

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR DO
DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Janaína Micheli Chassot

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR DO DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA

Janaíne Micheli Chassot

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Cruz
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Tasso

Santa Maria, RS, Brasil
2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA
LIBERAÇÃO PULMONAR DO DIPROPIONATO DE
BECLOMETASONA**

elaborada por
Janaíne Micheli Chassot

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Letícia Cruz, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Adriana Raffin Pohlmann, Dra (UFRGS)

Andréa Inês Horn Adams, Dra (UFSM)

Santa Maria, 22 de março de 2013.

Dedico esta conquista à minha família maravilhosa e ao Leonardo Casali, pelo amor e apoio incondicional que me deram ao longo desses dois anos, o mérito também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica por todas as oportunidades de conhecimento, crescimento profissional e realização deste trabalho.

A Prof. Letícia Cruz por ter me proporcionado esta oportunidade mesmo vindo de outra Universidade, pela orientação, dedicação, pelo apoio, pela compreensão e sobretudo pela paciência e aprendizado que me proporcionou durante este período.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e total confiança, pelo apoio financeiro fundamental, por acreditarem sempre em mim, no meu trabalho e na minha capacidade.

As minhas irmãs Daici, Tatiani e especialmente a Francieli. Agradeço a todas vocês pelo apoio, força, carinho e atenção sempre transmitidos.

Ao Leonardo, pelo carinho, força, compreensão, paciência e apoio durante todo período do mestrado.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, que sempre se mostraram solícitos quando necessitei de informações e consultas, em especial a Profa. Scheila Schaffazick pelos ensinamentos da disciplina de nanotecnologia e pelo conhecimento transmitido no convívio do laboratório.

Ao departamento de Farmácia Industrial pela infra-estrutura oferecida.

Ao meu co-orientador Prof. Leandro Tasso, pelos ensinamentos científicos transmitidos.

As minhas amigas e também colegas de laboratório, Sara, Luana, Alessandra e Juliane por todos momentos de angústia divididos, pelo estímulo, pelo companheirismo, por alegrarem meus dias, sempre me apoiando, me ouvindo e pelos ensinamentos intelectuais e práticos compartilhados através dos experimentos. Também agradeço a Sara pelas análises realizadas no Zetasizer.

A minha amiga e colega de mestrado, Daniele, pela disponibilidade ímpar em me ajudar e pela parceria nos longos experimentos de liberação.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Natháli, Maíra, Martina, Mônica, Eduardo, Verônica pelo auxílio nas atividades, coleguismo e boas conversas. Agradeço ao Felipe, por ser sempre tão solícito e pela ajuda em alguns experimentos finais.

As meninas do Laboratório de Farmacotécnica, pelos momentos de alegria e descontração, que me proporcionaram.

Aos funcionários, Paulo Ricardo e Renato, pelos pedidos sempre atendidos e atenção.

À Profa. Dra. Elizandra Braganhol e à sua aluna Elita Silveira, pela parceria nos experimentos de cultura de células.

À Profa. Dra. Cristiane de Bona Silva, pelas análises no Zetasizer.

À CAPES e à FAPERGS pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO PULMONAR DO DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA

AUTORA: JANAÍNE MICHELI CHASSOT

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

CO-ORIENTADOR: LEANDRO TASSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de março de 2013.

Nanocápsulas poliméricas vem sendo estudadas extensivamente para liberação de fármacos por diversas vias de administração. Atualmente a nanoencapsulação de fármacos é considerada o meio mais eficiente de assegurar liberação controlada, direcionamento específico e redução dos efeitos adversos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanocápsulas poliméricas para a liberação pulmonar do dipropionato de beclometasona (DB). Nanocápsulas foram preparadas a partir de 2 polímeros, a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e a etilcelulose (EC). Para a quantificação do fármaco nas nanoestruturas, o método analítico foi desenvolvido e validado. Este mostrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto. As nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial do polímero pré-formado e avaliadas quanto ao pH, diâmetro de partícula, índice de polidispersão, teor, eficiência de encapsulamento e potencial zeta. Todas as amostras apresentaram eficiência de encapsulamento maior que 98%, valor de potencial zeta negativo, valor de pH na faixa da neutralidade e teores próximos aos teóricos. A distribuição de tamanho foi nanométrica (158-270 nm) com índice de polidispersão menor que 0,2. Os resultados do estudo de fotodegradação mostraram que as nanocápsulas poliméricas foram capazes de proteger o DB da radiação UVC quando comparadas com uma solução do fármaco. Os experimentos de liberação *in vitro* foram realizados empregando a técnica de sacos de diálise, a qual mostrou, para todas as formulações, uma liberação prolongada do DB, mediada por transporte anômalo e cinética de primeira ordem. A solução etanólica de DB levou entre 24 e 36 h para alcançar 100% de liberação, enquanto que as nanocápsulas foram capazes de controlar a liberação do fármaco por até 108 h, dependendo do polímero empregado. Nanocápsulas de EC e PCL foram avaliadas quanto à toxicidade *in vitro* e *in vivo* e os resultados obtidos sugerem que as formulações propostas são seguras. Na etapa final do trabalho, o pullulan foi proposto como agente estabilizador de nanocápsulas de PCL e os resultados obtidos para o potencial zeta e o teor de fármaco sugerem que estas formulações tornaram-se mais estáveis. Desta forma, as nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho representam uma alternativa promissora para a liberação pulmonar do DB no tratamento da asma e de outras desordens do trato respiratório.

Palavras-chave: Dipropionato de beclometasona, nanocápsulas, liberação pulmonar, pullulan, citotoxicidade *in vitro* e toxicidade pulmonar *in vivo*.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOCAPSULES FOR PULMONARY DELIVERY OF BECLOMETHASONE DIPROPIONATE

AUTHOR: JANAÍNE MICHELI CHASSOT

ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

CO-ADVISOR: LEANDRO TASSO

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 22, 2013.

Polymeric nanocapsules have been studied extensively for drug delivery by various routes of administration. Currently, the nanoencapsulation of drugs is considered the most efficient means of ensuring controlled release, specific targeting and reduction of adverse effects. In this context, the aim of this work was to develop polymeric nanocapsules for pulmonary delivery of beclomethasone dipropionate (BD). Nanocapsules have been prepared from 2 polymers, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and ethyl cellulose (EC). To quantify the drug in the nanostructures, the analytical method was developed and validated. This method showed to be specific, linear, precise, accurate and robust. Nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymers and were evaluated as to pH, particle diameter, polydispersity index, drug content, encapsulation efficiency and zeta potential. All samples showed encapsulation efficiency greater than 98%, negative zeta potential, pH value in the range of neutrality and drug contents close to their theoretical values. The size distribution was nanometric (158-270 nm) with polydispersity index lower than 0.2. The results of the photodegradation study showed that polymeric nanocapsules were able to protect BD from UVC radiation when compared to the free drug solution. *In vitro* release experiments were performed using the dialysis bag technique, which showed, for all formulations, a prolonged drug release mediated by anomalous transport and first order kinetics. Free drug in solution took between 24 and 36 h to reach 100% of release, whereas nanocapsules were able to control the drug release for up to 108 h, depending on the polymer employed. Nanocapsules of EC and PCL were evaluated for *in vitro* and *in vivo* toxicity and the results suggest that the proposed formulations are safe. In the final stage of the work, pullulan was proposed as stabilizer agent for PCL nanocapsules and the results obtained for the zeta potential and the drug content suggested that these formulations have become more stable. Thus, the nanocapsules developed in this work represent a promising alternative for the pulmonary delivery of BD in the treatment of asthma and other respiratory disorders.

Keywords: Beclomethasone dipropionate, nanocapsules, pulmonary delivery, pullulan, *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* pulmonary toxicity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1- Ilustração do aparelho respiratório humano.....	20
FIGURA 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b) fármaco adsorvido à parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente à matriz polimérica.....	22
FIGURA 3- Estrutura química do dipropionato de beclometasona.....	27

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do Dipropionato de Beclometasona em nanocápsulas poliméricas

FIGURA 1- Chemical structure of Beclomethasone Dipropionate.....	48
FIGURA 2 - UV Chromatograms of blank nanocapsules (a) and beclomethasone dipropionate-loaded nanocapsules (b).....	49
FIGURA 3 - Chromatograms obtained after one hour of DB exposure under basic conditions (a) and under acidic conditions (b).....	50
FIGURA 4 - Plots of concentration (a) zero-order reaction, log of concentration (b) first-order reaction, and reciprocal of concentration (c) second-order reaction of BD remaining versus time.....	51

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo dipropionato de beclometasona

FIGURA 1 - Percentage of photodegradation of beclomethasone dipropionate in solution of methanol (BD-MS) and in beclomethasone dipropionate-loaded nanocapsules (NC-0.5E and NC-0.5P).....	65
FIGURA 2 - <i>In vitro</i> beclomethasone dipropionate release profiles: (a) ethanolic solution (BD-ES-0.5 and BD-ES-1.0) and nanocapsules (NC-0.5E and NC-1.0E); (b) ethanolic solution (BD-ES-0.3 and BD-ES-0.5) and nanocapsules (NC-0.3P and NC-0.5P).....	67
FIGURA 3 - Cell viability of free BD, NC-0.5E and NC-0.5P in relation to the controls (DMSO or nanocapsules without drug).....	69

FIGURA 4 - Lactate dehydrogenase activity (LDH) (a) and total protein content (b) in bronchoalveolar lavage fluid 4 hours after intratracheal administration of G1 (positive control group), G2 (negative control group), G3 (aqueous dispersion of BD), G4 (NC-0.5P), G5 (NC-BP), G6 (NC-0.5E) and G7 (NC-BE).....70

FIGURA 1 - Beclomethasone dipropionate content of nanocapsules (NC-0.5), methanolic solution (BD-MS) under UVC radiation.....85

FIGURA 2 - *In vitro* beclomethasone dipropionate release profiles from nanocapsules (NC-0.5) and ethanolic solution (BD-ES) using the dialysis bag method ($n=3$).....85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do Dipropionato de Beclometasona em nanocápsulas poliméricas

TABELA 1 - Accuracy data for beclomethasone dipropionate analysis ($n=3$).....47

TABELA 2 - Repeatability and intermediate precision data for beclomethasone dipropionate analysis ($n=3$).....47

TABELA 3 - Robustness data for beclomethasone dipropionate analysis ($n=3$).....47

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo dipropionato de beclometasona

TABELA 1 - Physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions ($n=3$).....64

TABELA 2 - Correlation coefficients (r), photodegradation rate constants (k) and half-lives ($t_{1/2}$) of free beclomethasone dipropionate (BD-MS) and beclomethasone dipropionate-loaded nanocapsules (NC-0.5E and NC-0.5P) exposed to UV light for 6 h ($n=3$).....66

TABELA 3 - Parameters calculated by first order and Korsmeyer-Peppas models for BD-loaded nanocapsules.....68

TABELA 1 - Quali- and quantitative composition of nanocapsule formulations.....81

TABELA 2 - Physicochemical characteristics of nanocapsules.....84

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 VIA PULMONAR	19
1.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS	21
1.3 CORTICOIDES E DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA: CARACTERÍSTICAS, ASPECTOS FARMACOLÓGICOS, TERAPÊUTICOS E FORMULAÇÕES	25
CAPÍTULO 1: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DO DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	33
1.1 APRESENTAÇÃO	33
PUBLICAÇÃO 1: STABILITY-INDICATING RP-HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF BECLOMETHASONE DIPROPIONATE IN BULK DRUG AND IN NANOCAPSULE SUSPENSIONS	35
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA	53
2.1 APRESENTAÇÃO	53
PUBLICAÇÃO 2: POLYMERIC NANOCAPSULES INTENDED FOR PULMONAR DELIVERY OF BECLOMETHASONE DIPROPIONATE: DEVELOPMENT, <i>IN VITRO</i> CITOTOXICITY AND <i>IN VIVO</i> EVALUATION OF ACUTE LUNG INJURY	55
PUBLICAÇÃO 3: PULLULAN AS A STABILIZER AGENT OF POLYMERIC NANOCAPSULES FOR DRUG DELIVERY	77
DISCUSSÃO GERAL	90
CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

INTRODUÇÃO

Atualmente, o uso de corticoides é a terapia mais eficaz para o tratamento dos sintomas de distúrbios respiratórios tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica e a asma (SAARI, 2003; COLICE; DERENDORF; SHAPIRO, 2004). Os corticoides são substâncias que atuam como agentes anti-inflamatórios interrompendo o desenvolvimento da inflamação brônquica, além de apresentarem ação profilática (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008). Podem ser administrados pelas vias parenteral, oral ou pulmonar, porém são mais efetivos quando depositados através de inalação nas vias aéreas, seu local de atuação (SAARI, 2003). A vantagem da inalação está relacionada com a possibilidade de proporcionar uma liberação direta e específica nos pulmões, alcançando, assim, tanto um efeito pulmonar seletivo quanto uma redução de efeitos adversos (BARNES, 1995). Dentre os representantes desse grupo incluem-se a budesonida, o furoato de mometasona e o dipropionato de beclometasona, sendo este último alvo de estudo deste trabalho.

O dipropionato de beclometasona foi utilizado pela primeira vez em grande escala comercial em 1972 no tratamento tópico da rinite e da asma (BROWN; STOREY; GEORGE, 1972). Tem mostrado eficácia quando utilizado de forma inalada em pacientes asmáticos em comparação com placebo (COLE et al., 1999). Entretanto, o dipropionato de beclometasona é um fármaco altamente hidrofóbico com lenta dissolução nas vias aéreas, fato que conduz a uma rápida remoção pelas células mucociliares, tendo como consequência duração de ação curta e reduzido efeito terapêutico. O regime de administração geralmente indicado para o tratamento da asma inclui 3-4 doses diárias de 200 µg (ou menos) de fármaco (BOOBIS, 1998; TRESCOLI; WARD, 1998). Cabe ainda mencionar que parte do dipropionato de beclometasona inalado pode retornar pela faringe e ser deglutida, aumentando a incidência de efeitos adversos sistêmicos. Além disso, a inalação do fármaco está associada a efeitos adversos no local de administração como imunossupressão local, o que pode conduzir a infecções fúngicas como candidíase oral, faringite e laringite (SAARI, 2003). Portanto, estender o tempo de residência do dipropionato de beclometasona nos pulmões pode ser considerada uma estratégia promissora para aumentar a dose do fármaco no sítio de absorção e, assim, seu efeito terapêutico, e/ou diminuir os riscos de efeitos adversos resultantes de sua absorção extra-pulmonar.

Para contornar os problemas associados à inalação do dipropionato de beclometasona propôs-se a incorporação do fármaco em nanocápsulas poliméricas. Neste tipo de nanocarreador, a substância ativa está confinada em um núcleo, lipofílico ou hidrofílico, circundado por uma membrana polimérica de modo a formar uma estrutura vesicular. Dependendo do método de preparação e das possíveis interações entre o fármaco e os constituintes da formulação, este também pode encontrar-se associado ao invólucro polimérico (COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995; RAVI KUMAR, 2000; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A proposição de nanocápsulas como sistemas capazes de contornar limitações associadas à terapêutica convencional está principalmente relacionada com suas propriedades de controle da liberação e transporte de fármacos para sítios de ação específicos, o que leva, conseqüentemente, a um aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos (BARRATT, 2000; NIMESH et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011). Além disso, as nanocápsulas são potencialmente capazes de proteger o fármaco contra a degradação química, enzimática ou imunológica (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAO; GECKELER, 2011; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Assim, levando-se em consideração a potencialidade dos sistemas nanoestruturados em controlar a liberação e o transporte de princípios ativos, aliada a possibilidade de redução da frequência de administração e da dose do fármaco, além da diminuição de seus efeitos adversos, este trabalho foi realizado com o intuito de desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo dipropionato de beclometasona visando sua liberação pulmonar. Para tal fim, polímeros como a poli(ϵ -caprolactona) e a etilcelulose foram empregados por suas reconhecidas capacidades de controle da liberação de fármacos. Além disso, neste trabalho foi proposta a utilização do pullulan, um polissacarídeo, como agente estabilizador das nanocápsulas. Paralelamente, a validação de uma metodologia analítica para a quantificação do dipropionato de beclometasona a partir das nanocápsulas foi conduzida.

Por fim, cabe mencionar que até o momento não existem relatos na literatura sobre o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco, assim como não foram encontrados registros sobre a utilização do pullulan em nanocápsulas e tampouco de métodos analíticos validados para quantificação do dipropionato de beclometasona em nanocápsulas e em estudos de estabilidade.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo dipropionato de beclometasona, bem como avaliar *in vitro* e *in vivo* a toxicidade pulmonar das formulações.

1.2 Objetivos específicos

- Validar um método analítico para determinação do dipropionato de beclometasona em nanocápsulas poliméricas;
- Avaliar a estabilidade do dipropionato de beclometasona em condições forçadas (degradação ácida, básica e fotolítica);
- Preparar nanocápsulas contendo dipropionato de beclometasona pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, usando como polímero a poli(ϵ -caprolactona) ou a etilcelulose e como núcleo oleoso o óleo de amêndoas;
- Preparar nanocápsulas contendo dipropionato de beclometasona pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, usando pullulan como agente estabilizador;
- Caracterizar as formulações quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Avaliar o perfil de fotodegradação do dipropionato de beclometasona incorporado aos sistemas nanoestruturados frente à radiação UVC;
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de beclometasona a partir dos sistemas nanoestruturados pelo método de difusão em sacos de diálise;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade em fibroblastos da linhagem 3T3 das formulações selecionadas;
- Avaliar *in vivo* a toxicidade pulmonar das formulações selecionadas em ratos *Wistar*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Via Pulmonar

A administração pulmonar de fármacos é utilizada tradicionalmente para o tratamento de doenças locais, como a asma e a doença obstrutiva crônica, porém, recentemente vem sendo utilizada também para a liberação sistêmica de fármacos (LABIRIS; DOLOVICH, 2003; CIPOLLA; GONDA, 2011).

O pulmão possui alta capacidade de absorver substâncias através das vias respiratórias, tanto moléculas pequenas, como macromoléculas. Estas, ao serem depositadas nas regiões mais inferiores do trato respiratório são rapidamente absorvidas, devido a grande área de superfície epitelial e rico suprimento sanguíneo do pulmão (VON WICHERT; SEIFART, 2005). Fármacos com caráter hidrofóbico e de baixo peso molecular, quando administrados pela via pulmonar, possuem maior biodisponibilidade em comparação com a via oral (PATTON; FISHBURN; WEERS, 2004).

