTÍCULAS

O potencial bioadesivo da quitosana é atribuído principalmente ao seu caráter catiônico, resultante de grupamentos amino de sua estrutura (ELGADIR et al., 2014). As glicoproteínas de carga negativa presentes na superfície de mucosas, quando em contato com os grupamentos carregados positivamente da quitosana, ligam-se eletrostaticamente a elas, resultando em adesão (HE, 1998; SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008).

A Figura 19 mostra o decaimento dos valores de potencial zeta em função do tempo de incubação das micropartículas de INH com a solução de mucina, principal glicoproteína que compõe o muco que reveste a mucosa do trato respiratório.

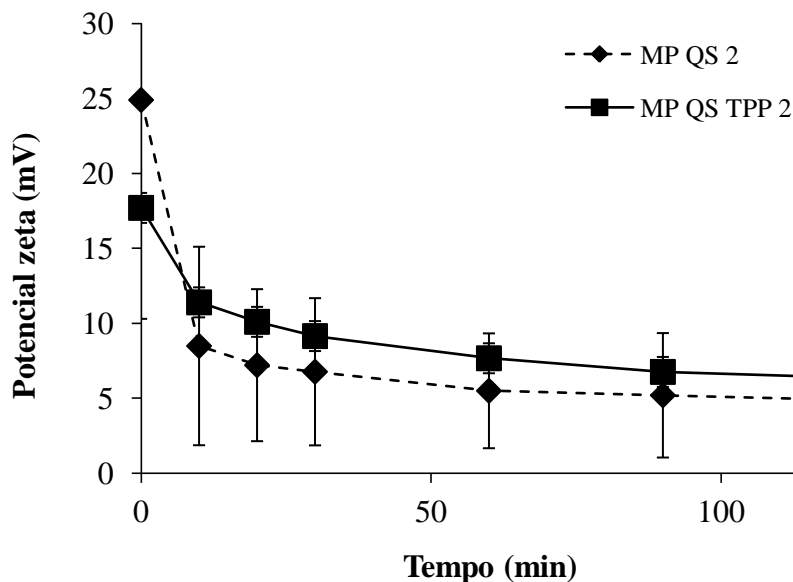


Figura 19. Avaliação do potencial zeta das micropartículas MP QS 2 e MP QS TPP 2 em função do tempo de incubação com soluções de mucina.

Os valores de potencial zeta partiram de aproximadamente + 24,9 mV e + 17,7 mV respectivamente para as micropartículas preparadas sem e com TPP. Após o contato com a mucina, o potencial de ambas as micropartículas foi reduzido, atingindo potenciais zeta iguais a + 2,91 e + 3,41 respectivamente.

A redução dos valores de potencial zeta das partículas durante o contato com a mucina é considerada um indicativo de mucoadesão (CHHONKER et al., 2015), uma vez que

indicam a ocorrência de ligações iônicas entre quitosana e mucina (BAEK et al., 2015; DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004; LIM et al., 2012).

Observa-se que as MP QS 2 tiveram uma maior variação de potencial zeta que a formulação MP QS TPP 2, sugerindo maior adesão à mucina. A reticulação das micropartículas com TPP reduz as suas cargas superficiais, reduzindo a quantidade de sítios de ligação com a mucina, o que deve diminuir a força bioadesiva das micropartículas reticuladas.

5.7. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MICROPARTÍCULAS

5.7.1. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

Ensaio *in vitro* utilizando culturas celulares constituem importantes ferramentas para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e para determinar possíveis efeitos do uso de formulações em seres humanos (MELO et al., 2000).

Para o ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos sistemas microencapsulados obtidos nesse estudo, foram utilizadas as formulações: MP QS TPP 2, MP QS TPP 0, MP QS 2, MP QS 0 e a INH não encapsulada, incubadas a diferentes concentrações (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1 mg/mL) com macrófagos alveolares AMJ2-C11 por um período de 24 horas. Como controles positivos para toxicidade celular, foram utilizados o DMSO e uma solução etanólica a 60% (v/v). Os resultados estão apresentados na Figura 20.