Tanto para o tratamento de doenças locais, quanto para ação sistêmica, a via pulmonar oferece uma série de vantagens em relação às vias oral e parenteral, tais como: grande superfície epitelial associada a um vasto suprimento sanguíneo; membrana altamente permeável na região dos alvéolos; baixo ambiente enzimático e ausência de metabolismo hepático de primeira passagem; via não-invasiva; no caso do tratamento de doenças locais, a via pulmonar permite a administração de doses menores minimizando a ocorrência de efeitos adversos e proporcionando um início de ação rápido (PATTON, 1996; LABIRIS; DOLOVICH, 2003; VON WICHERT; SEIFART, 2005; SAKAGAMI, 2006).

O trato respiratório é fisiologicamente dividido em via superior (cavidade nasal, laringe e faringe) e via inferior (traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos) (Figura 1) (PATTON; BYRON, 2007; SEVILLE; LI; LEAROYD, 2007). Estes tecidos são responsáveis pelas trocas gasosas e por movimentos mucociliares, os quais impedem a entrada de partículas estranhas ou remoção das mesmas (SAKAGAMI, 2006; PATTON; BYRON, 2007). Assim, para que quantidades adequadas de fármaco sejam liberadas e absorvidas, a formulação precisa ser capaz de contornar essa defesa natural dos tecidos pulmonares (SEVILLE; LI; LEAROYD, 2007).

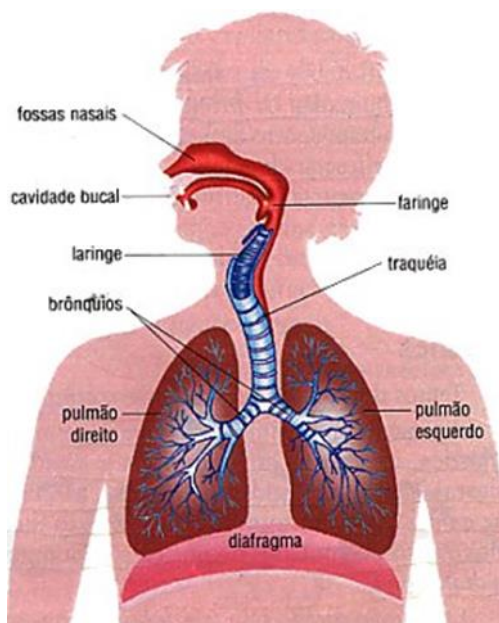


Figura 1. Ilustração do aparelho respiratório humano (Fonte: TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. Microbiologia. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 657-661).

Neste contexto, para que a terapia inalatória tenha a eficácia desejada, é necessário que quantidades adequadas da formulação entrem através das vias respiratórias, sejam distribuídas e depositadas nos pulmões (LABIRIS; DOLOVICH, 2003). A deposição das partículas nos tecidos pulmonares pode ocorrer através de colisão inercial (partículas com diâmetro superior a 5 μm), sedimentação gravitacional (tamanho na faixa de 0,5 a 3 μm) ou ainda por difusão browniana (partículas menores que 0,5 μm). Essa deposição depende das propriedades físico-químicas do fármaco e das características da formulação (LABIRIS; DOLOVICH, 2003; SEVILLE; LI; LEAROYD, 2007). Vale ressaltar que a localização e distribuição do fármaco nos pulmões é determinada principalmente pelo tamanho da partícula (PATTON, 2005).

A eficácia de medicamentos administrados através da inalação é dependente da deposição pulmonar acima mencionada. Quando ocorre a inalação, a maior parte da dose prescrita colide com os tecidos da orofaringe e é deglutida, desta forma apenas uma porção pequena penetra nos pulmões (NEWMAN et al., 1981; MELCHOR et al., 1993). Esta pequena dose depositada nos pulmões pode ser absorvida pela corrente sanguínea ou pode ser eliminada pelo clearance mucociliar (MAK; BARNES, 1990; MELCHOR et al., 1993).

As formulações administradas através de inalação precisam ser avaliadas quanto às toxicidades local e sistêmica (CRYAN et al., 2007; PAULUHN, 2008), uma vez que podem

induzir mudanças na função respiratória, alterar parâmetros bioquímicos e de permeabilidade do pulmão, causar respostas imunogênicas e até provocar a morte do indivíduo (CRYAN et al., 2007). Para avaliar a toxicidade pulmonar de uma substância ou formulação, a análise do fluido de lavagem broncoalveolar (FLBA) é um dos métodos mais descritos na literatura (HENDERSON, 2005). O FLBA pode ser analisado quanto ao número de células, presença de enzimas indicadoras de dano celular (desidrogenase láctica, fosfatase alcalina, N-acetilglucosaminidase) e determinação da concentração de proteínas totais (HENDERSON, 2005; CRYAN et al., 2007).

Vale mencionar que a desidrogenase láctica (DHL) é uma enzima citoplasmática e quando ocorre morte celular, ela é liberada para o meio extracelular. Assim, níveis extracelulares aumentados de DHL estão relacionados com dano e morte celular (DRENT et al., 1996). No que diz respeito às proteínas totais, quando estas são determinadas em elevada concentração no fluido broncoalveolar, indica que ocorreu perda da integridade da barreira epitelial dos alvéolos-capilares (ZHANG et al., 1996).

1.2 Nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos

Nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, dendrímeros, nanopartículas lipídicas e lipossomas, são sistemas que apresentam tamanho submicrométrico e vem sendo foco de vários estudos devido ao interesse farmacoterapêutico, uma vez que atuam como nanocarreadores de fármacos. Estes sistemas coloidais vêm sendo alvo de importantes estudos a fim de aperfeiçoar a liberação de substâncias ativas em determinado local, atuando como carreadores, proporcionando a distribuição do fármaco no local desejado (MULLER; MADER; GOHLA, 2000; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006).

Nanopartículas poliméricas são estruturas coloidais que geralmente apresentam diâmetro médio entre 100-500 nm (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Dependendo da composição e organização estrutural podem ser distinguidas morfologicamente em nanocápsulas e nanoesferas (Figura 2) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As primeiras são estruturas vesiculares compostas por um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica, onde o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo e/ou adsorvido no material polimérico. Quanto à nanoesferas, estas são sistemas matriciais onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006).

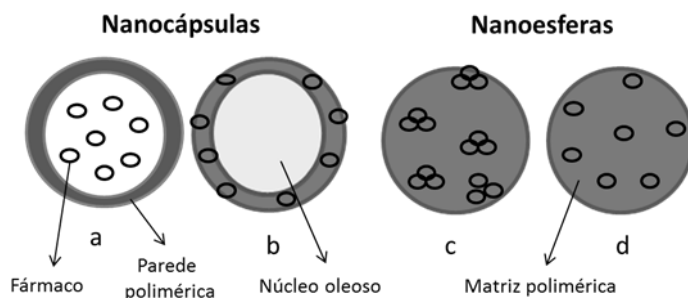


Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b) fármaco adsorvido à parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente à matriz polimérica.

O interesse nas nanopartículas está relacionado com suas propriedades de controle da liberação e transporte de fármacos para sítios de ação específicos, com consequente aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos. Além disso, esses sistemas são capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica (KUMAR, 2000; ALONSO, 2004). Esses sistemas apresentam vantagens em relação aos lipossomas, devido a sua maior estabilidade *in vivo* e durante o armazenamento, além da facilidade de incorporação de fármacos lipofílicos (SCHAFFAZICK et al., 2003). A composição das nanopartículas pode influenciar na proteção dos fármacos frente à degradação (WEISS-ANGELI et al., 2008), na cinética de liberação do fármaco *in vitro* e no seu efeito *in vivo* (CRUZ et al., 2006).

O fármaco incorporado à nanopartícula pode estar associado à matriz polimérica, ao núcleo, recoberto pela parede polimérica ou quimicamente conjugado ao polímero, ou ainda adsorvido na superfície da partícula. A forma de associação depende do tipo de método de preparação e das interações do fármaco com o polímero e o óleo (HANS; LOWMAN, 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A literatura apresenta relatos de diversas técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas. Basicamente, estas se dividem entre os métodos que envolvem a polimerização *in situ* de monômeros e os que utilizam polímeros pré-formados (FESSI et al., 1988). Em 1986, FESSI e colaboradores propuseram o método de nanoprecipitação, no qual a mistura de um solvente miscível com água (geralmente acetona ou etanol), contendo o fármaco a encapsular, um polímero [poli(ácido lático), ou poli(ϵ -caprolactona)] e um co-tensioativo opcional é vertida sobre um solvente que não dissolve o polímero (uma fase aquosa

adicionada de tensoativo). As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente, o qual é removido por pressão reduzida. O mecanismo de formação das nanoesferas pode ser explicado pela turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, devido à mútua miscibilidade entre este e a água. As gotas de solvente, provavelmente de tamanho nanométrico, são estabilizadas pelo tensoativo até que a difusão do solvente se complete, ocorrendo à agregação do polímero. Por este método obtém-se nanoesferas com diâmetro médio de 200 nm (ROBLOT-TREUPEL; COUVREUR; PUISIEUX, 1988; PUISIEUX et al., 1994; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; MONTASSER et al., 2000).

Em 1989, FESSI e colaboradores adaptaram o método de nanoprecipitação para a obtenção de nanocápsulas, adicionando-se um óleo (Miglyol[®] ou benzoato de benzila) à fase orgânica (deposição interfacial). Em geral, a eficiência de encapsulamento é elevada para fármacos lipofílicos. A formação das nanocápsulas baseia-se no fato de que quando a fase orgânica, contendo o polímero e o óleo, é vertida na fase aquosa (não-solvente), as vesículas são formadas por emulsificação espontânea, enquanto o solvente difunde no não-solvente. Assim, o polímero que é insolúvel tanto no óleo quanto no não-solvente, é dessolvatado na interface dos dois componentes imiscíveis, onde se deposita formando a membrana das nanocápsulas. Os tensoativos não são essenciais para a formação das nanocápsulas, mas são importantes para a estabilização da suspensão, de forma a prevenir a aglomeração das partículas, durante o armazenamento (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Recentemente, foram reportadas nanocápsulas de núcleo lipídico, um novo tipo de nanopartícula polimérica, em virtude de modificações na composição das nanocápsulas, as quais possuem um núcleo hidrofóbico contendo uma substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano) disperso em um lipídeo líquido (triglicerídeos de cadeia média) envolto por uma parede polimérica [poli(ϵ -caprolactona)] dessa maneira, apresentando um núcleo mais viscoso do que as nanocápsulas convencionais (JÄGER et al., 2009; OURIQUE et al., 2010).

Após a preparação, é fundamental avaliar as características físico-químicas das suspensões de nanopartículas. Geralmente, as partículas coloidais apresentam o efeito Tyndall, um reflexo azulado resultante do movimento browniano destas em suspensão. A análise da distribuição de tamanho de partículas é determinada a partir dos métodos de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e microscopia eletrônica (varredura ou transmissão), buscando-se uma distribuição de tamanho nanométrica e estreita da formulação. O tamanho das nanopartículas poliméricas pode ser influenciado pela concentração e a

natureza química do polímero, do fármaco, do óleo e do tensoativo, o método de preparação e a presença ou ausência do óleo (nanocápsula e nanoesfera) (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A avaliação de pH, realizada em potenciômetro, é importante pois fornece informações quanto à estabilidade do sistema, uma vez que diferenças no pH durante o tempo de armazenamento podem sugerir a degradação polimérica ou oxidação de outros componentes da formulação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O potencial zeta é analisado através de técnicas de eletroforese, e reflete o potencial de superfície das partículas. Esta análise é importante porque pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação do fármaco às nanopartículas e também para avaliar a estabilidade do sistema, uma vez que um potencial zeta relativamente elevado em módulo aponta para uma melhor estabilidade físico-química da suspensão coloidal. O valor e a carga (negativa/positiva) do potencial zeta depende da natureza química do polímero, do agente estabilizante e do pH da dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

O teor total de fármaco é determinado pela completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado (SCHAFFAZICK et al., 2003). A eficiência de encapsulamento é geralmente avaliada através de ultrafiltração-centrifugação, que consiste na centrifugação e separação das duas fases da nanodispersão (fase aquosa dispersante e suspensão coloidal). Assim, a quantidade de fármaco associada às nanopartículas corresponde à diferença entre o teor total e o teor livre, este último quantificado no ultrafiltrado (GUTERRES et al., 2000).

A quantificação do fármaco a partir de um novo sistema de liberação, nas diferentes etapas de caracterização, em muitas situações requer o desenvolvimento de uma metodologia analítica, a qual deve ser previamente otimizada e validada, para garantir que o método corresponda aos objetivos propostos (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Assim, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Neste contexto, os seguintes parâmetros são usualmente avaliados: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e detecção. Estes devem garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Além disso, uma caracterização completa desses sistemas envolve a determinação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir do nanocarreador. A liberação do fármaco pode depender do polímero, podendo ocorrer relaxamento das cadeias poliméricas, erosão ou

dissolução da matriz polimérica, para a subsequente difusão do fármaco ou pela combinação destes processos (SOPPIMATH et al., 2001; CRUZ et al., 2006). A viscosidade do núcleo oleoso também pode influenciar a cinética de liberação do fármaco (JÄGER et al., 2009). Alguns dos métodos utilizados para estes experimentos são as membranas de diálise, técnica mais utilizada (SCHAFFAZICK et al., 2003); as células de Franz e experimentos que envolvam ultracentrifugação ou ultrafiltração-centrifugação (GUPTA et al., 2010; SOPPIMATH et al., 2001).

Devido ao tamanho reduzido, os sistemas nanoparticulados têm sido considerados como alternativas promissoras para vetorização de fármacos, pois são capazes de permear as barreiras biológicas com potencial ação nas vias intravenosa oral, oftálmica e tópica (RAVI KUMAR, 2000; BARRATT, 2000; NIMESH, 2006).

Recentemente, o desenvolvimento de nanoestruturas objetivando administração pulmonar tem recebido atenção especial. Como exemplos de fármacos encapsulados para liberação pulmonar encontram-se o hormônio insulina em lipossomas (HUANG; WAN, 2006) e em nanopartículas lipídicas sólidas (XIAOYAN et al., 2012), o antibiótico ciprofloxacino em niossomas (MOAZENI et al., 2010), o antifúngico voriconazol em nanopartículas (SINHA; MUKHERJEE; PATTNAIK, 2013), entre outros. Estes sistemas nanométricos, por apresentarem tamanho reduzido, possuem vantagens na liberação pulmonar em relação aos demais sistemas convencionais, como a melhora na passagem de fármacos através da barreira mucosa, o aumento da deposição do fármaco no pulmão, facilidade de adsorção pelas células epiteliais pulmonares e fibroblastos, além de não serem capturados por macrófagos (CARAFA et al., 2006).

1.3 Corticoides e Dipropionato de Beclometasona: características, aspectos farmacológicos, terapêuticos e formulações

Doenças respiratórias acometem as vias aéreas superiores e outros órgãos do sistema respiratório. Dentre as mais importantes figuram a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica. A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por obstrução reversível das vias aéreas, remodelação das vias aéreas e hiperresponsividade das vias aéreas inespecíficas. Apresenta como sintomas a falta de ar, a tosse (geralmente sem catarro), o chiado e a sensação de aperto no peito (BATEMAN et al., 2008; SUBBARAO; MANDHANE; SEARS, 2009).

Por sua vez, a doença pulmonar obstrutiva crônica é caracterizada pela inflamação do tecido pulmonar, apresenta diversas manifestações sistêmicas e inclui os subtipos de bronquite crônica e enfisema pulmonar. É caracterizada por ser progressiva, apresentar obstrução parcialmente reversível das vias aéreas, limitação do fluxo aéreo, tosse crônica, produção de escarro e dispnéia (ENGSTROM et al., 1996; DECRAMER et al., 2008). Atualmente, o uso dos corticóides é considerado como a terapia mais eficaz para o tratamento dos sintomas das doenças respiratórias acima citadas (SAARI, 2003; COLICE et al., 2004).

Os corticoides são fármacos análogos sintéticos do cortisol, substância endógena produzida pela glândula supra-renal, e apresentam elevada eficácia no tratamento da asma pela sua ação anti-inflamatória na mucosa brônquica (por inibição da formação, liberação e atividade dos mediadores da inflamação), por contribuírem para a redução do edema e da secreção de muco nas vias aéreas, além de serem broncodilatadores. Os corticoides administrados por via inalatória e intranasal, como a beclometasona e a budesonida, são fármacos de primeira escolha no tratamento da rinite alérgica sazonal ou permanente e na rinite não alérgica, vasomotora. Por via sistêmica são utilizados em situações graves de asma crônica ou de exacerbação aguda de asma, sendo também eficazes na agudização da doença pulmonar obstrutiva crônica aguda (KATZUNG, 2006).

Os corticoides, mesmo sendo administrados com técnicas avançadas de inalação, alcançam apenas proporções pequenas de doses liberadas nas vias aéreas, geralmente menores que 30%, resultando em uma maior absorção sistêmica do fármaco ou de seus produtos de degradação (SAARI, 2003). Em decorrência disso, surgem efeitos colaterais sistêmicos como a osteoporose, a redução do crescimento dos ossos em crianças e a supressão da produção de cortisol (COLICE et al., 2004). A inalação de corticoides também pode apresentar efeitos adversos no local de administração, como a imunossupressão local que pode conduzir a infecções fúngicas como candidíase oral, faringite e laringite (DARWIS; KELLAWAY, 2001).

A eficácia dos corticoides inalados depende do tempo de residência nos pulmões e da interação com o receptor glicocorticoide presente nas células do parênquima pulmonar. A permanência prolongada dos corticoides nos pulmões permite maior disponibilidade para a sua atuação tópica, maximiza a interação com o receptor específico, produzindo o efeito anti-inflamatório desejado. Ao mesmo tempo, a retenção do fármaco nos pulmões limita a sua atividade sistêmica, diminuindo os efeitos colaterais indesejáveis. Dentre os representantes desse grupo incluem-se o dipropionato de beclometasona, a budesonida e o furoato de mometasona (COLICE et al., 2004).

O 17,21-dipropionato de beclometasona (DB) é um glicocorticoide tópico potente e tem fraco efeito mineralocorticoide. A afinidade do DB aos receptores específicos, que reflete a potência intrínseca do fármaco, é cerca de 200 vezes maior que a do cortisol e 15 vezes maior que a da prednisolona. Em 1972, foi relatado por Brown e colaboradores o uso do DB no tratamento da asma crônica. Cole e colaboradores, em 1999, mostrou a eficácia do DB quando utilizado de forma inalada em pacientes asmáticos, em comparação com placebo.

O DB (Figura 3) é um corticoide halogenado, diéster da beclometasona, apresentando uma massa molecular de 521,04 g/mol e fórmula molecular $C_{38}H_{28}ClO_7$ (DALEY-YATES et al., 2001). Caracteriza-se por ser um pó branco ou quase branco, cristalino, pouco solúvel em água, com pKa de 13,6 e faixa de fusão entre 117-120°C (Farmacopéia Britânica, 2010).

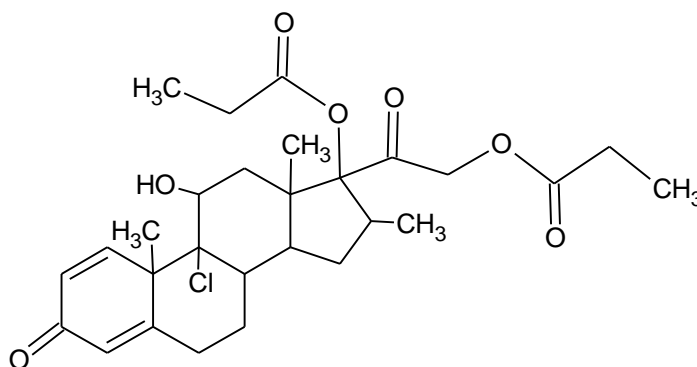


Figura 3. Estrutura química do dipropionato de beclometasona.

Apenas a forma livre do DB (10 - 29%) é capaz de interagir com os receptores glicocorticoides, mas como este fármaco possui fraca afinidade de ligação a estes receptores (DALEY-YATES et al., 2001; ROHATAGI et al., 2003), ele liga-se extensivamente a proteínas plasmáticas (87%) o que limita seus efeitos farmacológicos. O DB é rapidamente absorvido pelos tecidos respiratório e gastro-intestinal, e é extensamente (95%) convertido no seu metabólito ativo, 17-monopropionato de beclometasona, comprometendo sua biodisponibilidade pulmonar (25%). Este fármaco, quando inalado é hidrolisado por enzimas esterases, e são formados também metabólitos inativos, como o 21-monopropionato de beclometasona e beclometasona. O DB apresenta clearance de 3,8 l/min e tempo de meia-vida plasmático de 0,5 horas (DALEY-YATES et al., 2001).

Como outros corticosteroides, o DB é um fármaco pouco solúvel em água, o que favorece a sua penetração celular, mas complica a sua dissolução no interior das vias respiratórias. Devido à sua lenta dissolução, o DB é rapidamente removido por depuração mucociliar antes de ser absorvido, resultando em curta duração de ação, o que afeta sua eficácia terapêutica (BOOBIS, 1998). Como consequência, recomendam-se duas a quatro doses por dia do DB (BARNES, 1995). Além disso, é importante comentar que mesmo o fármaco sendo administrado por inalação, uma fração deste pode ser deglutida, o que pode aumentar os efeitos secundários sistêmicos (TRESCOLI; WARDS, 1998).

Quanto ao mecanismo de ação, o DB atua no núcleo celular, onde ocorre sua ligação aos receptores glicocorticoides, fato que ocasiona a inibição da produção dos mediadores da inflamação, prostaglandinas e leucotrienos, evitando assim o processo inflamatório (BENEDICTS; BUSH, 2012).

O DB é indicado para o tratamento de rinites alérgicas e vasomotoras, rinofaringites, sinusites e em outras afecções alérgicas e inflamatórias das cavidades nasais e paranasais; asma brônquica, bronquite e processos inflamatórios das vias aéreas superiores (Manual Farmacoterapêutico, 2009). Seu efeito terapêutico no tratamento da asma crônica está bem estabelecido (NICOLINI; CREMONESI; MELANI, 2010.). Para o tratamento da asma é recomendado 300-400 µg diários de DB e no caso de sintomas persistentes leves, recomenda-se entre 100-200 µg diários do fármaco, ambas as dosagens pela via intranasal (BOUSQUET et al., 2008).

O DB apresenta alguns efeitos adversos, tais como: rouquidão, secura da boca, tosse ou respiração ofegante, reações de hipersensibilidade, sensações de irritação e ardência no nariz, além de candidíase limitada à orofaringe (FRANÇA; KOROLKOVAS, 2006).

Atualmente, os medicamentos comercializados no Brasil para administração do DB são: Beclosol[®] (GlaxoSmithKline) como spray nasal na dose de 50 µg; Clenil[®] (Farmalab), como jato de spray na dose de 400 µg; Miflosona[®] (Novartis), nas doses de 200 µg ou 400 µg e Beclate[®] (Cipla), como cápsulas de pó inalável na dose de 50 µg.

Levando em consideração as limitações do DB, além do interesse por sua liberação pulmonar, haja vista suas potencialidades anti-inflamatórias previamente citadas, este fármaco têm sido alvo de estudos que tratam do desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados.

Waldrep e colaboradores (1994) prepararam lipossomas contendo DB (0,5 mg/mL) e dialoruilfosfatidilcolina em uma proporção de 1:25 (p/p). Estes lipossomas, que apresentaram eficiência de encapsulamento entre 97-99%, foram colocados em nebulizadores e avaliados

quanto ao seu desempenho. Um total de 18 nebulizadores de escoamento contínuo a jato foram analisados, com a produção de gotas de 0,9-7,2 μm . Os resultados mostraram que a maioria dos nebulizadores testados, os quais produziam gotículas na faixa de diâmetro aerodinâmico de massa média de 1 a 3 μm , propiciavam a administração de doses significativas de lipossomas às regiões periféricas dos pulmões.

Na sequência, o mesmo grupo de pesquisa estudou o comportamento *in vivo* dos lipossomas contendo DB em seis voluntários (VIDGREN et al., 1995). As formulações foram marcadas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para estudar e visualizar a deposição e a remoção do composto radioativo. Este foi medido após três horas e foi observado que entre 82 e 93% da atividade inicial estava presente. Além disso, foi mostrado que os lipossomas inalados estavam gradativamente sendo removidos dos pulmões. Em outra avaliação *in vivo*, a formulação foi instilada pela via nasal de camundongos, o que permitiu observar que cerca de 50% dos lipossomas radiativos com DB permaneceram nos pulmões até 24 h, sendo que 75% da dose foi distribuída aos pulmões, enquanto que cerca de 12% ficou retida na nasofaringe e 13% foi deglutida. Porém, apenas 14 a 17% da formulação lipossomal com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em forma de aerossol foi depositada nos pulmões dos voluntários.

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa avaliou formulações contendo DB em 11 voluntários (SAARI et al., 1999). Foi estudada a distribuição e a remoção pulmonar de lipossomas preparados com dois tipos de lipídeos: dialoruilfosfatidilcolina e dipalmitoilfosfatidilcolina com DB, marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Neste estudo, os autores observaram que depois de 24 horas após a inalação, 83% da radioatividade referente aos lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina, e 79% da radioatividade referente aos lipossomas de dialoruilfosfatidilcolina, permaneceu nos pulmões. Portanto, concluiu-se que a remoção dos lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina foi um pouco mais lenta do que a remoção dos lipossomas de dialoruilfosfatidilcolina, e também que o encapsulamento lipossomal realmente pode oferecer uma liberação lenta e controlada do DB no trato respiratório.

Batavia e colaboradores (2001) estudaram duas metodologias diferentes para avaliar a incorporação máxima do DB em lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina. A primeira metodologia analisada foi a microscopia de contraste diferencial de fase e a microscopia de polarização cruzada, as quais avaliaram a concentração máxima de DB em que puderam visualizar cristais de fármaco. Esta estimativa, semi-quantitativa e simples, mostrou valores de 1,5 a 2 mol% de DB. O segundo método de quantificação utilizou água deuterada (D_2O) para suspender a solução lipídica. A suspensão foi centrifugada para separar o DB livre dos

lipossomas, e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual mostrou 2,52 mol% de DB.

Em um estudo envolvendo nanopartículas, foram preparadas nanoesferas contendo DB, utilizando os polímeros Eudragit E100 e Eudragit L100, através de um novo método que emprega um reator de fluxo. Foram obtidas nanoesferas com diâmetro médio entre 90-150 nm, forma arredondada e superfície lisa. Além disso, os autores observaram que quando utilizaram na formulação Eudragit L100, este produziu partículas maiores que o Eudragit E100. A eficiência de encapsulamento do fármaco também apresentou uma pequena variação conforme a proporção e o tipo de Eudragit utilizado, porém todas amostras apresentaram eficiência de encapsulamento maior que 90% (EERIKÄINEN; KAUPPINEN, 2003).

Hyvönen e colaboradores (2005) prepararam nanoesferas de poli(L-ácido láctico) (PLA) incorporando o DB pelo método de nanoprecipitação modificado (deposição de polímero interfacial após deslocamento solvente). O estudo teve como objetivo avaliar a influência do método de preparação nas características físico-químicas do polímero e do fármaco e avaliar as possíveis interações fármaco-polímero por microscopia eletrônica, difração de raios X, análise térmica e de espectroscopia de infravermelho. A forma cristalina do DB mudou quase que completamente de um cristal anidro a monoidratado, durante o processo de nanoprecipitação. As formulações apresentaram tamanho nanométrico na faixa de 300-500 nm. Neste estudo, foi concluído que a nanoprecipitação reduziu a cristalinidade do polímero PLA e nenhuma interação clara entre este e o fármaco foi detectada.

Vesículas não-iônicas de polissorbato 20 e colesterol contendo DB foram preparadas pelo método de evaporação de camada delgada seguido de sonicação. As formulações contendo 0,4 e 50,0 mg/mL de DB apresentaram tamanho médio de 186 e 205 nm e eficiência de encapsulamento de 14,7 e 77,0%, respectivamente. Além disso, as vesículas não-iônicas não mostraram atividade citotóxica significativa frente a fibroblastos humanos em todos os momentos de incubação para concentrações entre 0,01 e 1,0 μ M. O tratamento das células de fibroblastos do pulmão humano mostrou um aumento notável da atividade anti-inflamatória do DB, uma vez que reduziu a secreção dos fatores da inflamação, como a interleucina 1 β (MARIANECCI et al., 2010).

Outra abordagem estudada para a liberação pulmonar do DB foi a preparação de micelas poliméricas usando os copolímeros poli(acrilato 2-hidroxietil) (PHEA) e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietileno glicol)-2000] (DSPE-PEG2000-NH₂). O copolímero PHEA-PEG200-DSPE foi capaz de se auto-associar para formar micelas em meio aquoso, que apresentaram 3,0% do DB em peso e valores de

tamanho médio abaixo de 80 nm. A liberação *in vitro* foi realizada em sacos de diálise (meio: tampão fosfato pH 7,4/etanol, 80:20) e após 48 h, cerca de 30% do DB foi liberado. O estudo da viabilidade celular *in vitro*, realizado em células do epitélio brônquico (16HBE), com 24 e 48 h de incubação, indicou que as micelas não são citotóxicas. As micelas do copolímero de PHEA-PEG2000-DSPE foram consideradas promissoras devido a capacidade em solubilizar uma quantidade adequada de DB e penetrar nas células epiteliais do pulmão (CRAPARO et al., 2011).

Mais recentemente, Jaafar-Maalej e colaboradores (2011) prepararam nanopartículas lipídicas com ácido esteárico pelo método de homogeneização a alta pressão. Esta técnica demonstrou ser simples, reprodutível, rápida, não necessitando o uso de solventes orgânicos. Os carreadores lipídicos nanoestruturados foram preparados com 20, 30 e 40% v/v de Migliol 812 (triglicerídeos caprílico/cáprico), enquanto que as nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas com Tween 80 (monoestearato de sorbitano), Poloxamer 188 e com a mistura dos mesmos na proporção de 1:1. As nanopartículas lipídicas sólidas contendo DB apresentaram tamanho médio entre 193-217 nm, eficiência de encapsulamento entre 80,46 - 89,88%, enquanto que os carreadores lipídicos nanoestruturados apresentaram tamanho médio entre 197-184 nm e eficiência de encapsulamento entre 97,23 - 99,56%. A liberação *in vitro* do fármaco foi estudada em sacos de diálise (meio de liberação: dodecil sulfato de sódio, 0,55 mM). Os resultados mostraram que após 16 dias, 20% do fármaco foi liberado pelas nanopartículas lipídicas sólidas e 77% a partir dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Assim, foi concluído que nanopartículas lipídicas são sistemas promissores de liberação controlada para nebulização pulmonar.

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do dipropionato de beclometasona em nanocápsulas poliméricas

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do dipropionato de beclometasona em nanocápsulas poliméricas

1.1 Apresentação

O doseamento de um fármaco, seja ele isolado ou incorporado em formulações, necessita ser realizado através de métodos devidamente validados. Apesar do DB ser um fármaco amplamente empregado na terapêutica e ter sido aprovado pelo FDA em 2006, apenas as Farmacopéias Britânica e Americana apresentam métodos validados para este fármaco. Contudo, estes apresentam algumas limitações do ponto de vista prático, dentre elas: etapas laboriosas, eluição por gradiente, temperatura elevada, longo tempo de retenção ou utilização de solventes orgânicos de alto custo (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2010; FARMACOPÉIA AMERICANA, 2009). Além disso, cabe ainda ressaltar que apesar de existirem diversos estudos propondo novas formas farmacêuticas para o DB, não foram encontrados relatos de métodos indicativos de estabilidade para estas formulações.

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar um método simples de HPLC com detecção por UV para a quantificação do DB em nanocápsulas, bem como estudar a degradação do DB em condições aceleradas a fim de tornar o método indicativo de estabilidade do fármaco. Os resultados apresentados nesta parte da dissertação foram redigidos na forma de artigo científico e serão submetidos para publicação no periódico *Chromatographia*.

PUBLICAÇÃO 1: Stability-indicating RP-HPLC Method for the Determination of Beclomethasone Dipropionate in Nanocapsule Suspensions

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Chromatographia*

Stability-indicating RP-HPLC Method for the Determination of Beclomethasone Dipropionate in Nanocapsule Suspensions

Janaína Micheli Chassot¹, Leandro Tasso², Letícia Cruz^{1*}

¹Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Institute of Biotechnology, Caxias do Sul University, Caxias do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Letícia Cruz, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105-900, Brazil.

Phone: +55 55 32209373. Fax: +55 55 32208149.

E-mail: leticiacruz@smail.ufsm.br

Abstract

A simple stability-indicating RP-HPLC/UV method was validated for the determination of beclomethasone dipropionate (BD) in nanocapsule suspensions. Chromatographic conditions consisted of a RP C₁₈ Phenomenex column (250 mm x 4.60 mm, 5 µm, 110 Å), using a mixture of methanol and water (85:15 v/v) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min with UV detection at 254 nm. The developed method was validated as per ICH guidelines with respect to specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limits of quantification and detection and provided good results regarding all parameters investigated. The calibration curve was found to be linear in the concentration range of 5.0-25.0 µg/mL with a correlation coefficient > 0.999. Precision (intraday and interday) was demonstrated by a relative standard deviation lower than 2.0%. Accuracy was assessed by the recovery test of BD from nanocapsules (98.03% to 100.35%). Specificity showed no interference from the components of nanocapsules or from the degradation products derived from acidic, basic and photolytic conditions. In conclusion, the method is suitable to be applied to assay BD in bulk drug and in polymeric nanocapsules and can be applied for study the stability and degradation kinetics.

Keywords: Beclomethasone dipropionate, RP-HPLC/UV, Validation, Stress conditions, Nanoparticles.

Introduction

Beclomethasone dipropionate (BD; $C_{38}H_{28}ClO_7$; MW: 521.0 Da) (Figure 1), a synthetic chlorinated glucocorticoid diester is a well-established anti-inflammatory agent used in the treatment of asthma [1]. BD is characterized by a white or almost white crystalline powder, presenting pKa of 13.6 and melting range between 117-120°C [2-5]. The mechanism of action of BD occurs at cellular nucleus level by interacting with DNA and hence stimulating or suppressing gene transcription. This drug can act as a transcription factor, altering the expression of target genes in response to a specific hormonal signal [6].

BD has been proven to be effective when used by inhalation in asthmatic patients compared to placebo. In this way, the therapeutic effect of conventional doses of inhaled BD is attributed to its direct action on the respiratory tract [7]. However, BD is a highly hydrophobic drug, and thus presents slow dissolution rate within airways and rapid mucociliary clearance, resulting on a relative short local duration of action following administration with a consequent reduction in the therapeutic effect [8, 9]. Following powder aerosol administration, BD is partially removed from its primary site of action, the lower airways, by mucociliary clearance prior to dissolution and absorption, and eventually, swallowed into the gastrointestinal tract [10]. Therefore, BD entrapment within biocompatible and biodegradable nanocarriers is a promising approach to improve therapeutic efficacy, reduce the risk of side effects by prolonging BD retention time in the lung and achieve controlled or targeted drug delivery [11].

Nanocapsules are colloidal drug carriers characterized by a lipophilic core surrounded by a polymeric layer, in which the drug can be dissolved in the oily core and/or adsorbed at the polymeric wall [12]. The advantages of using such colloidal carriers include: potential to increase the bioavailability of poorly water-soluble drugs, ability to control the rate and/or the site of drug release and possibility to improve drug stability related to enzymatic, immunological or chemical/photochemical degradation, among others [13]. In spite of these advantages, there is no report on the development of nanocapsules containing BD. In this way, experiments are being conducted in our laboratory in order to formulate BD-loaded biodegradable nanocapsules. At the same time, it is necessary to work with a validated analytical technique for assaying BD from these formulations.

A literature survey indicated few HPLC methods to determine BD in pharmaceutical formulations. BD is officially listed in the British and in the US Pharmacopeias. In the first one, it is described a laborious method using elution by gradient, elevated temperature, and presenting retention time of 25 minutes [5]. In its turn, US Pharmacopeia [14] reports a

simpler HPLC method with a mobile phase constituted by acetonitrile and water eluting at room temperature. The retention time is approximately 6 minutes. In the open literature, it was not found works on the validation of analytical methods for the determination of BD in bulk drug and pharmaceutical formulations. In relation to its determination in biological fluids, Foe and co-workers [15] compared the kinetics of metabolism of BD and its monopropionate ester in human lung homogenates and plasma using a HPLC method with an isocratic mobile phase composed by a mixture of methanol/water/acetonitrile/acetic acid (352:166:50:1, v/v) eluting at a flow rate of 1.3 mL/min. The UV detection was at 242 nm. According to Girault and co-workers [16], low levels of corticosteroids cannot be accurately measured with conventional HPLC methods due to the lack of sensitivity. For this reason, HPLC coupled to mass spectrometry has been used for BD quantification in complex biological matrices [16, 17].