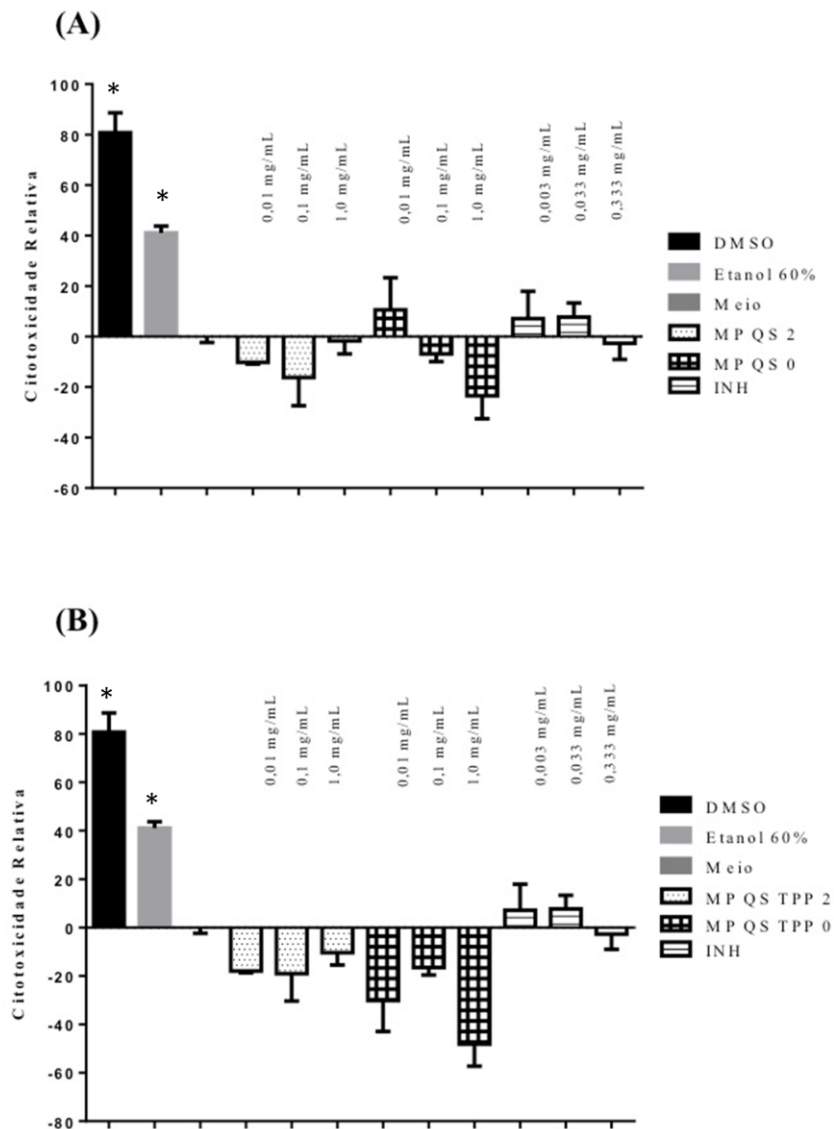


Figura 20. Efeito das micropartículas sobre a viabilidade de macrófagos alveolares AMJ2-C11. A citotoxicidade relativa ao controle negativo foi mensurada através do ensaio de MTT após 24 horas da incubação dos macrófagos com diferentes concentrações das micropartículas (A) para MP QS TPP 2 e MP QS TPP 0, ou (B) para MP QS 2 e MP QS 0; (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL), o fármaco solúvel (INH), Meio (controle negativo), DMSO e Etanol 60% (controles positivos). Os resultados são expressos em média \pm S.E.M. e representativo de dois experimentos independentes ($n = 4/\text{poços/experimento}$) / $p < 0,05$, DMEM (Meio) versus demais grupos. One-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test) foi utilizado.