According to The International Conference on Harmonization (ICH) stability guideline [18], stress testing of a drug substance can be carried out to elucidate its inherent stability characteristics under hydrolytic, oxidative and photolytic conditions. Considering BD, to the best of our knowledge, there is no stability-indicating method published for this drug.

Taking all of this into account, in the present study, a simple reverse-phase HPLC method with UV detection was validated for quantifying BD in nanocapsules, as well as to study forced degradation of the drug under stress conditions. The experiments were performed in accordance with ICH guidelines parameters [18-20].

Experimental

Materials

Beclomethasone dipropionate (97% w/w) was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil), Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and Span 80[®] (sorbitan monooleate) were acquired from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Tween 80[®] (polysorbate 80) was purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Sweet almond oil was kindly donated by Campestre (São Bernardo do Campo, Brazil). HPLC-grade methanol was purchased from Tedia (São Paulo, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q[®] Plus apparatus (Millipore, Billerica, USA). All other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

Apparatus and chromatographic conditions

All the experiments were performed on a Shimadzu LC-10A HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10 ADVP pump, an UV-VIS SPD-10AVP detector, a SCL-10AVP system controller, and a Rheodyne valve sample manual injector with 50 μL loop. For separations, a RP C₁₈ Phenomenex column (250 mm X 4.60 mm, 5 μm particle size, 110 Å pore diameter) at room temperature and a mobile phase consisting of methanol and water (85:15 v/v) at isocratic flow rate (1.0 mL/min) was used. The injection volume was 50 μL and the detection was monitored at a wavelength of 254 nm. The peak areas were automatically integrated by the Class VP solution software program. In order to protect the analytical column, a guard column was used (Security Guard C₁₈ 4 X 3.0 mm).

Preparation of nanocapsule suspensions

BD-loaded nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of PCL [21]. An organic solution consisting of acetone (27 mL), BD (0.005 g), PCL (0.100 g), sorbitan monooleate (0.077 g) and almond oil (330 μL) was added into an aqueous solution of polysorbate 80 (0.077 g) under moderate magnetic stirring at 40°C. After 10 minutes, the acetone was eliminated and the water was concentrated under reduced pressure to achieve 0.5 mg/mL of BD. The sample was named NC-BD. For comparison purposes, a blank formulation was prepared omitting the drug (NC-B).

Preparation of standard and sample solutions

A stock standard solution (0.5 mg/mL) of BD was prepared by accurately weighing 0.005 g of drug, transferring to 25 mL volumetric flask and making up to volume with methanol. For BD quantification in the nanocapsules and evaluation of the validation parameters the suspensions were diluted with methanol, sonicated for 10 minutes and then subjected to centrifugation for 20 minutes to extract the drug. All solutions were filtered through a regenerated cellulose membrane (pore size 0.45 μm) before HPLC injection ($n=3$).

Method development

Detection wavelength for the HPLC study was selected as 254 nm. The chromatographic conditions were optimized for resolution of the peak of BD and degradation products under each forced degradation condition by varying the proportion of methanol-water in the mobile phase. Samples of different stress conditions were used to optimize the chromatographic conditions for resolving BD and all the degradation products in a single run. An appropriate blank was injected before the analysis of all forced degradation samples. The

method was then validated and applied for the determination of BD in nanocapsule suspensions.

Method Validation

Validation studies were conducted using the optimized assay conditions based on the principles of validation described in the ICH guidelines. The method was validated for specificity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy, precision and robustness.

The specificity was determined by analyzing the chromatograms of unloaded nanocapsule suspensions (blank nanocapsules) in comparison with those obtained for BD-loaded nanocapsules aiming to confirm that none of the excipients interfere with the quantitation of the drug. Peaks due to degraded products and excipients were examined.

Forced degradation studies were also carried out in order to provide some information about drug stability and specificity of the proposed method. The standard solution of BD was subject to accelerated degradation by acid, basic and photolytic conditions. To study the acid degradation, 6.25 mL of the stock solution (1.0 mg/mL of BD) was diluted in a 25 mL volumetric flask with 0.1 M HCl. This solution was maintained at room temperature and protected from light for 1 h. After the reaction time, the solution was neutralized with 0.1 M NaOH. The solution was diluted with methanol to achieve a final concentration of 15 µg/mL before injection into the HPLC system. The same procedure was adopted for the alkaline degradation, except by the fact that 0.1 M HCl was replaced by 0.1 M NaOH in sample preparation. For photodegradation, 1.5 mL of BD methanolic solution (0.5 mg/mL of BD; BD-MS) was placed in a plastic cuvette and subsequently exposed to UV radiation (Phillips TUV lamp–254 nm, 30 W) for 6 h in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm), at a fixed distance. At predetermined times (0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours) of exposure to light, 300 µL of the samples were withdrawn and diluted with methanol (final concentration of 15 µg/mL of BD) in order to quantify the remaining BD according to the method previously described. In order to refute the hypothesis of thermal degradation, a cuvette containing BD-MS was covered by aluminum paper and was evaluated as the same way. The degradation rate kinetics of BD was determined and the best fit observed indicates the reaction order. The kinetics model used were: zero order ($C=C_0-kt$), first order ($\ln C=\ln C_0-kt$) and second order equation ($1/C=1/C_0+kt$).

Linearity test solutions for the assay method were prepared from BD stock solutions at five concentration levels (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, and 25.0 µg/mL). The peak area versus

concentration data was performed by least-squares linear regression analysis. The calibration graph was obtained by plotting the peak areas of the standard solutions against standard concentrations. The linearity test was performed for 3 consecutive days in the same concentration range for assay method. The solutions were injected in triplicate into the HPLC column keeping the injection volume constant (50 μL) and chromatograms were recorded. The % RSD value for the slope and Y-intercept of the calibration curve were calculated.

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the response (δ) and the slope (S) of the calibration curve and were expressed as $3.3 \delta/S$ and $10 \delta/S$, for LOD and LOQ, respectively.

The accuracy of the analytical method was investigated by spiking blank nanocapsules with known concentrations of the stock solution to achieve final theoretical drug concentrations of 7.5, 12.5 and 17.5 $\mu\text{g/mL}$. The analyses were performed in triplicate in three different days.

The precision of the assay method was determined in two levels: repeatability (intraday precision) and intermediate precision (interday precision). Six samples of nanocapsules (15 $\mu\text{g/mL}$) were assessed on the same day in order to evaluate the repeatability of the method and in two different days in order to determine intermediate precision. Results were reported in terms of relative standard deviation (RSD %).

To determine the robustness of the method, experimental conditions were purposely altered to check the reproducibility of the method. Robustness was evaluated by analyzing drug content of the nanocapsules with small variations in the flow rate (0.9 and 1.1 mL/min) and composition of the mobile phase (80:20 and 90:10 methanol/water, v/v). Samples were evaluated in triplicate for each variation of the method conditions. Chromatograms were recorded and compared with chromatographic conditions mentioned earlier.

Evaluation of encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency was estimated by ultrafiltration-centrifugation technique using Amicon Ultra[®] 10,000 MW devices (Millipore). After centrifugation at 2200 xg for 10 minutes, free BD was assayed in the ultrafiltrate. The encapsulation efficiency was calculated as the difference between the total and the free drug concentrations, as follows:

$$EE = \frac{\text{Total content} - \text{Free content}}{\text{Total content}} \times 100$$

Results and Discussion

Optimization of chromatographic conditions

Viewing to establish the chromatographic conditions, preliminary tests were carried out in order to select the detection wavelength and the mobile phase composition. The organic solvent chosen to compose the mobile phase was methanol because it is more cost-effective than acetonitrile and it is the solvent used to prepare the standard and sample solutions. Initial trials were conducted with mixtures of methanol and ultrapure water in the following proportions: 70:30, 85:15 and 80:20 v/v. The mobile phases were tested at flow rates of 0.8, 1.0 and 1.2 mL/min. With the aid of a photodiode array detector, the wavelength selected was 254 nm, which is in accordance with USP and British Pharmacopoeias. Considering retention time, peak symmetry, peak selectivity and peak width, the mobile phase of methanol and water (85:15, v/v) at 1.0 mL/min was considered satisfactory (theoretical plates = 5829 and tail factor = 1.1). The retention time was 5.9 minutes (Figure 2b).

Method validation

Specificity was evaluated for the influence of the formulation components, as well as for the interference of possible degradation products in the assay of BD. By comparing the both chromatograms presented in Figure 2, it is possible to conclude that there is no interference from the components of nanocapsules in the drug peak. Moreover, the photodiode array detector showed that the BD peak was free from interferents (purity index > 0.9999).

In relation to the presence of degradation products, forced degradation studies showed different results depending on the stress conditions employed. In alkaline medium, there was significant degradation of BD, (approximately 99%), with one majoritary additional peak detected at 3.6 min (Figure 3a). On the other hand, after exposure to 0.1 M HCl, approximately 55% of BD was degraded (Figure 3b). Chen and co-workers [22] reported the formation of an enol aldehyde from BD and other corticosteroids under acid conditions. However, the reaction conditions were not the same employed in our study. In that work, the enol aldehyde was generated from concentrated sulfuric acid, which was responsible for the β -elimination of water from the side chain of corticosteroid (Mattox rearrangement) and in alkaline condition (1.0 N NaOH) it was not observed degradation of BD.

Under the photolytic conditions, decreases in the BD concentration of the methanolic solution were observed (Figure 4a). No additional peaks appeared in the chromatograms,

indicating that the degradation products were not detected under the developed experimental conditions.

Aiming at elucidating the kinetics of photodegradation of BD from solution, the experimental data were fitted to zero, first and second order equations. The plots showed in Figure 4 indicated that the photodegradation process of BD in methanolic solution followed a zero order kinetic with a rate constant of 18.072 h^{-1} . In this case, the degradation of BD is independent on the drug concentration.

As for the linearity of the method, it was observed a linear relationship between peak area and concentration of BD in the concentration range of 5.0-25.0 $\mu\text{g/mL}$. The linear equation obtained by the least-square method was $y = 56798x + 6295.1$ and showed an adequate correlation coefficient ($r = 0.9993$). The validity of the assay was verified by analysis of variance (ANOVA), which confirmed that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}} = 1793.3864 > F_{\text{critical}} = 4.96$; $p < 0.05$) with no linearity deviation ($F_{\text{calculated}} = 0.7657 < F_{\text{critical}} = 3.71$; $p < 0.05$).

The accuracy of the method, evaluated by a recovery study, presented average recoveries for the three levels of concentration ranging from 98% to 101% (Table 1). Regarding precision, the results of repeatability and intermediate precision are shown in Table 2. RSD values were lower than 2%. Thus, the proposed analytical method was considered accurate and precise.

Regarding LOD and LOQ, the lowest concentrations assayed with acceptable precision and accuracy were 0.16 $\mu\text{g/mL}$ and 0.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively, meaning that the method is sensitive enough to detect and quantitate BD in the concentration range of 5.0-25.0 $\mu\text{g/mL}$.

Concerning the evaluation of robustness, the results showed RSD values lower than 2%, which indicates that changes in the proportion of the mobile phase, as well as variations in the flow rate did not affect the assay of BD in the nanocapsule suspensions (Table 3). Little variations in the retention time were observed, as expected, without compromising the evaluation of drug content.

Method application

In order to show the applicability of the validated method, the drug content and the encapsulation efficiency of BD-loaded nanocapsules were determined. The experimental concentration of the drug in the formulation was according to its theoretical concentration (0.5 $\mu\text{g/mL}$) with a low RSD value from the triplicate analysis (0.51 ± 0.01). As regards the rate of drug associated with the polymeric nanocapsules, the encapsulation efficiency was 99.37%,

which can be explained by the lipophilic nature of this drug. Therefore, the validated method was successfully applied to the assay of BD in nanocapsule suspensions and can be considered an important tool in the quality control of these promising formulations.

Conclusions

The developed and validated RP-HPLC method proved to be specific, linear, accurate, precise, and robust for the rapid determination of BD in polymeric nanocapsule suspensions, and can be applied for study the stability and degradation kinetics of the drug.

Acknowledgments

J. M. C. thanks CAPES/Brazil for a master fellowship.

References

- [1] Vidgren M, Waldrep J, Arppe J, Black M, Rodarte J, Cole W, Knight V (1995) A study of ^{99m}technetium-labelled beclomethasone dipropionate dilauroylphosphatidylcholine liposome aerosol in normal volunteers. *Int J Pharm.*
- [2] Wilcox JB, Avery GS (1973) Beclomethasone dipropionate corticosteroid inhaler: a preliminary report of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in asthma, *Drugs.*
- [3] Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS (1984) Beclomethasone dipropionate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy after a decade of use in asthma and rhinitis, *Drugs.*
- [4] Barnes PJ (2010), Inhaled glucocorticoids for asthma, *N Engl J Med.*
- [5] British Pharmacopoeia, London: Her Majesty. Stationary Office; v.1, 2010.
- [6] De Kloet ER, Sutanto W, Van den Berg DT, Carey MP, Van Haarst AD, Hornsby CD (1993) Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. *J Steroid Biochem. Mol Biol.*
- [7] Cole CH, Shab B, Abbasi S, Demissie S, Mackinnon B, Colton T, Framtz ID(1999) Adrenal function in premature infants during inhaled beclomethasone therapy. *J Pediatr.*
- [8] Jacobs C, Müller RH (2002) Production and Characterization of a Budesonide Nanosuspension for Pulmonary Administration. *Pharm Res.*

- [9] Sakagami M, Kinoshita W, Sakon K, Sato J, Makino Y (2002) Mucoadhesive beclomethasone microspheres for powder inhalation: their pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation. *J Control Release*.
- [10] Hochhaus G, Derendorf H, Moellman H, Gonzalez-Rothi R (1997) Pharmacokinetic/pharmacodynamic aspects of aerosol therapy using glucocorticoids as a model. *J Clin Pharmacol*.
- [11] Helle A, Hirsjärvi L, Peltonen L, Hirvonen J, Wiedmer SK (2008) Quantitative determination of drug encapsulation in poly(lactic acid) nanoparticles by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*.
- [12] Schaffazick SR, Freitas LL, Pohlmann AR, Guterres SS (2003) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*.
- [13] Couvreur P, Vauthier C (2006) Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res*.
- [14] The United States Pharmacopeial Convention. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852. 2009.
- [15] Foe K, Brown KF, Paul J, Seale JP (2000) Comparative Kinetics of Metabolism of Beclomethasone Propionate Esters in Human Lung Homogenates and Plasma. *J Pharm Sci*.
- [16] Girault J, Istin B, Malgouyat JM, Brisson AM, Fourtillan JB (1991) Simultaneous determination of beclomethasone, beclomethasone monopropionate and beclomethasone dipropionate in biological fluids using a particle beam interface for combining liquid chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *J Chrom B: Biomed SciAppl*.
- [17] Taylor RL, Grebe SK, Sing RJ (2004) Quantitative, Highly Sensitive Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Detection of Synthetic Corticosteroids. *Clin Chem*.
- [18] ICH (2003) Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2). International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva.
- [19] ICH (1996) Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B. International Conference on Harmonization (ICH), IFPMA, Geneva.
- [20] ICH (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2R1. International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva.
- [21] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP (1988) European Patent 0274961 A1.

[22] Chen B, Li M, Lin M, Tumambac G, Rustum A (2009) A comparative study of enol aldehyde formation from betamethasone, dexamethasone, beclomethasone and related compounds under acidic and alkaline conditions. *Steroids*.

Table 1 Accuracy data for beclomethasone dipropionate analysis ($n=3$)

Levels of concentration	Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Actual concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD* (%)
Low	7.50	7.41 ± 0.19	98.73	2.61
Medium	12.50	12.22 ± 0.22	98.03	1.36
High	17.50	17.56 ± 0.10	100.35	0.58

*RSD=Relative Standard Deviation

Table 2 Repeatability and intermediate precision data for beclomethasone dipropionate analysis ($n=3$)

	Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Actual concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD* (%)
Day 1 ($n=6$)	15.00	14.86 ± 0.21	99.06	1.43
Day 2 ($n=6$)	15.00	15.27 ± 0.14	101.85	0.96
Mean \pm SD	15.00	15.06 ± 0.29	99.06	1.97

*RSD= Relative Standard Deviation.

Table 3 Robustness data for beclomethasone dipropionate analysis ($n=3$)

	Drug content (%)		Run time (min)
	(%)	RSD* (%)	(min)
<i>Optimum conditions</i>			
85:15 MeOH:Water; 1.00 mL/min	99.78	0.76	5.9
<i>Mobile phase</i>			
90:10 MeOH:Water	100.69	0.78	4.2
80:20 MeOH:Water	99.78	0.28	5.4
<i>Flow rate</i>			
0.90 mL/min	100.27	1.97	5.1
1.10 mL/min	100.28	0.73	6.3

*RSD= Relative Standard Deviation.

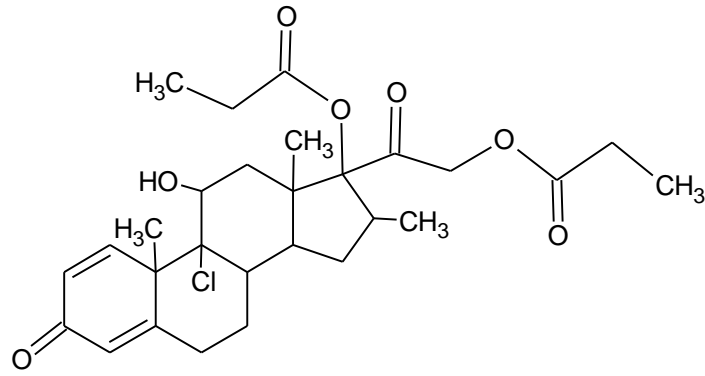


Fig. 1 Chemical structure of Beclomethasone Dipropionate

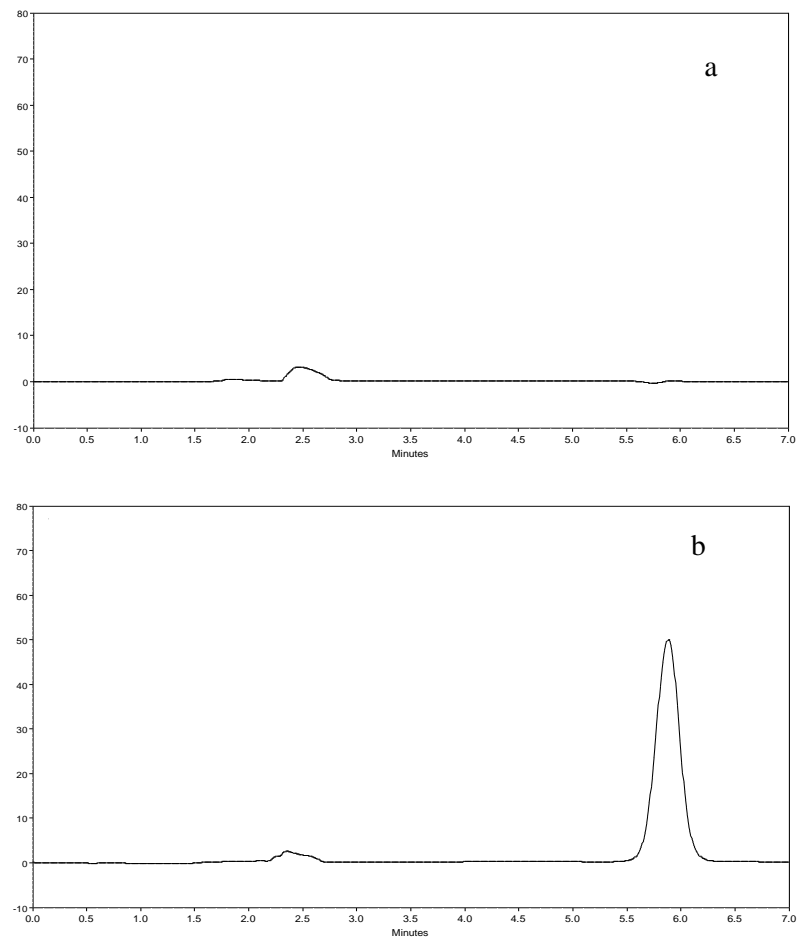


Fig. 2 Chromatograms of blank nanocapsules (a) and beclomethasone dipropionate-loaded nanocapsules (b).

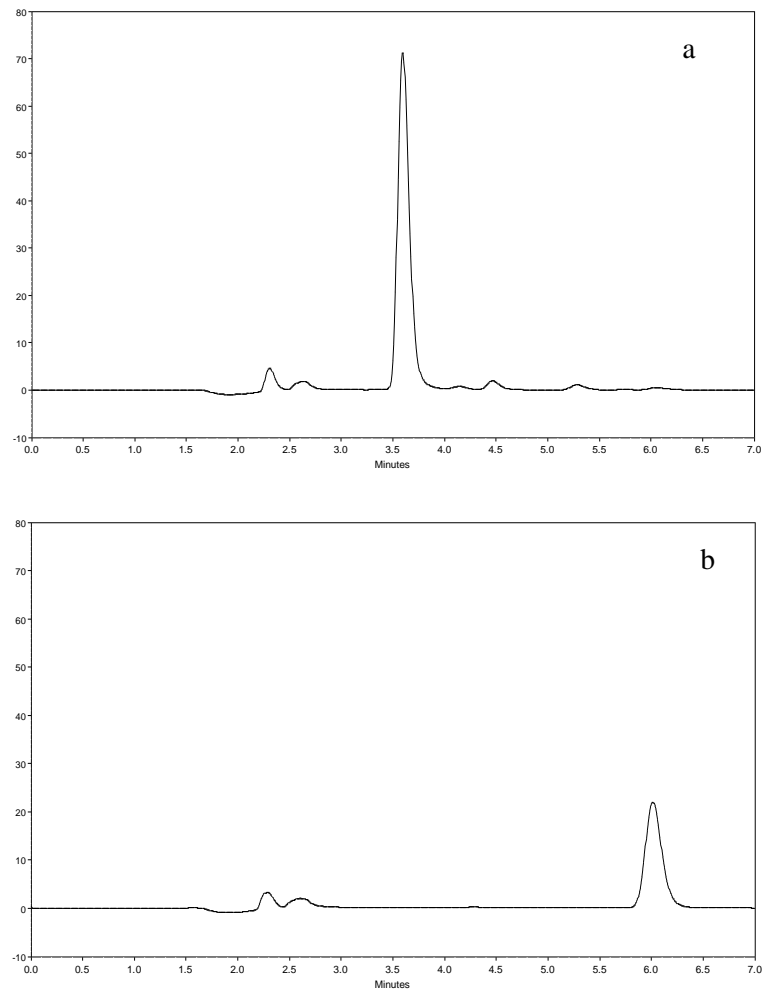


Fig. 3 Chromatograms obtained after one hour of BD exposure under alkaline conditions (a) and under acid conditions (b).

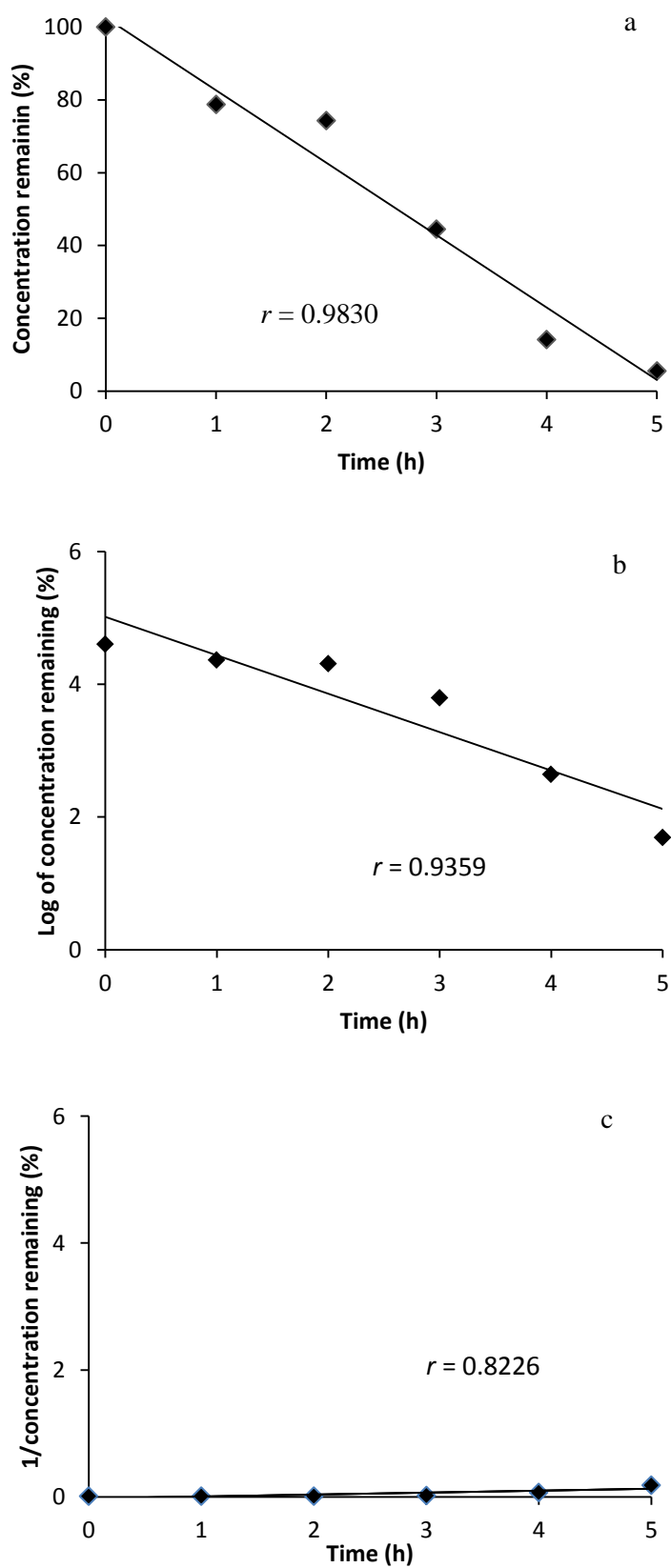


Fig. 4 Plots of concentration (a)-zero-order reaction, log of concentration (b)-first-order reaction, and reciprocal of concentration (c)-second-order reaction of BD remaining versus time.

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo dipropionato de beclometasona

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo dipropionato de beclometasona

2.1 Apresentação

No presente capítulo será abordado o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas para liberação pulmonar do dipropionato de beclometasona. Com este intuito, dois polímeros foram selecionados: a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e a etilcelulose (EC). O uso da PCL na preparação de nanocápsulas já é bem consagrado, uma vez que é um poliéster alifático sintético, biocompatível, biodegradável e amplamente empregado no controle da liberação de fármacos (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). A EC, por sua vez, é um derivado semissintético da celulose que apresenta como principais características a biocompatibilidade e hidrofobicidade, o que determina sua capacidade de promover liberação sustentada. Apesar de não ser biodegradável, este polímero tem sido estudado recentemente na obtenção de formas inalatórias (TRAINI et al, 2012; FENG; ZHANG; ZHU; 2013). As suspensões de nanocápsulas preparadas com ambos os polímeros foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas, fotoestabilidade, perfil de liberação *in vitro*, citotoxicidade *in vitro* em linhagem celular de fibroblasto e toxicidade pulmonar aguda *in vivo*. Os resultados obtidos foram alvo da redação do segundo artigo oriundo desta dissertação e serão submetidos ao periódico *Drug Development and Industrial Pharmacy*.

Na segunda parte deste capítulo, o polissorbato 80, tensoativo de elevado EHL amplamente utilizado na preparação de nanocápsulas, foi substituído pelo pullulan, um polissacarídeo formado por unidades de maltotriose obtido a partir da fermentação do fungo *Aureobasidium pullulans* (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). A eficácia do pullulan na estabilização de emulsões já foi demonstrada (KSHIRSAGAR et al., 2007), entretanto, não há relatos na literatura sobre a sua utilização em nanopartículas poliméricas. Devido ao seu elevado peso molecular, o pullulan poderia promover uma maior estabilidade às formulações, em comparação com os tensoativos de baixo peso molecular, como o polissorbato 80. Assim, o terceiro artigo desta dissertação abrange a proposta da utilização do pullulan nas nanocápsulas de PCL demonstradas no artigo anterior. Este artigo será submetido para publicação no periódico *Express Polymer Letters*.

PUBLICAÇÃO 2: Polymeric nanocapsules intended for pulmonar delivery of Beclomethasone Dipropionate: development, *in vitro* citotoxicity and *in vivo* evaluation of acute lung injury

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Drug Development and Industrial Pharmacy*

Polymeric nanocapsules intended for pulmonary delivery of Beclomethasone Dipropionate: development, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* evaluation of acute lung injury

Janaína Micheli Chassot¹, Daniele Ribas¹, Elita Ferreira Silveira³, Lauren Dockhorn Grünspan², Camila Cervi Pires², Elizandra Braganhol³, Leandro Tasso², Letícia Cruz^{1*}

¹Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Institute of Biotechnology, Caxias do Sul University, Caxias do Sul, Brazil.

³Laboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

*Corresponding author:

Letícia Cruz, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105-900, Brazil.

Phone: +55 55 32209373. Fax: +55 55 32208149.

E-mail: leticiacruz@smaail.ufsm.br

Abstract

The aim of this work was to develop polymeric nanocapsules intended for the pulmonary delivery of beclomethasone dipropionate (BD) using Ethyl cellulose (EC) or Poli(ϵ -caprolactone) (PCL). The formulations showed adequate physicochemical characteristics, namely, average diameter lower than 260 nm, low polydispersity index, negative zeta potential, neutral pH values, and encapsulation efficiencies close to 100%. In addition, both EC and PCL nanocapsules were able to delay the drug photodegradation under UVC radiation. The *in vitro* drug release showed a prolonged release without burst effect using the dialysis bag diffusion technique. Moreover, EC and PCL nanocapsules presented low *in vitro* cytotoxicity on 3T3 fibroblasts cells. *In vivo*, the formulations showed no acute pulmonary injury in rats. Therefore, the developed nanocapsules could be considered suitable carriers to be used for beclomethasone dipropionate pulmonary delivery.

Keywords: Beclomethasone dipropionate, nanocapsules, pulmonary delivery, ethyl cellulose, poli(ϵ -caprolactone), acute lung toxicity.

1. Introduction

Beclomethasone dipropionate (BD) is a well-established corticosteroid drug used in the management of chronic asthma (Nicolini et al., 2010). After binding to glucocorticoid receptor at cellular nucleus level, BD exerts its anti-inflammatory activity by inhibiting the synthesis of cytosolic phospholipase A2 or by inducing repression of cyclooxygenase-2. In both pathways, the production of prostaglandins, which are the mediators of inflammation processes, is inhibited (Benedictis; Bush, 2012).

Like other corticosteroids, BD is a poorly water-soluble drug, which favors its cellular penetration, but complicates drug dissolution within airways, BD is rapidly removed by mucociliary clearance before being absorbed due to its slow dissolution, resulting in short duration of action, which affects the drug therapeutic efficacy (Boobis, 1998). As consequence, it is recommended two to four doses of BD per day (Barnes, 1995). Moreover, the swallowed fraction can enhance the systemic side effects of the drug (Trescoli; Wards, 1998).

Over the last decades, nanocarriers have been widely studied to control and/or target the release of drugs via different routes of administration (Ravi Kumar, 2000; Vauthier et al, 2003; Mora-Huertas et al., 2010; Raso; Geckeler, 2011; Wu et al, 2011). Drug delivery to the lungs is considered a non-invasive mode of administration, which presents many advantages such as large surface area, thin pulmonary epithelium, and rich blood supply (Wichert; Seifart, 2005). The pulmonary administration of nanocarriers can maximize the benefits offered by this route since these colloidal structures can enhance the drug deposition in the deep lung due to their small size and/or mucoadhesivity. Furthermore, the possibility to reduce toxicity as well as the ability of nanocarriers to control the drug release are aspects that have been taken into consideration in the application of these colloidal drug carriers by the pulmonary route.

Up to now, there are few reports on the preparation of nanostructured systems for lung delivery of BD. The first published studies demonstrated the incorporation of the drug in liposomes (Vidgren et al., 1995; Saari et al., 1999). In both studies, the formulations exhibited a sustained release and enhanced drug action in the lower airways of human volunteers. In another study, niosomes, colloidal structures similar to liposomes, showed an improvement of intracellular uptake of the drug and increased anti-inflammatory activity in human lung fibroblast cells (Marianecci et al., 2010). Recently, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers were considered promising BD carriers for pulmonary targeting with slow release via nebulization (Jaafar-Maalej et al., 2011). Considering polymer-based

systems, BD-loaded micelles prepared from a pegylated phospholipid-polyaminoacid conjugate showed excellent biocompatibility and high drug internalization in human bronchial epithelium cell culture (Craparo et al., 2011). In relation to polymeric nanoparticles, BD was studied as a drug model to prepare Eudragit E100 and Eudragit L100 nanoparticles via a novel aerosol flow reactor method (Eerikainen; Kauppinen, 2003) and poly(L-lactic acid) nanoparticles by a modified nanoprecipitation method (Hyvonen et al., 2005). To the best of our knowledge, there is no report in the literature concerning nanoencapsulation of BD into polymeric nanocapsules.

Nanocapsules are defined as nanovesicular systems characterized by a polymer shell surrounding a lipophilic or hydrophilic liquid core. The central cavity is usually composed of an oil (Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010). Ideally, the drug is entrapped or dissolved in the liquid core, however, adsorption on the particle surface can also occur (Cruz et al., 2006a; Cruz et al., 2006b). Compared to nanospheres, which is organized as a polymeric matrix, nanocapsules have been proven to be more advantageous due to their higher drug loading capacity, better protection of drugs from degradation, and reduced burst release (Couvreur et al., 2002).

Thus, the aim of this work was to develop nanocapsules intended for the lung delivery of beclomethasone dipropionate. For comparison purposes, two polymers commonly used to control the drug release were employed: poly(ϵ -caprolactone), a synthetic biodegradable polyester and ethyl cellulose, a semi-synthetic cellulose derivative. The formulations were evaluated for their physicochemical characteristics as well as for their *in vitro* release profiles, ability to delay the drug photodegradation and *in vitro* and *in vivo* toxicity.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Beclomethasone dipropionate was purchased from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)(MW: 80 KDa) and ethylcellulose (EC) (MW: 170 KDa) were supplied by Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) and Colorcon (Cotia, Brazil, respectively). Polysorbate 80 (Tween 80[®]) was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil) and sorbitan monooleate (Span 80[®]) was purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Almond oil was acquired from Campestre (São Bernardo do Campo, Brazil). HPLC-grade methanol was obtained from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). Other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

2.2. Methods

2.2.1. Analytical procedures

The experiments were performed on a LC-10A HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, an UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a Rheodyne valve sample manual injector with 50 μ L loop. Separation was achieved at room temperature using a RP C₁₈ Phenomenex column (250 mm x 4.60 mm, 5 μ m; 110 Å) coupled to a C₁₈ guard column. The isocratic mobile phase consisted of methanol and water (85:15 v/v) at flow rate of 1 mL/min. BD was detected at 254 nm with a retention time of 5.9 min. According to the ICH guidelines, the method was validated for determination of BD in nanocapsules. The method was found to be linear ($r=0.9987$), specific, accurate (98.03% to 100.35%), precise and robust (relative standard deviation was < 2% for all parameters) in the concentration range of 5.0-25.0 μ g/ml, according to a previous work.

2.2.2. Dissolution/Swelling experiments of polymer films

EC films were prepared by dissolution of 1 g polymer in acetone followed by evaporation of the solvent at room temperature. Films of PCL were obtained by compression in a hydraulic press for 5 min at 5 tons (P30000 Hydraulic Press, Bovenau, Brazil). The amount of 100 mg of these films was weighed and placed in contact with enough amount of almond oil to cover the film. In predetermined intervals during a period of 60 days, the films were removed from the contact with the oil and were carefully dried with the aid of an absorbing paper. The weight variation was determined in an analytical balance. Experiments were performed in triplicate.

2.2.3. Preparation of polymeric nanocapsule suspensions

Nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method (FESSI et al., 1988). An organic phase constituted of 0.100 g of polymer (PCL or EC), acetone (27 mL), Span 80[®] (0.077 g), BD (0.003 g or 0.005 g or 0.010 g) and almond oil (330 μ L) was kept for 60 min under moderate magnetic stirring at 40°C. After solubilization of all components, the acetonic phase was poured into 53 mL of an aqueous dispersion of Tween 80[®] (0.077 g) and the magnetic stirring was maintained for 10 min. Next, the organic solvent and part of the water were eliminated by evaporation under reduced pressure to eliminate the acetone and achieve a final volume of 10 mL. The final concentrations of BD were 0.3 mg/mL or 0.5 mg/mL or 1.0 mg/mL. Formulations prepared

with PCL and BD at 0.3 mg/mL and 0.5 mg/mL were called NC-0.3P and NC-0.5P, respectively. Nanocapsules prepared with EC and BD at 0.5 mg/mL and 1.0 mg/mL were named NC-0.5E and NC-1.0E, respectively. For comparison, formulations without the drug (blank nanocapsules, NC-BE and NC-BP) were also prepared. All samples were made in triplicate.