Os resultados mostraram que nenhuma das formulações foram tóxicas para o macrófago alveolar no período avaliado, quando comparado aos macrófagos incubados com o meio de cultura (controle negativo). Apenas os grupos incubados com os controles positivos (DMSO e Etanol 60%) apresentaram citotoxicidade. Além disso, observou-se uma pequena proliferação desses macrófagos quando incubados com as micropartículas, principalmente os incubados com as micropartículas reticuladas, mostrando que as partículas não afetam a proliferação dessas células fagocitárias.

Ao contrário do observado neste trabalho, o estudo realizado por Bitencourt et al. (2015) verificou que as micropartículas de quitosana, também preparadas pela técnica de *spray drying*, foram potencialmente citotóxicas quando incubadas por 24 horas com macrófagos peritoniais da linhagem J-774.

As reações que determinam a biocompatibilidade e o grau de citotoxicidade de um material são extremamente complexas, pois vários fatores podem ter influência na toxicidade celular (RODRIGUES et al., 2012). A diferença de resposta pode ser devida aos tipos celulares utilizados, às características das micropartículas obtidas, às propriedades do polímero utilizado (grau de desacetilação e peso molecular da quitosana) e, também, à proporção na qual o polímero foi empregado na produção da partícula (HUANG; KHOR; LIM, 2004; HUANG et al., 2006). Alguns autores, por exemplo, afirmam que a quitosana de baixo peso molecular, utilizada no preparo dessas partículas, é preferido ao uso dos polímeros com peso molecular mais elevado, uma vez que cadeias poliméricas menores são mais eficazmente absorvidas e menos tóxicas (WU et al., 2015).

Por não se mostrarem tóxicas para macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11 nesses estudos *in vitro*, as micropartículas preparadas nesse trabalho podem ser um sistema de liberação adequado para administração pulmonar. Contudo, estudos *ex vivo* utilizando-se células primárias de ratos ou estudos *in vivo* em camundongo deverão ser realizados futuramente para assegurar os dados obtidos com esses estudos iniciais.

5.7.2. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os macrófagos são células do sistema imune que desempenham um papel central durante um processo inflamatório, uma vez que estão distribuídos pelo corpo e são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios (CHEN et al., 2007). No pulmão, existem dois tipos de macrófagos: os intersticiais e os alveolares. Os macrófagos alveolares são mais numerosos e são assim chamados por estarem concentrados nos alvéolos respiratórios (ADAMS, 1979; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

No pulmão, os macrófagos são considerados a primeira linha de defesa e, quando ativados, apresentam a capacidade de secretar moléculas sinalizadoras chamadas citocinas, que participam da resposta imune (CHEN et al., 2007). Neste sentido, as micropartículas foram testadas quanto à capacidade de ativar ou não os macrófagos alveolares através da detecção de citocinas produzidas no sobrenadante da cultura de células. Os ensaios foram

conduzidos com base nas metodologias descritas por artigos do nosso grupo de pesquisa (BITENCOURT et al., 2015; PEREIRA et al., 2015).

As citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, e a citocina anti-inflamatória IL-10 foram quantificadas do sobrenadante da cultura de macrófagos alveolares AMJ2-C11 incubados com as diferentes micropartículas por 24 horas e os resultados estão mostrados na Figura 21.

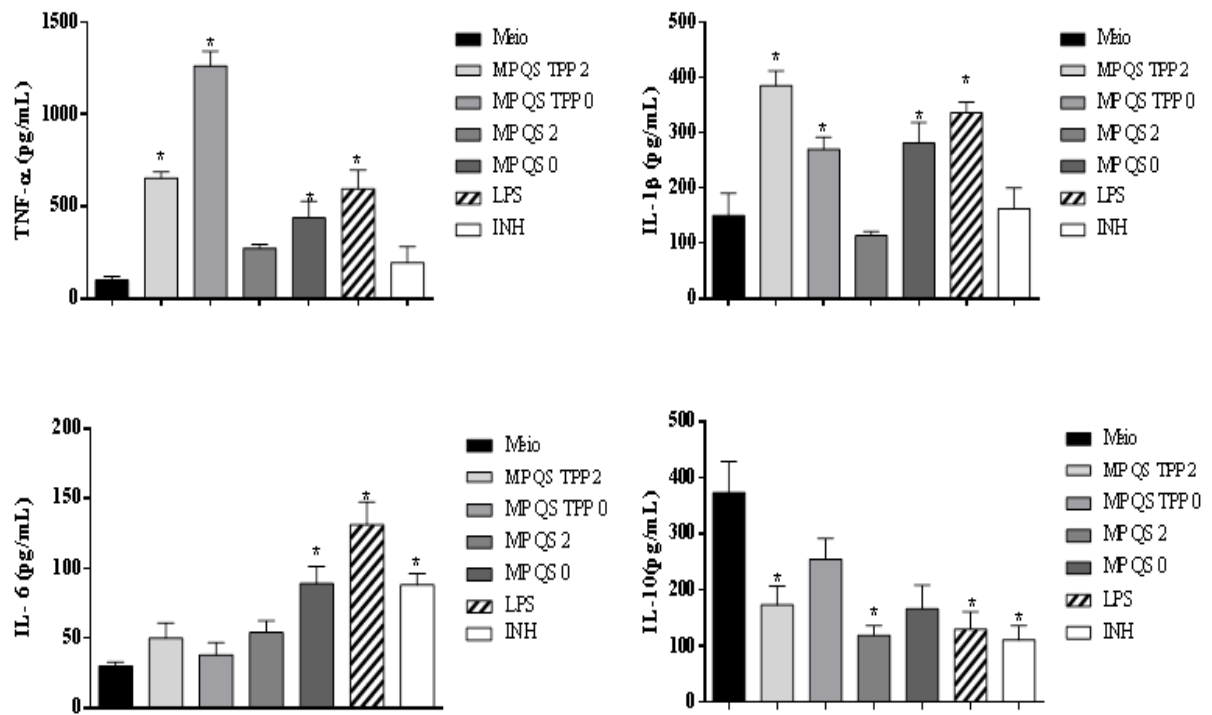


Figura 21. Citocinas detectadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) após a incubação dos macrófagos alveolares AMJ2-C11 com as micropartículas (MP QS TPP 2, MP QS TPP 0, MP QS 2, MP QS 0), o fármaco solúvel (INH), Meio (controle negativo), LPS (controle positivo). As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram mensuradas do sobrenadante de macrófagos alveolares 24 horas após a incubação com 1mg/mL das diferentes micropartículas. Os resultados são expressos em média \pm S.E.M. e representativo de dois experimentos independentes ($n = 3-4$ /poços/experimento)/ $p < 0,05$, DMEM (Meio) versus demais grupos. One-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test) foi utilizado.

A incubação de macrófagos alveolares com as micropartículas de quitosana reticuladas MP QS TPP 0 e MP QS TPP 2 aumentou a produção de TNF- α (1263,25% e 652,4%, respectivamente) e IL-1 β (180,33% e 257,11%, respectivamente) quando comparada aos macrófagos incubados somente com o meio. Entre as micropartículas que não continham agente reticulante (TPP) em sua composição, as micropartículas produzidas apenas com quitosana (MP QS 0) também foram capazes de aumentar a produção de TNF- α (em 437,16%) e IL-1 β (em 187,56%).

Observou-se um aumento na produção da citocina IL-6 (inflamatória) quando as células AMJ2-C11 foram incubadas com o fármaco (INH solúvel) e com a MP QS 0 (294,17% e 296,67% respectivamente), quando comparado aos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura.

A citocina IL-10 (perfil mais anti-inflamatório) teve sua produção diminuída quando os macrófagos alveolares foram incubados com as micropartículas que continham fármaco em sua composição (MP QS 2 e MP QS TPP 2). O mesmo aconteceu quando a INH (fármaco solúvel no meio) foi incubada com os macrófagos, sugerindo que esta diminuição de IL-10 é devida a uma ação específica do fármaco, e que o processo de encapsulação não alterou este efeito. Este achado não é válido para as outras citocinas detectadas (inflamatórias), sugerindo que, nesses casos, a micropartícula, independente da presença ou ausência do fármaco, tem efeitos sobre a produção de citocinas.