2.2.4. Determination of pH

The pH of nanoparticle suspensions was verified by directly immersing the electrode of a calibrated potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brasil) in the formulations. Measures were performed at room temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) in triplicate.

2.2.5. Particle size analysis, polydispersity index and zeta potential

Particle sizes and polydispersity indexes ($n=3$) were determined by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in ultrapure water (1:500). Zeta potentials were measured using the same instrument after the dilution of the samples in 10 mM NaCl (1:500).

2.2.6. Determination of drug content and encapsulation efficiency

The total drug content of BD in nanocapsule suspensions ($n=3$) was assayed by diluting an aliquot of the sample in 10 mL methanol and subjected to sonication for 10 min and centrifugation for 20 min (1.007 xg). Samples were filtered through a 0.45 μm membrane and injected into the HPLC system using the method described above. For the determination of encapsulation efficiency, an aliquot of the samples was placed in a 10.000 MW centrifugal device (Amicon[®] Ultra, Millipore) and free drug was separated from the nanostructures by ultrafiltration/centrifugation technique at 2.200 xg for 10 min. The difference between the total and the free concentrations of BD, determined in the nanostructures and in the ultrafiltrate, respectively, was calculated as the encapsulation efficiency (EE%) of the nanocapsules according to the following equation:

$$EE\% = \frac{\text{Total drug content} - \text{Free drug content}}{\text{Total drug content}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.7. Photostability study

The evaluation of BD photostability in nanocapsules was performed by exposing the formulations to ultraviolet radiation (Phillips TUV lamp–UVC long life, 30 W) for 5 h in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm). Samples (1 mL) were placed individually in plastic cuvettes with covers and kept 14 cm of distance from the light. At predetermined intervals, aliquots of 330 μ L were withdrawn and diluted in methanol to assay the drug concentration in each sample by HPLC. For comparison purposes, a methanolic solution of free BD (0.5 mg/mL) was also evaluated (BD-MS). To discard the influence of other factors that was not the presence of UVC light in BD degradation, cuvettes containing the samples (NC-0.5P, NC-0.5E and BD-MS), wrapped in aluminum foil, were also evaluated (dark controls). The experiment was performed in triplicate.

In order to establish the degradation kinetics of the drug, BD concentration versus time (zero order process), log of BD concentration versus time (first order process), and reciprocal of BD concentration versus time (second order process) were plotted. Correlation coefficients (r) indicated the reaction order.

The kinetic models and the respective shelf life $t_{90\%}$ can be represented as:

$$C = C_o - kt \quad t_{90\%} = (0.1 \times C_o)/k \text{ (zero-order reaction)} \quad (2)$$

$$\ln C = \ln C_o - kt \quad t_{90\%} = 0.106/k \text{ (first-order reaction)} \quad (3)$$

$$1/C = 1/C_o + kt \quad t_{90\%} = 1/(9k \times C_o) \text{ (second-order reaction)} \quad (4)$$

Where, C_o is the initial concentration, C is the concentration after reaction time t and k is the reaction rate constant.

2.2.8. *In vitro* drug release study

Release profiles of BD from nanocapsules were obtained by dialysis diffusion technique. The samples (NC-0.3P, NC-0.5P, NC-0.5E and NC-1.0E) were placed in a dialysis bag (MWCO 10.000, Spectra Por 7) and this system was immersed in 150 mL of water with 30% of ethanol at 37°C and under continuous magnetic stirring of 50 rpm. Aliquots of 1 mL were withdrawn at predetermined times and replaced by the same volume of fresh medium. The amount of BD released was assayed by HPLC. The experiment was performed in triplicate.

In order to understand the mathematical behavior and the drug release mechanism, the experimental data was fitted to first order equation (equation 3) and to Korsmeyer-Peppas model (equation 5). In this model, Q_t is the amount of the drug released at time t , Q_∞ is the

initial amount of the drug, a is a constant incorporating structural and geometric characteristic of the carrier, and n is the release exponent, indicative of the mechanism of the drug release. For spherical systems, $n=0.43$ implies Fickian diffusion, while $n \geq 0.85$ is related to case II transport. Values between the both limits indicate anomalous transport (Korsmeyer et al., 1983). The fit of the experimental data to the models was performed using the Scientist 2.0 software (Micromath, USA).

$$Q_t/Q_\infty = a.t^n \quad (5)$$

2.2.9. Cell viability assay on fibroblasts cells (3T3)

3T3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After the cells reached 90% confluency, they were subjected to trypsinization and counted in a Newbauer chamber, after seeding 10.000 cells per well in 96-well plates. These plates were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h and were further treated with free BD or nanocapsule formulations (NC-0.5E and NC-0.5P) at concentrations of 1 and 10 µM. Cells treated with DMSO or nanocapsules without drug were used as controls. After 24 h of treatment, cell viability was determined by MTT method, which evaluates the mitochondrial functionality.

2.2.10. In vivo evaluation of acute pulmonary toxicity

Male Wistar rats weighing 250-340 g were used (Biotério Central, UFSM, Brazil). The protocol has been approved by the Ethical Committee of Caxias do Sul University (protocol number 001/12). Animals were divided into seven groups ($n=7$) and were intraperitoneally anesthetized with a solution of ethyl carbamate (100 mg/mL) before the experiments. After checking the degree of anesthesia, the trachea was exposed and an incision was made between the fifth and sixth rings of trachea for subsequent administration of the samples. The rats were maintained at an angle of 70° and animal body temperature was kept at 37°C with an aid of 40W incandescent heat lamp. The following treatments/groups were administered intratracheally by instillation: (G1) 0.1% sodium dodecyl sulfate aqueous solution (100 µL, positive control group); (G2) 100 µL of saline (negative control group); (G3) aqueous dispersion of BD in polysorbate 80 (0.5 mg/mL); and NC-0.5P (G4), NC-BP (G5), NC-0.5E (G6) and NC-BE (G7) formulations. All the samples containing BD were administered at a dose of 0.3 mg/Kg. Four hours after the administrations, animals were

sacrificed and the lungs were removed to perform the bronchoalveolar lavage with 3 mL of physiological saline. The procedure was repeated two more times. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was centrifuged (4000 rpm, 10 min, 4°C) and the supernatant was analyzed for lactate dehydrogenase activity (LDH) and total protein using commercial kits (Roche Diagnóstica[®]).

2.2.11. Statistical Analysis

Formulations were prepared and analyzed in triplicate and results were expressed as mean \pm standard deviation. GraphPad Prism Program, version 5 was the software used for the analyses of variance (ANOVA) and post-hoc multiple comparisons. The release profiles were analyzed by two-way ANOVA followed post hoc student Bonferroni test, express with \pm SD. A p-value < 0.01 was considered to be statically significant for *in vivo* evaluation, while for the other evaluations a $p < 0.05$ was used as reference.

3. Results and discussion

3.1. Dissolution/Swelling of polymer films

PCL and EC films were placed separately in contact with the almond oil in order to observe weight changes in the polymer films. The initial masses of the polymer films were 28.4 ± 3.0 mg and 33.3 ± 2.0 mg for PCL and EC, respectively. After 60 days in contact with the oil, the films suffered slight changes in their weight (PCL film = 32.0 ± 6.0 mg and EC = 35.5 ± 3.0 mg). However, the statistical analysis pointed out that the observed differences were not significant ($p < 0.05$), suggesting that the almond oil is suitable to form PCL or EC nanocapsules. As stated in other studies, an essential condition to the formation of a core-shell structure is the absence of polymer dissolution or swelling by the oil (Couvreur et al, 1995).

3.2. Physicochemical characterization

After preparation, both groups of formulations (PCL and EC) were milky in appearance and showed the characteristic opalescent bluish reflection resulting from the Brownian motion of the colloidal structures. EC nanocapsules were more translucent, which was attributed to the smaller particle sizes of these formulations ($p < 0.05$) (Table 1). In addition, the presence of the drug did not cause significant difference in particle sizes ($p > 0.05$). The polydispersity index was lower than 0.20, which indicates a narrow distribution. The obtained values are in agreement with those normally found in the literature

for these systems prepared by the method of interfacial deposition of preformed polymer (Schaffazick et al., 2003; Guterres et al., 2007, Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Table 1. Physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions ($n=3$).

Sample	Actual		Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
	drug content (mg/mL)	pH			
NC-BP	-	6.6±0.2	237±5	0.20±0.01	-10.0±2.3
NC-0.3P	0.29±0.01	6.9±0.2	242±16	0.19±0.03	-12.7±2.0
NC-0.5P	0.51±0.01	6.8±0.2	260±21	0.15±0.07	-10.0±1.3
NC-BE	-	6.1±0.1	185±0.3	0.15±0.01	-15.9±3.7
NC-0.5E	0.50±0.00	6.6±0.1	158±22	0.08±0.00	-12.0±1.1
NC-1.0E	1.00±0.02	6.4±0.3	185±14	0.10±0.24	-11.7±0.9

In relation to the evaluation of zeta potential, all samples showed negative values, which is consistent with the anionic nature of the polymers. The presence of the drug did not significantly alter the zeta potential of the samples ($p>0.05$). It should be emphasized that the zeta potential values found are in agreement with other works that reported nanocapsules prepared with PCL and polysorbate 80 by the same technique (Alves et al., 2007; Ourique et al., 2008; Almeida et al., 2010; Flores et al., 2011).

With regard to pH, the NC-BE showed value close to the neutrality, which is suitable for lung delivery. Concerning drug content, attempts were made in order to optimize BD concentration in the formulations. Initially, the suspensions were prepared at 1.0 mg/mL of BD, however, PCL nanocapsules presented precipitates immediately after preparation. The maximum concentration of drug achieved for these formulations was 0.5 mg/mL. On the other hand, nanocapsules prepared with EC showed a greater drug loading than PCL formulations. For these suspensions, it was possible to reach a drug content 1.0 mg/mL without drug precipitation. Regardless of drug concentration, all formulations were very close to their theoretical value, indicating no loss or degradation of the drug during the preparation process. Moreover, encapsulation efficiencies of all samples were greater than 98%, which is attributed to the high lipophilicity of BD that avoids its partitioning in aqueous phase.

3.3. Photostability study

Nanocapsules were evaluated for their ability to protect BD against photodegradation. For comparison purposes, a kinetic study was carried out with the nanocapsule suspensions prepared at 0.5 mg/mL and with a methanolic solution of the drug at the same concentration. After 5 h of exposure to UVC radiation, BD content in NC-0.5E and NC-0.5P was approximately 24% and 39% (Figure 1), respectively; whereas in the methanolic solution only 5% of BD remained intact. The significant difference ($p < 0.05$) between the formulations could be explained by the different chemical compositions and degrees of crystallinity of both polymers, which could influence the ability of particles to scatter and/or reflect the UV radiation (Perugini et al., 2002). In relation to the dark controls, BD concentration was closed to 100%, which eliminates the influence of chamber temperature on drug degradation.

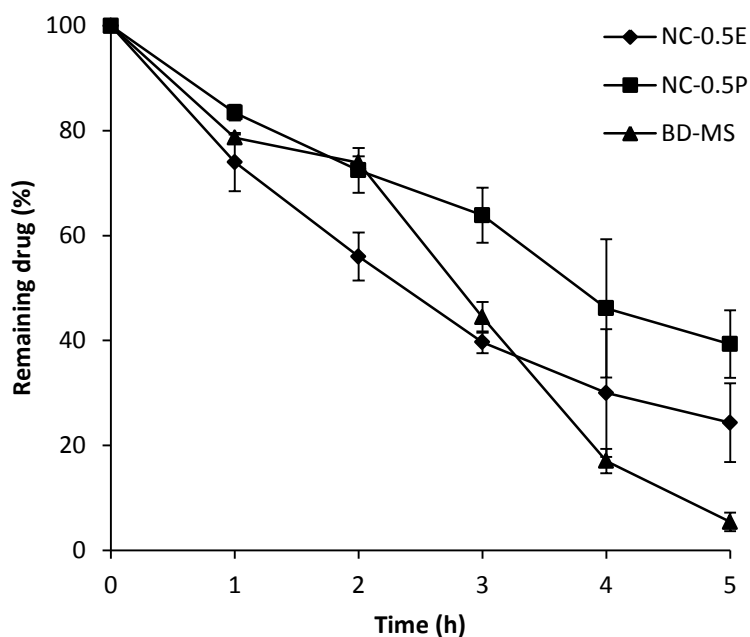


Figure 1. Percentage of photodegradation of beclomethasone dipropionate in solution of methanol (BD-MS) and in beclomethasone dipropionate loaded-nanocapsules (NC-0.5E and NC-0.5P).

Aiming at elucidating the kinetics of photodegradation of BD from both solution and nanocapsules, the experimental data were fitted to zero, first and second order equations. By comparing the correlation coefficients (Table 2), free drug (BD-MS) and NC-0.5P showed a better adjustment to zero-order kinetics, while the photodegradation of NC-0.5E followed the

first order equation. It means that the degradation of BD in NC-0.5E is directly proportional to its concentration. In NC-0.5P and in methanolic solution, results suggest that the rate of BD degradation is independent of the drug concentration.

Table 2. Correlation coefficients (r), photodegradation rate constants (k) and shelf life($t_{90\%}$) of free beclomethasone dipropionate (BD-MS) and beclomethasone dipropionate-loaded nanocapsules (NC-0.5E and NC-0.5P) exposed to UV light for 5 h ($n=3$).

Sample	Kinetic order	K	r	$t_{90\%}$
NC-0.5E	Zero	15.048	0.9734	0.6645
	First	0.2891	0.9981	0.3667
	Second	0.0064	0.9880	0.1736
NC-0.5P	Zero	12.11	0.9938	0.8258
	First	0.1877	0.9900	0.5647
	Second	0.0031	0.9705	0.3584
BD-MS	Zero	19.902	0.9830	0.5025
	First	0.5786	0.9359	0.1832
	Second	0.0302	0.8226	0.0368

$t_{90\%}$ calculated according to the equation related to kinetic order of reaction.

3.4. *In vitro* drug release study

With respect to the *in vitro* drug release experiments, PCL nanocapsules had similar release profiles regardless of the drug concentration ($p>0.05$). NC-0.3P and NC-0.5P released 100% of the drug in 108 h of experiment (Figure 2a). On the other hand, the corresponding ethanolic solutions of BD (BD-ES-0.3 and BD-ES-0.5) released the totality of the drug in 24 h. For EC nanocapsules, an influence of the drug concentration on the release profiles ($p<0.05$) was observed. NC-0.5E and NC-1.0E took 96 and 60 h to release 100% of the drug, respectively (Figure 2b). The difference in the release rate could be explained by the concentration gradient between the nanocapsules and the out water phase. At higher drug concentrations, the release is more rapid since this gradient is the driving force for drug diffusion. Moreover, at higher loading level, the drug may be distributed near the surface of nanocapsules giving a more rapid release. However, the ethanolic solutions BD-ES-0.5 and BD-ES-1.0 showed the complete drug release in 24 and 36 h of experiment, respectively. For both group of formulations, the nanoencapsulation of BD slowed the drug release, which may

prolong its duration of action and improve the therapeutic efficacy. As observed for lipid nanostructures, polymeric nanocapsules were also able to prolong BD release. However, those lipid carriers did not show a complete drug release in 16 days of experiment. About 20% and 77% of BD was released from solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, respectively (Jaafar-Maalej et al., 2011).

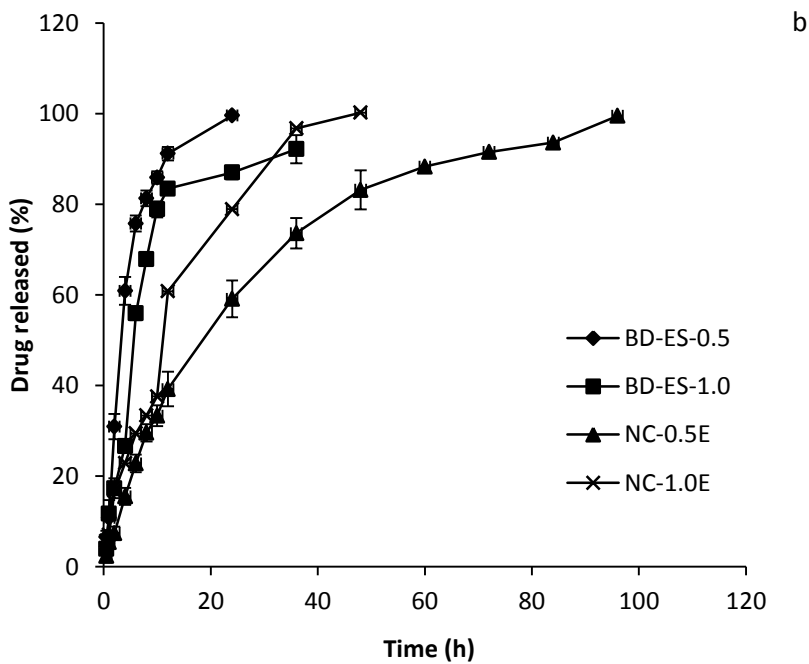
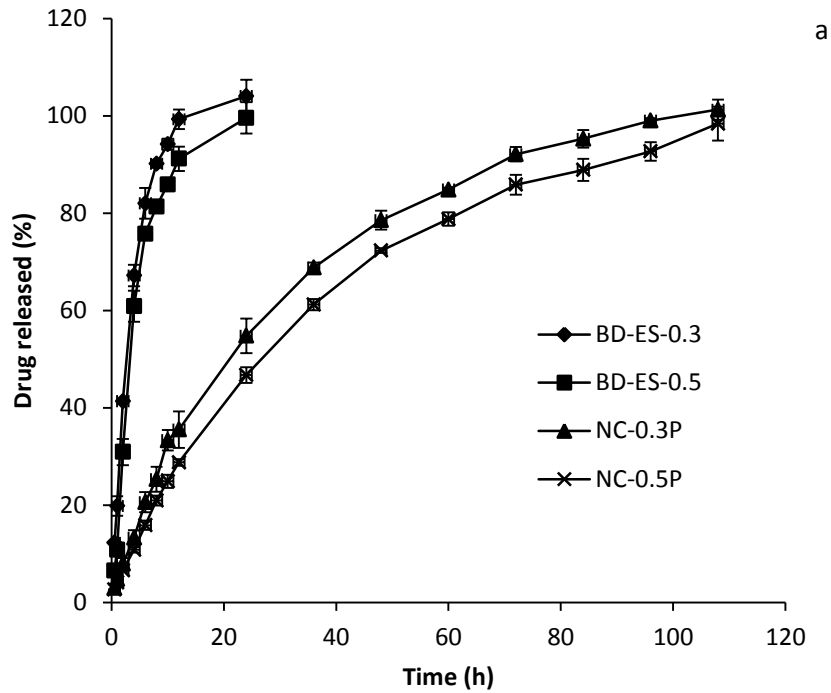


Figure 2. *In vitro* beclomethasone dipropionate release profiles: (a) ethanolic solution (BD-ES-0.3 and BD-ES-0.5) and nanocapsules (NC-0.3P and NC-0.5P); (b) ethanolic solution (BD-ES-0.5 and BD-ES-1.0) and nanocapsules (NC-0.5E and NC-1.0E).