De maneira geral, foi possível observar que a INH e todas as micropartículas foram capazes de ativar os macrófagos alveolares, uma vez que houve uma produção aumentada de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e uma diminuição na produção da citocina anti-inflamatória (IL-10) quando elas foram incubadas com as formulações microparticuladas, induzindo as células a um perfil inflamatório.

Outros autores também chegaram conclusão de que o tratamento de macrófagos com micropartículas poliméricas desencadeia vários eventos celulares e bioquímicos que corroboram com o clássico perfil de um macrófago ativado (SHARMA et al., 2007; YADAV et al., 2009). Essa ativação e a concomitante produção de citocinas contribuem de maneira eficaz com a ação dos fármacos como no combate aos micro-organismos causadores da tuberculose que estão alojados no interior dos macrófagos alveolares.

Sharma et al. (2011) observaram em seus estudos que a via de administração pulmonar exerce influência no tipo de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro. Os autores observaram que quando as micropartículas poliméricas eram inaladas, a produção de TNF- α era aumentada, e que isso não era observada no tratamento com os mesmos fármacos por via oral.

No que se diz respeito ao papel do polímero quitosana, diversos trabalhos publicados descrevem o papel deste polímero no acionamento de respostas imunes (JIAO et al., 2014; SHAKYA; NANDAKUMAR, 2013) e na ativação do próprio macrófago, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, e aumentando a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (BUETER et al., 2014; LI et al., 2014; PELUSO et al., 1994; WU et al., 2015).

7. CONCLUSÕES

As micropartículas de quitosana contendo INH demonstraram ser um sistema de liberação promissor para o tratamento da tuberculose, visto que possuem tamanho médio adequado para a administração pulmonar na forma de pó seco (1 – 5 μ m). Os sistemas desenvolvidos apresentaram altos valores de eficiência de encapsulação (> 89%) e foram capazes de controlar a liberação do fármaco, principalmente quando em sua forma reticulada. A utilização da quitosana permitiu a obtenção de partículas mucoadesivas que deverão aumentar o tempo de permanência do sistema em seu local de ação após inalação.

A avaliação de FTIR demonstrou a estabilidade química da INH frente à matriz polimérica selecionada. Os dados de DSC, por sua vez, mostraram um elevado grau de interação da INH com o polímero devido ao processamento realizado para a obtenção das micropartículas, levando a mudanças físicas importantes no fármaco, com um elevado grau de amorfização da amostra.

As micropartículas desenvolvidas não se mostraram tóxicas para os macrófagos alveolares e ainda foram capazes de ativá-los, induzindo a um perfil inflamatório. Todos os achados, portanto, corroboram com a ideia de que as micropartículas obtidas são sistemas eficientes para a liberação pulmonar de fármacos no tratamento da tuberculose.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O. Macrophages. *Methods in Enzymology*, v. 58, p. 494–505, 1979.
- AKYUZ, S.; AKYUZ, T. FT-IR and FT-Raman spectroscopic studies of adsorption of isoniazid by montmorillonite and saponite. *Vibrational Spectroscopy*, v. 48, n. 2, p. 229–232, 2008.
- ALENCASTRE, J. B. et al. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/ chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 69–76, 2006.
- ÂNGELO, T. O. S. Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying*. Ribeirão Preto, 2012. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003, p. 1–15, 2003.
- ARAL, C.; AKBUĞA, J. Alternative approach to the preparation of chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 168, n. 1, p. 9–15, 1998.
- BAEK, J.-S. et al. Preparation and characterization of mucoadhesive enteric-coating ginsenoside-loaded microparticles. *Archives of Pharmacal Research*, v. 38, n. 5, p. 761–768, 2015.
- BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. *Medicinal Research Reviews*, v. 29, n. 1, p. 196–212, 2009.
- BANIK, N. et al. Preparation and evaluation of the effect of particle size on the properties of chitosan-montmorillonite nanoparticles loaded with isoniazid. *RSC Advances*, v. 2, p. 10519–10528, 2012.
- BECKER, C. et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Isoniazid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 3, p. 522–531, 2007.
- BIGGS, D. L. et al. In vitro and in vivo evaluation of the effects of PLA microparticle crystallinity on cellular response. *Journal of Controlled Release*, v. 92, n. 1-2, p. 147–161, 2003.
- BITENCOURT, C. DA S. et al. Microspheres prepared with different co-polymers of poly(lactic-glycolic acid) (PLGA) or with chitosan cause distinct effects on macrophages. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 678–686, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2011.
- BUETER, C. L. et al. Spectrum and Mechanisms of Inflammasome Activation by Chitosan.

The Journal of Immunology, v. 192, n. 12, p. 5943–5951, 2014.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 63, n. 1, p. 125–132, 1997.

CHEN, K. et al. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *International Immunopharmacology*, v. 7, n. 10, p. 1271–1285, 2007.

CHHONKER, Y. S. et al. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 1451–1458, 2015.

CUNHA-FILHO, M. S. S. et al. Characterization of β -lapachone and methylated β -cyclodextrin solid-state systems. *AAPS PharmSciTech*, v. 8, n. 3, p. E68–77, 2007.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. *Drug Development Research*, v. 64, n. 2, p. 114–128, 2005a.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *Journal of microencapsulation*, v. 22, n. 4, p. 377–395, 2005b.

DEVI, N.; MAJI, T. K. Preparation and evaluation of gelatin/sodium carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complex microparticles for controlled delivery of isoniazid. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 4, p. 1412–1419, 2009.

DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech*, v. 5, n. 4, p. e67, 2004.

DU TOIT, L.; PILLAY, V.; DANCKWERTS, M. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respiratory Research*, v. 7, n. 1, p. 118, 2006.

ELGADIR, M. A. et al. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 23, n. 4, p. 619–629, 2014.

FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. *Farmacopéia Brasileira*. *Farmacopeia Brasileira*, 5^a edição, v. 1, p. 1–523, 2010.

FAROOQ, U.; MALVIYA, R.; SHARMA, P. K. Advancement in microsphere preparation using natural polymers and recent patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 8, n. 2, p. 111–125, 2014.

FDA, Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation*. Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

GELFUSO, G. M. *Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica*. Ribeirão Preto,

2009. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GELFUSO, G. M. et al. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, n. 7, p. 650–658, 2011.

GERT, N. et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 499, p. 358–367, 2016.

GRATIERI, T. et al. Development and validation of a HPAE-PAD method for the quantification of CGP69669A, a sialyl Lewisx mimetic, in skin permeation studies. *Biomedical Chromatography*, v. 26, n. 4, p. 507–511, 2012.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 2, p. 305–309, 1996.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effect of molecular weight and degree of deacetylation on controlled release of isoniazid from chitosan microspheres. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 19, n. 5, p. 432–441, 2008.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free radicals reactive species and toxicology. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York. p. 544–616.

HARRIES, A. D. AND DYE, C. Tuberculosis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 100, n. 5 and 6, p. 415–431, 2006.

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; HERAS, A. Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Marine Drugs*, v. 8, n. 6, p. 1750–1762, 2010.

HE, P. E. AL. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 166, n. 1, p. 75–88, 1998.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, n. 1, p. 53–65, 1999.

HERYANTO, R.; HASAN, M.; ABDULLAH, E. C. Solubility of Isoniazid in Various Organic Solvents from (301 to 313) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 53, n. 8, p. 1962–1964, 2008.

HINDS, W. C. *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*. 2^a edição ed. Canadá: John Wiley & Sons, 1999.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, v. 21, n. 2, p. 344–353, 2004.

HUANG, R. et al. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life sciences*, v. 78, n. 20, p. 2399–408, 2006.