The experimental data was modeled to first order equation and to Korsmeyer-Peppas model with the aim to understand the mathematical behavior of release profiles and the drug release mechanism. According to the correlation coefficients showed in Table 3, all samples presented a good fit to the first order equation ($r > 0.99$). In this case, the release rate depends only on the drug concentration and occurs in a single step, without burst effect, which confirms that the drug is confined in the oily core of the nanocapsules. In relation to the drug release mechanism, the release exponent obtained from equation 5 indicated that BD release is driven by anomalous transport, i.e., the drug release is controlled by polymer relaxation/degradation followed by Fickian diffusion of BD.

Table 3. Parameters calculated by first order and Korsmeyer-Peppas models for BD-loaded nanocapsules.

	NC-0.3P	NC-0.5P	NC-0.5E	NC-1.0E
First order				
r	0.9981±0.0001	0.9989±0.0006	0.9992±0.0002	0.9925±0.0002
k (h^{-1})	0.034±0.002	0.034±0.002	0.038±0.002	0.044±0.003
$t_{1/2}$ (h)	20.38	20.38	18.23	15.75
Korsmeyer-Peppas				
r	0.9913±0.001	0.9935±0.001	0.9863±0.001	0.9964±0.002
a	0.096±0.011	0.077±0.004	0.114±0.008	0.077±0.006
n	0.518±0.028	0.565±0.012	0.484±0.014	0.638±0.018

3. 5. *In vitro* cytotoxicity evaluation

In vitro cytotoxicity tests have been considered a valid approach to evaluate the safety of new formulations. In this work, the toxicity of PCL and EC nanocapsules loaded with BD was assessed *in vitro* on 3T3 cells by measuring the mitochondrial function of the cells through the reduction of the tetrazolium dye (MTT) to purple formazan in living cells.

As illustrated in Figure 3, free BD or BD-loaded nanocapsules did not show a significant ($p>0.05$) cytotoxic activity on 3T3 cells for concentrations at 1 and 10 μM of BD, in relation to the controls (DMSO or nanocapsules without drug).

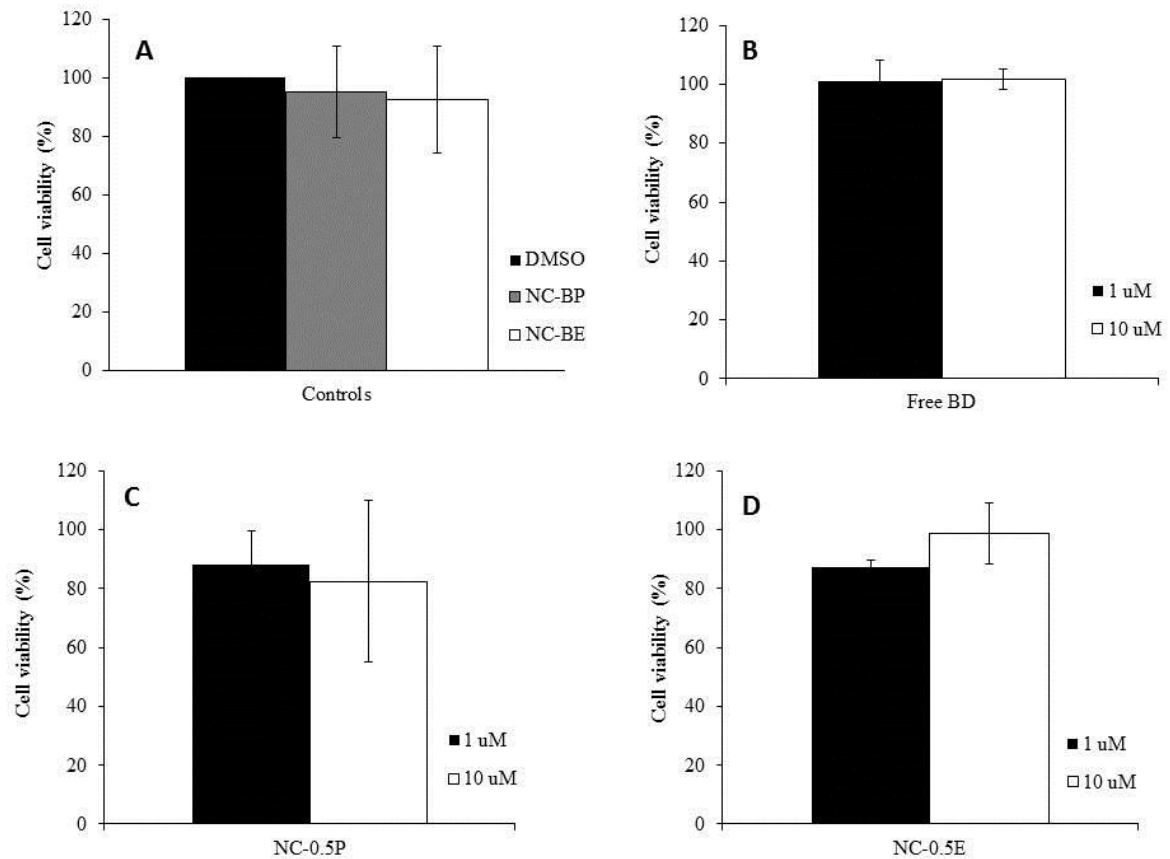


Figure 3. Cell viability(%) after 24 h of incubation with free BD (B), NC-0.5P (C) and NC-0.5E (D) in relation to the controls (A) (DMSO or nanocapsules without drug).

3. 6. *In vivo* evaluation of acute pulmonary toxicity

In order to evaluate whether the pulmonary delivery of BD from nanocapsules could lead to lung damage, the formulations were administered to rats and the bronchoalveolar lavage was performed. LDH and total protein levels in the BALF have been considered useful biomarkers of cell damage. Protein content is an indicative of increased permeability of alveolar-capillary barrier, while the presence of the cytoplasmic enzyme LDH in the BALF is associated to cell death (Henderson, 2005).

As shown in Figure 4, BD in aqueous dispersion or in nanocapsule suspensions did not influence the amount of protein and the activity of LDH in the BALF. The administration of

SDS (G1), which is the positive control, produced a 7.22-fold increase in LDH levels 4 h after the treatment when compared to the negative control (G2) (Figure 4a). It is important to note that the groups treated with NC-0.5P (G4) and NC-0.5E (G6) presented enzymatic activities 2.81-fold and 3.32-fold lower than the positive control group ($p > 0.01$), respectively. Moreover, no significant difference was observed among the nanocapsules prepared with and without the drug. On the other hand, free BD (G3) and BD-loaded nanocapsule (G4 and G6) groups showed significant decrease in this marker when compared to SDS (G1) ($p < 0.01$). Nanocapsules without drug (G5 and G7) had similar amounts of total protein compared to the same formulations with BD (G4 and G6) (Figure 4b). In this sense, our *in vitro* and *in vivo* findings suggest that the proposed formulations did not cause significant damage to the lung tissues. Moreover, it is relevant to comment that the evaluation of pulmonary acute toxicity of BD was reported for the first time.

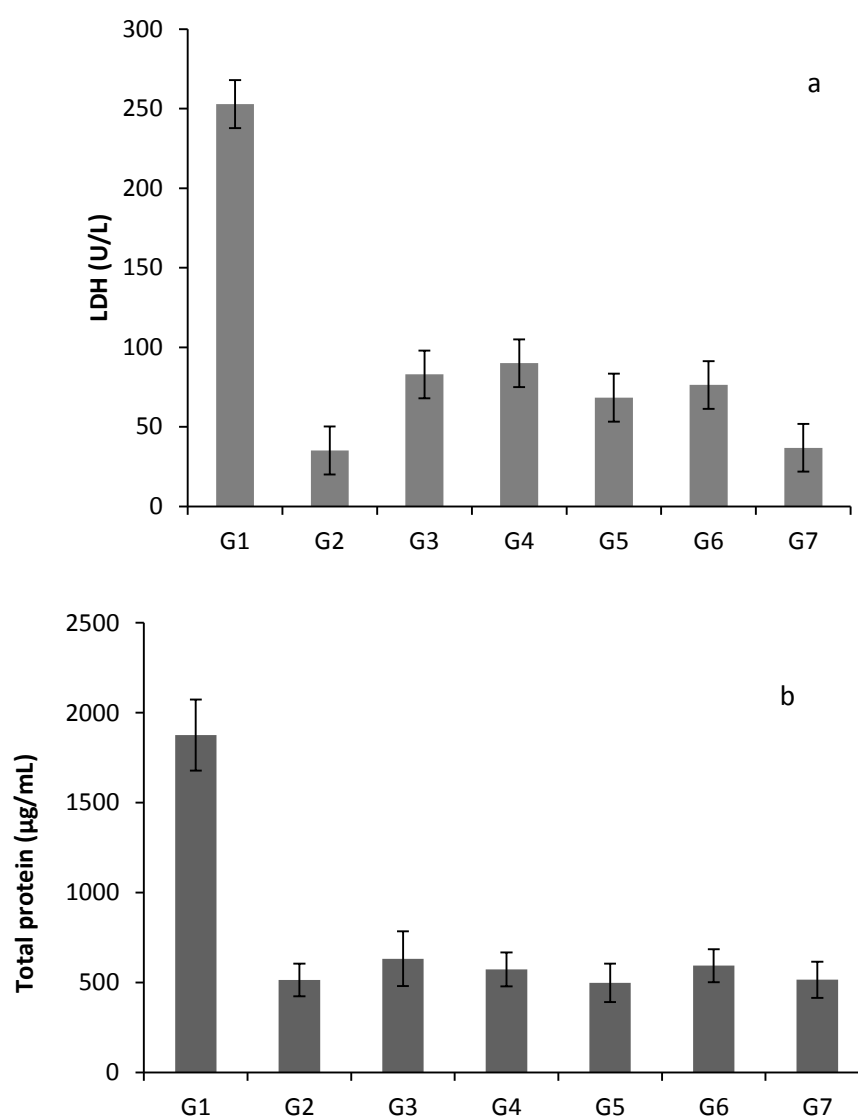


Figure 4. Lactate dehydrogenase activity (LDH) (a) and total protein content (b) in bronchoalveolar lavage fluid 4 hours after intratracheal administration of G1 (positive control group), G2 (negative control group), G3 (aqueous dispersion of BD), G4 (NC-0.5P), G5 (NC-BP), G6 (NC-0.5E) and G7 (NC-BE).

4. Conclusions

The preparation of polymeric nanocapsules containing beclomethasone dipropionate, using ethyl cellulose or poly(ϵ -caprolactone) was reported for the first time. The formulations combined adequate physicochemical characteristics with improved photostability and prolonged drug release. Moreover, both types of nanocapsules presented a good *in vitro* tolerability on 3T3 fibroblast cells and did not show acute lung toxicity in rats. Therefore, the developed nanocapsules can be considered suitable carriers to be used for beclomethasone dipropionate pulmonary delivery.

5. Acknowledgments

J.M.C. thanks CAPES for financial support.

References

- Nicolini G, Cremonesi G, Melani AS. Inhaled corticosteroid therapy with nebulized beclomethasone dipropionate. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics** v. 23, p. 145-155, 2010.
- Benedictis FM, Bush A. Corticosteroids in Respiratory Diseases in Children. **Concise Clinical Review**, v. 188, p. 12-23, 2012.
- Boobis AR. Comparative physicochemical and pharmacokinetic profiles of inhaled beclomethasone dipropionate and budesonide. **Respiratory Medicine**, v.92, p. 2-6, 1998.
- Barnes, PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. **The New England Journal of Medicine**, v.332, p.868-875, 1995.
- Trescoli C, Ward MJ. Systemic activity of inhaled and swallowed beclomethasone dipropionate and the effect of different inhaler devices. Asthma Education Centre, Kings Mill Centre for Health Care Services, p. 675-677, 1998.

Ravi Kumar, M.N.V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices.

Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 3, p. 234-258, 2000.

Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., Couvreur, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519–548, 2003.

Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari A.; Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.385, p.113–142,2010.

Rao J.P., Geckelera, K.E, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887–913, 2011.

Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456–469, 2011.

Wichert, P., Seifart, C.The lung, an Organ for Absorption? **Respiration**, v. 72, p. 552-558, 2005.

Vidgren, M., Waldrep, J., Arppe, J., Black, M., Rodarte, J., Cole, W., Knight, V. A study of ^{99m}technetium-labelled beclomethasone dipropionate dilauroylphosphatidylcholine liposome aerosol in normal volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.115, p. 209-216, 1995

Saari, M., Vigdren, M., Korkinen, M., Turjanmaa, V., Nieminen, M. Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.181, p. 1-9, 1999.

Marianecchi, C., Paolino, D., Celia, C., Fresta, M., Carafa, M., Alhaique, F. Non-ionic surfactant vesicles in pulmonary glucocorticoid delivery: Characterization and interaction with human lung fibroblasts. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p.127-135, 2010.

Jaafar-Maalej, C.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, A.. Beclomethasone-loaded lipidic nanocarriers for pulmonary drug delivery: preparation, characterization and *in vitro* drug release. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 1841-1851, 2011.

Craparo, E.F., Teresia, G., Bondi, M.L., Licciardi, M., Cavallaro, G. Phospholipid-polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, p. 135–144, 2011.

Eerikäinen, H., Kauppinen, E.I.. Preparation of polymeric nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 69–83, 2003.

Hyvonen, S., Pelon, L., Karjalainen, M., Hirvonen, J. Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly(l-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 269–281, 2005.

Cruz, L., Soares, L. U., Costa, T. D., Mezzalira, G., Silveira, N. P., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006a.

Cruz, L., Schaffazick, S. R., Dalla Costa, T., Soares, L. U., Messalira, G., Da Silveira, N. P., Schapoval, E. E. S., Pohlmann, A. R. Guterres, S. S. Physico-chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 9, p. 3154-3162, 2006b.

Couvreur P., Gillian B., Fattal E., Legrand P., Vauthier V.: Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 99-134 2002.

Fessi F., Puisieux F., Devissaguet J.P.: Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. European Patent 0274961 A1. 1988.

Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

Couvreur, C., Dubernet, F., Puisieux, controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.41,p. 2-13, 1995.

Schaffazick S.R., Freitas L.L., Pohlmann A.R., Guterres S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, p. 726-737, 2003.

Guterres, S.S., Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas Células-tronco, Terapia gênica e Nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, Cap. 17, p. 247-264, 2007.

Alves, M.P., Scarrone, A.L., Santos, M., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2007. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p.215-220, 2007.

Ourique A.F., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Beck R.C.R.: Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p.1-4, 2008.

Almeida, J.S., F. Da Ros, Bulhões, S., de Carvalho, L.O, Beck, R.C.R. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v.5, n.10, p.1603-1610, 2010.

Flores, F.C.; Ribeiro, R.F.; Ourique, A. F., Rolim, C.M.B., Silva, C.B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

Perugini, P, Simeoni, S, Scalia, S, Genta, I., Modena, T., Conti, B, Pavanetto, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p.37-45, 2002.

PUBLICAÇÃO 3: Pullulan as a stabilizer agent of polymeric nanocapsules for drug delivery

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Express Polymer Letters*

Pullulan as a stabilizer agent of polymeric nanocapsules for drug delivery

Janaíne Micheli Chassot¹, Luana Mota Ferreira¹, Felipe Pereira Gomes¹, Leandro Tasso²,
Letícia Cruz^{1*}

¹Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Institute of Biotechnology, Caxias do Sul University, Caxias do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Letícia Cruz, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105-900, Brazil.

Phone: +55 55 32209373. Fax: +55 55 32208149.

E-mail: leticiacruz@smaail.ufsm.br

Abstract

The objective of this work was to prepare poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules using pullulan as a polymeric stabilizer. Nanocapsules were prepared using the method of interfacial deposition of preformed polymers and characterized in terms of pH, average diameter, polydispersity index, zeta potential, beclomethasone dipropionate content, encapsulation efficiency, photostability, and drug release profiles. The formulations showed physicochemical characteristics consistent with nanocarriers for drug delivery: average diameter lower than 270 nm, polydispersity indexes lower than 0.2, negative zeta potential (-22.7 to -26.3 mV) and encapsulation efficiencies close to 100%. In addition, nanocapsules were able to delay the photodegradation of beclomethasone dipropionate under UVC radiation. By the dialysis bag diffusion technique, the nanocapsules were able to prolong the drug release. Thus, pullulan could be considered an interesting excipient to formulate polymeric nanocapsules.

Keywords: pullulan, nanocapsules, polymeric stabilizer, beclomethasone dipropionate

1. Introduction

Nanocapsules are colloidal drug delivery systems characterized by a liquid core surrounded by a polymeric shell [1]. The core is usually composed of liquid lipids but may also present a hydrophilic nature. In such nanostructures, the drug is confined in the core and/or adsorbed on the polymeric wale [2, 3].

The preparation of nanocapsules requires some raw materials including polymer, oil and a combination of surfactant/cosurfactant. Biodegradable polyesters such as poly(ϵ -caprolactone), poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) are commonly used [1]. Regarding the core composition, a variety of synthetic and vegetable oils are reported; however, medium chain triglycerides are the most employed due to their low toxicity and high capacity to solubilize a wide range of lipophilic drugs [4]. Oil as well as W/O cosurfactants (commonly sorbitan esters and phospholipids) are also constituents of the core. The main surfactant, in its turn, acts on the particle surface and plays a major role as stabilizer agent of nanocapsules, being poloxamer 188 and polysorbate 80 more commonly employed [1]. However, such low molecular weight and amphiphilic molecules are known to present some incompatibilities with preservatives and other raw materials. Alternatively, polymeric emulsifiers have gained much attention in the preparation of dispersed systems due to their capacity to enhance formulation stability [5].