HUANG, Y.-C.; CHIANG, C.-H.; YEH, M.-K. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. *Journal of microencapsulation*, v. 20, n. 2, p. 247–260, 2003.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization, 2005.

ISLAM, M. A. et al. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: An updated review. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 6077–6093, 2012.

JIAO, Q. et al. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–19, 2014.

JOSHI, A. et al. Dissolution test for site-specific release isoniazid pellets in USP apparatus 3 (reciprocating cylinder): Optimization using response surface methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, n. 2, p. 769–775, 2008.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation. *Drug delivery*, v. 10, n. 3, p. 201–207, 2003.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10^a edição ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KO, J. A. et al. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Journal of Microencapsulation*, v. 249, p. 165–174, 2002.

KUNDAWALA, A. J. et al. Isoniazid loaded chitosan microspheres for pulmonary delivery: Preparation and characterization. *Der Pharmacia Sinica*, v. 2, n. 5, p. 88–97, 2011a.

KUNDAWALA, A. J. et al. Influence of Formulation Components on Aerosolization Properties of Isoniazid Loaded Chitosan Microspheres. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 3, n. 4, p. 297–302, 2011b.

KUNDAWALA, A. J. et al. Isoniazid loaded chitosan microspheres for pulmonary delivery: Preparation and characterization. v. 2, n. 5, p. 88–97, 2011c.

KUNDAWALA, A. J. et al. Treating tuberculosis with Chitosan microparticles loaded with rifampicin as respirable powder for pulmonary delivery. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*, v. 4, n. 1, p. 57–65, 2012.

KURUNOV, I. N. et al. Effectiveness of liposomal antibacterial drugs in the inhalation therapy of experimental tuberculosis. *Problemy tuberkuleza*, v. 73, n. 1, p. 38–40, 1995.

LI, H. et al. Effects of chitosan on the secretion of cytokines and expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in peritoneal macrophages of broiler chicken. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 4, p. 466–471, 2014.

LIM, J.-H. et al. Surface-modified gemcitabine with mucoadhesive polymer for oral delivery†. *Journal of Microencapsulation*, v. 29, n. 5, p. 487–496, 2012.

LIRA, A. A. M. et al. Preparation and characterization of chitosan-treated alginate

microparticles incorporating all-trans retinoic acid. *Journal of microencapsulation*, v. 26, n. 3, p. 243–50, 2009.

LOPES, A. C. Tuberculose. In: *Tratado de Clínica Médica*. 2^a edição ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 2659–2684.

MANCA, M. L. et al. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery?. A comparative study of particle stability during nebulization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 62, n. 2, p. 220–231, 2008.

MANCA, M. L. Chitosan and plga microspheres as drug delivery system against pulmonary Mycobacteria infections. Cagliari, 2009. Tese de Doutorado. Department Farmaco Chimico Tecnologico, University of Cagliari.

MANCA, M. L. et al. Isoniazid-gelatin conjugate microparticles containing rifampicin for the treatment of tuberculosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 9, p. 1302–1311, 2013.

MARTINAC, A. et al. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 291, n. 1-2, p. 69–77, 2005.

MATOS, B. N. et al. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. *Journal of Chemistry*, v. 2015, p. 1–6, 2015.

MELO, P. DA S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v. 36, n. 8, p. 539, 2000.

MINARINI, P. R. R. Desenvolvimento de micropartículas poliméricas carreando um análogo sintético de neoglicana para uso na terapia da tuberculose. Ribeirão Preto, 2006. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MISRA, A. et al. Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 91, n. 1, p. 71–81, 2011.

MORAIS, G. G. Otimização da terapia da tuberculose : desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia. Ribeirão Preto, 2011. Tese de Doutorado. . Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

NAIKWADE, S. R. et al. Development of budesonide microparticles using spray-drying technology for pulmonary administration: design, characterization, in vitro evaluation, and in vivo efficacy study. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 3, p. 993–1012, 2009.

NG, K. et al. Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Journal of Chromatography B*, v. 847, n. 2, p. 188–198, 2007.

NUNES-ALVES, C. et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature*

reviews. *Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 289–99, 2014.

PAI, R. V et al. Development and Evaluation of Chitosan Microparticles Based Dry Powder Inhalation Formulations of Rifampicin and Rifabutin. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, v. 29, n. 2, p. 179–95, 2016.

PANDEY, A. KUMAR et al. Structural, Electronic, and Vibrational Properties of Isoniazid and Its Derivative N-Cyclopentylidenepyridine-4-carbohydrazide: A Quantum Chemical Study. *Journal of Theoretical Chemistry*, v. 2014, p. 1–15, 2014.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Polymer based drug delivery systems for mycobacterial infections. *Current drug delivery*, v. 1, n. 3, p. 195–201, 2004.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 85, n. 4, p. 227–234, 2005.

PATEL, B. B.; PATEL, J. K.; CHAKRABORTY, S. Review of patents and application of spray drying in pharmaceutical, food and flavor industry. *Recent patents on drug delivery & formulation*, v. 8, n. 1, p. 63–78, 2014.

PELUSO, G. et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, v. 15, n. 15, p. 1215–1220, 1994.

PEREIRA, P. A. T. et al. Prostaglandin D₂-loaded microspheres effectively activate macrophage effector functions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, p. 132–139, 2015.

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

QUAN, J. S. et al. pH-sensitive and mucoadhesive thiolated Eudragit-coated chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359, n. 1-2, p. 205–210, 2008.

RAFEEQ, M. et al. Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded with isoniazid for the treatment of Tuberculosis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 1, n. 4, p. 383–390, 2010.

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

RASTOGI, R. et al. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 334, n. 1-2, p. 71–77, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, S. et al. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 3, n. 4, p. 615–641, 2012.

SHAH, P. P. et al. Effect of chitosan crosslinking on bitterness of artemether using response surface methodology. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 60, n. 4, p. 421–7, 2008.

SHAKYA, A. K.; NANDAKUMAR, K. S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, v. 10, n. 79, p. 20120536, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, n. 4, p. 761–766, 2004.

SHARMA, R. et al. Inhalable Microparticles Containing Drug Combinations to Target Alveolar Macrophages for Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1405–1410, 2001.

SHARMA, R. et al. Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, n. 3, p. 499–506, 2007.

SHARMA, R. et al. Inhalable microparticles modify cytokine secretion by lung macrophages of infected mice. *Tuberculosis*, v. 91, n. 1, p. 107–110, 2011.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 201, n. 1, p. 51–58, 2000.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 1–20, 2003.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 53, n. 8, p. 1047–1067, 2001.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, n. 1-2, p. 1–33, 2004.

SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, v. 9, n. 7, p. 1837–1842, 2008.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. 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.

STORPIRTIS, S. et al. Sistemas de liberação: Estratégias para medicamentos eficazes. In: *Biofarmacotécnica - Ciências Farmacêuticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 72–95.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 535–552, 2004.

TAYLOR, K. Liberação pulmonar de fármacos. In: *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 478 – 493.

TURNER, P. V et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 50, n. 5, p. 600–613, 2011.

UNGARO, F. et al. Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: Challenges and promises. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 64, n. 9, p. 1217–1235, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP Monographs 37. 2015. p. 3417-3418.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 731, p. 237–245, 2011.

VYAS, S. P. et al. Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, n. 1, p. 37–49, 2004.

WU, N. et al. Immunostimulative activity of low molecular weight chitosans in RAW264.7 macrophages. *Marine Drugs*, v. 13, n. 10, p. 6210–6225, 2015.

YADAV, A. B. et al. Inhalable microparticles containing isoniazid and rifabutin target macrophages and “stimulate the phagocyte” to achieve high efficacy. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 47, n. 6 SPEC. ISS., p. 469–474, 2009.

ZHOU, H. et al. Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages. *Journal of Controlled Release*, v. 107, n. 2, p. 288–299, 2005.