Pullulan is an extracellular polysaccharide elaborated by the fungus *Aureobasidium pullulans*. This water-soluble biopolymer presents a linear structure composed of maltotriose repeating units connected by α -1,6 glucosidic bonds [6]. As a result of its non-toxic, non-carcinogenic and non-immunogenic properties, pullulan has been studied for pharmaceutical and biomedical applications [7]. The efficacy of pullulan as emulsifier was demonstrated in the emulsification of turmeric oleoresin [8]; however, no report on the preparation of nanoparticles using pullulan as stabilizer agent has been found. Hydrophobically modified pullulan derivatives were employed to prepare nanostructured systems [9].

In this way, the aim of this work was to prepare polymeric nanocapsules using pullulan as stabilizer in replacement of polysorbate 80, a traditional surfactant. Beclomethasone dipropionate is a corticosteroid drug widely used as anti-inflammatory agent in the topical treatment of rhinitis and asthma [10], and due to its therapeutic potential it was selected to be incorporated in nanocapsules. The developed formulation was characterized in terms of pH, particle size and polydispersity index, zeta potential, drug content, encapsulation efficiency, photostability and *in vitro* drug release.

2. Experimental

2.1. Materials

Beclomethasone dipropionate (BD) was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) was supplied by Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Sorbitan monooleate (Span 80[®]) was purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil) and Pullulan was generously gifted by Corn products (São Paulo, Brazil). Medium chain triglycerides (MCT) were obtained from Brasquim (Porto Alegre, Brazil). HPLC-grade methanol was supplied by Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). All other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

2.2. Methods

2.2.1. Analytical procedures

The experiments were performed on a LC-10A HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with a LC-20AT pump, a UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a Rheodyne valve sample manual injector with 50 μ L loop. Separation was achieved at room temperature using a RP C₁₈ Phenomenex column (250 mm x 4.60 mm, 5 μ m; 110 Å) coupled to a C₁₈ guard column. The isocratic mobile phase consisted of methanol and water (85:15 v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. BD was detected at 254 nm with a retention time of 5.9 min. The method was linear ($r=0.9993$) in the concentration range of 5.0-25.0 μ g/mL and precise (RSD<0.96% for repeatability and RSD<1.97% for intermediate precision).

2.2.2. Preparation of nanocapsule suspensions

Nanocapsules were prepared in triplicate by the interfacial deposition of preformed polymer method [10]. Two phases were prepared separately: the organic one consisted of acetone, MCT, Span 80, PCL and BD, while the other one was constituted of an aqueous dispersion of pullulan. Both phases were kept under magnetic stirring for 60 min but the organic phase was maintained at 40°C, while the aqueous phase remained at room temperature. Next, the organic phase was poured in the aqueous phase and the resulting mixture was kept under moderate magnetic stirring for 10 min. Then, the acetone and part of the water were eliminated under reduced pressure to achieve a final volume of 10 mL. For comparison purposes, the formulations were prepared without the drug (blank nanocapsules, NC-B). The quali- and quantitative composition of each formulation is displayed in Table 1.

Table 1. Quali- and quantitative composition of nanocapsule formulations.

	NC-0.5	NC-1.0	NC-B
<i>Organic phase</i>			
Acetone (mL)	27	27	27
PCL (g)	0.1	0.1	0.1
MCT (μ L)	330	330	330
BD (g)	0.005	0.010	-
Span 80 (g)	0.077	0.077	0.077
<i>Aqueous phase</i>			
Water (mL)	53	53	53
Pullulan (g)	0.077	0.077	0.077

NC-B: blank nanocapsule, PCL: poly(ϵ -caprolactone); MCT: medium chain triglycerides; BD: beclomethasone dipropionate.

2.2.3. Physicochemical characterization of nanocapsule suspensions

After preparation, formulations were evaluated considering the following characteristics: pH, particle size, polydispersity index, zeta potential, drug content and encapsulation efficiency. The pH was determined directly in the samples by using a calibrated potentiometer (pH 21 model, Hanna Instruments). Particle sizes and polydispersity indexes were measured by photon correlation spectroscopy (25°C) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments). The samples were diluted in ultrapure water prior to analysis. Zeta potential was evaluated by electrophoretic mobility (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments) after the dilution of the samples in 10 mM NaCl solution. For the determination of BD content, an aliquot of nanocapsule suspension was diluted in methanol (15 μ g/mL) and the sample was kept 10 min in an ultrasound, followed by 20 min of centrifugation. Finally, the sample was filtered through a regenerated cellulose membrane (0.45 μ m) and injected into the HPLC system. The encapsulation efficiency was evaluated by the ultrafiltration/centrifugation technique using Amicon[®] 10,000 MW devices (Millipore). The amount of 200 μ L of nanocapsule suspension was placed in the device and the centrifugation was carried out at 2200 xg for 10 min. Free drug was determined in the ultrafiltrate using the HPLC method

described above. Encapsulation efficiency (EE%) was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations (Equation 1).

$$EE\% = \frac{\text{Total drug content} - \text{Free drug content}}{\text{Total drug content}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.4. Photostability study

The photodegradation of BD incorporated into nanocapsules (NC-0.5) was studied using an UV artificial lamp (Phillips TUV lamp-UVC long life, 30 W). For comparison purposes, a methanolic solution of BD (BD-MS) and a methanolic solution of BD covered with aluminum paper (dark control) were also evaluated. The samples were placed in plastic cuvettes perfectly stoppered and then exposed to UV radiation for 5 h in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm), at a fixed distance. At predetermined times (0, 1, 2, 3, 4, and 5 h), 300 μL of the samples was withdrawn, diluted with methanol (final concentration: 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BD), and injected into the HPLC system according to the method previously described. The experiment was performed in triplicate.

2.2.5. *In vitro* drug release study

The *in vitro* release of BD from nanocapsules was evaluated by dialysis bag diffusion technique. The formulation NC-0.5 and an ethanolic solution of BD at 0.5 mg/mL (BD-ES) were placed in a dialysis bag (MWCO 10.000, Spectra Por 7), and the system was immersed in 150 mL of water with 30% of ethanol (37°C, magnetic stirring of 50 rpm) to maintain the sink conditions. At predetermined intervals, 1 mL of the dissolution medium was withdrawn and replaced by the same volume of fresh medium. The percentage of drug released was determined by the previously mentioned HPLC method. The mean calculated values were obtained from 3 replicates.

Drug release profiles were analyzed by model-dependent approaches: first order equation (Equation 2) and Power law model (Equation 3).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - [e^{-k.t}] \quad (2)$$

$$ft = \frac{M_t}{M_\infty} = a.t^n \quad (3)$$

where M_t is the amount of drug released at time t , M_∞ is the initial concentration of the drug, k is the kinetic rate constant, f_t is the ratio of absolute cumulative amount of drug released at time t and at infinite time, a is a constant incorporating structural and geometric characteristics of the carrier, and n is the release exponent, indicative of the mechanism of drug release. The fit of the experimental data to the models was performed using the Scientist 2.0 software (Micromath, USA).

2.2.6. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. GraphPad Prism Program, version 5, was the software used for the analyses of variance (ANOVA) and post-hoc multiple comparisons. The release profiles were analyzed by two-way ANOVA followed post hoc student Bonferroni test, while the results of the photostability study were analyzed by Student's t-test. In all cases, $p < 0.05$ was considered to be statically significant.

3. Results and discussion

Polymeric nanocapsules using pullulan as stabilizer agent were prepared by the interfacial deposition of PCL, a traditional method. Several attempts have been made to optimize the amount of pullulan; however, formulations prepared with concentrations lower than 0.6% precipitated at the moment of the evaporation process, while concentrations upper to 1% resulted in the formation of precipitates immediately after preparation. In this way, the formulations were prepared with 0.77% of pullulan, the same concentration generally employed to prepare PCL nanocapsules using polysorbate 80.

After preparation, nanocapsule suspensions showed a milky appearance with an opalescent bluish reflection (Tyndall effect), regardless of the presence of drug. These characteristics are in accordance with other nanocapsule systems reported in literature [1, 3]. It is important to mention that there was no formation of nanocapsules without pullulan, showing the importance of this polysaccharide for the nanocapsule preparation. Table 2 displays the physicochemical characteristics of the prepared formulations. The pH determination revealed that the samples possess values close to the neutrality, which is in accordance with other nanocapsule suspensions prepared with PCL [12, 13]. As for the evaluation of particle sizes, nanocapsules showed average diameter smaller than 270 nm. Regarding literature, polymeric nanocapsules usually have dimensions between 100-500 nm [14]. Our findings evidenced that the addition of a polymeric emulsifier did not alter the particle sizes. Furthermore, polydispersity indexes were lower than 0.2, which indicates a

narrow size distribution. Concerning zeta potential, nanocapsules showed high negative values, that is, higher than formulations prepared with polysorbate 80 (zeta potential < -12 mV). The higher the value of zeta potential (in modulus), the more stable the nanocapsule suspension due to the repulsive interactions among the particles [15]. In relation to the drug content, the formulations NC-0.5 and NC-1.0 were close to the theoretical value, with encapsulation efficiencies greater than 99%. It is relevant to comment that in previous trials PCL nanocapsules prepared with polysorbate 80 were able to incorporate only up to 0.5 mg/mL of drug, evidencing that pullulan enhanced the loading capacity of PCL nanocapsules. However, the visual monitoring of the formulations revealed that NC-0.5 is more stable than NC-1.0 along the time. For this reason, studies on the photostability and drug release profiles were performed only for NC-0.5 formulation.

Table 2. Physicochemical characteristics of nanocapsules.

Sample	Actual drug content (mg/mL)	pH	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
NC-B	-	6.6 ± 0.2	242 ± 11	0.18 ± 0.01	-26.3 ± 4.6
NC-0.5	0.49 ± 0.01	6.2 ± 0.2	270 ± 2	0.19 ± 0.02	-22.7 ± 1.4
NC-1.0	0.99 ± 0.01	6.7 ± 0.4	269 ± 2	0.20 ± 0.01	-23.1 ± 0.7

In order to evaluate the ability of PCL nanocapsules prepared with pullulan to protect BD against photodegradation, NC-0.5 samples were exposed to UVC radiation. After 5 h of exposure, approximately 19% of the initial concentration of BD associated to nanocapsules remained intact (Figure 1). On the other hand, the totality of the drug was degraded under the same experimental conditions. For the dark control, BD concentration was close to 100%, which discards the influence of chamber temperature on drug degradation.

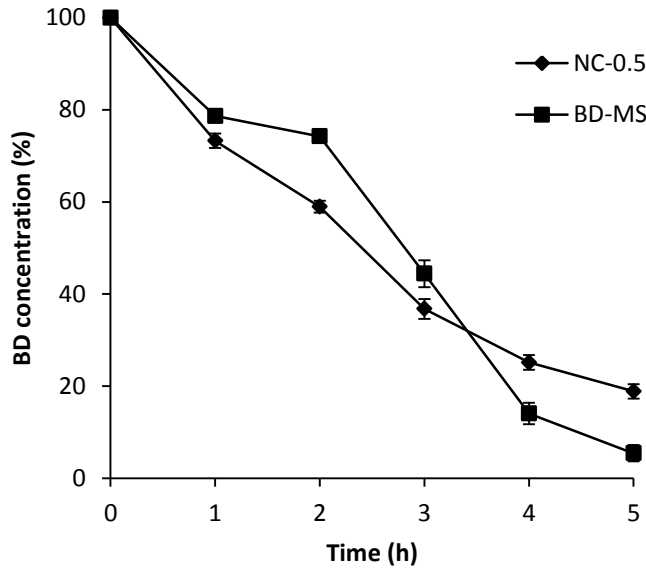


Figure 1. Beclomethasone dipropionate content of nanocapsules (NC-0.5), methanolic solution (BD-MS) under UVC radiation.

Concerning *in vitro* drug release experiments, Figure 2 shows that NC-0.5 was able to control BD release in comparison with the ethanolic drug solution. In a period of 24 h, 99.59% of the free drug was released, while 40.48% of BD was released from nanocapsules in the same period, showing the prolonged release of the nanocarrier.

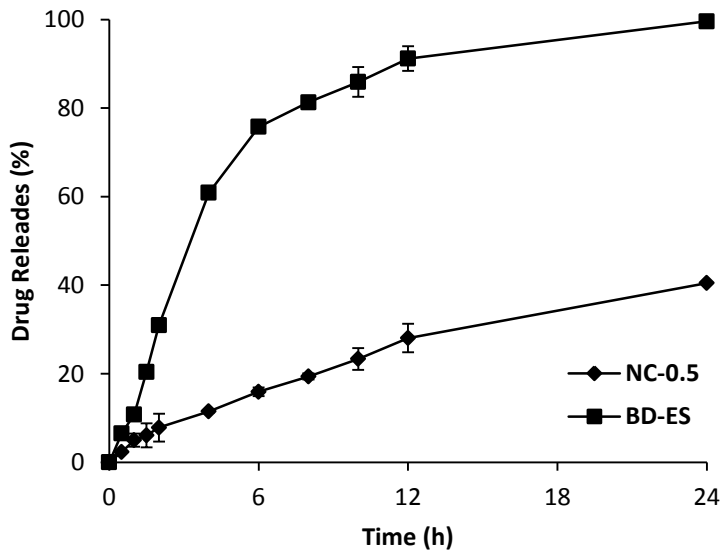


Figure 2. *In vitro* beclomethasone dipropionate release profiles from nanocapsules (NC-0.5) and ethanolic solution (BD-ES) using the dialysis bag method ($n=3$).

Mathematical modeling of drug release profiles indicated that both samples followed a first order kinetics ($r > 0.99$), which means that BD release occurred in a single step, without a rapid initial release. In relation to the drug release mechanism, the release exponent n obtained from Power law indicates that the BD release from nanocapsules is driven by anomalous transport ($n = 0.67$). According to the literature, for systems presenting spherical geometry, $n = 0.43$ indicates Fickian diffusion, while $n \geq 0.85$ is related to case II transport [16]. Values between these limits suggest anomalous transport, i.e., the drug release initially depends on the polymer relaxation followed by Fickian diffusion.

4. Conclusion

The use of pullulan as stabilizer agent for polymeric nanocapsules has been reported for the first time. The prepared formulations showed compatible features with other nanostructured systems. Results of zeta potential and drug content indicated that pullulan is an advantageous stabilizer in comparison with polysorbate 80. The photostability profiles, as well as the *in vitro* drug release suggest that nanocapsules prepared with pullulan can be considered promising drug carriers.

5. References

- [1] Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A.: Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142 (2010). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
- [2] Couvreur P., Gillian B., Fattal E., Legrand P., Vauthier V.: Nanocapsule Technology: A Review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19, 99-134 (2002). DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i2.10
- [3] Schaffazick S.R., Freitas L.L., Pohlmann A.R., Guterres S.S.: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 25, 726-737 (2003).
- [4] Preetz C., Rube A., Reiche I., Hause G., Mäder K.: Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomedicine*, 4, 106-114 (2008). DOI: 10.1016/j.nano.2008.03.003
- [5] Bobin M.F., Michel V., Martini M.C.: Study of formulation and stability of emulsions with polymeric emulsifiers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 53-58 (1999).

- [6] Singh R.S., Saini G.K., Kennedy J.F.: Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73, 515-531 (2008).
DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.01.003
- [7] Choudhary D.R., Patel V.A., Chalotiya U.K., Patel H.V., Kundawala A.J.: Natural polysaccharides as film former: A feasibility study for development of rapid dissolving films of ondansetron hydrochloride. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 78-85 (2012).
- [8] Kshirsagar A., Yenge V., Sarkar A., Singhal R.: Efficacy of pullulan in emulsification of turmeric oleoresin and its subsequent microencapsulation. XVth International Workshop on Bioencapsulation, Vienna, Au. Sept 6-8, 2007 P4-08.
- [9] Hassani L.N., Hendra F., Bouchemal K.: Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems. *Drug Discovery Today*, 17, 608-614 (2012).
DOI: 10.1016/j.drudis.2012.01.016
- [10] Brown H.M., George G.: Beclomethasone dipropionate. A new steroid aerosol for the treatment of allergic asthma. *British Medical Journal*, 1, 585-590 (1972).
- [11] Fessi F., Puisieux F., Devissaguet J.P.: Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. European Patent 0274961 A1 (1988).
- [12] Ourique A.F., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Beck R.C.R.: Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, 352, 1-4 (2008).
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.12.035
- [13] Almeida J.S., Jezur L., Fontana M.C., Paese K., Silva C.B., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Beck R.C.R.: Oil-Based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28, 165-172 (2009).
- [14] Quintanar-Guerrero D., Allémann E., Fessi H., Doelker E.: Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 1113-1128 (1998).
DOI: 10.1023/A:1011934328471
- [15] Hans M.L., Lowman A.M.: Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319-327 (2002).
DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00117-1

[16] Peppas N.A.: Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60, 110-111 (1985).

DISCUSSÃO GERAL

Sistemas nanotecnológicos, tais como as nanocápsulas poliméricas vem sendo cada vez mais estudados como alternativas promissoras para liberação de fármacos (COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). No que se refere à administração pulmonar, o interesse em sistemas nanoestruturados vem crescendo nos últimos anos (LEBHARDT et al., 2010; JAWAHAR; REDDY, 2012; KUNDA et al., 2013; MOHAMMAD et al., 2013). Devido ao tamanho reduzido destes carreadores, é possível maximizar a deposição do fármaco nas regiões mais inferiores do trato respiratório aumentando, portanto, a absorção de fármacos que apresentam problemas de biodisponibilidade. Além disso, partindo-se de uma seleção apropriada de matérias-primas para a preparação das nanocápsulas, é possível obter sistemas que proporcionem uma liberação controlada do fármaco no sítio de absorção, fato que também pode levar a um aumento da eficácia terapêutica (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). Partindo-se destas considerações, nanocápsulas poliméricas foram selecionadas para a incorporação do DB visando sua liberação pulmonar. Tais sistemas foram preparados pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. As nanocápsulas formadas por esta técnica de preparação geralmente apresentam diâmetro entre 200-500 nm, estreita largura de distribuição de tamanho e eficiência de encapsulamento elevada para fármacos lipofílicos (SCHAFFAZICK et al., 2003), como é o caso do DB.

Com fins comparativos, neste trabalho foram utilizados dois polímeros para a preparação das nanocápsulas, tendo em vista suas reconhecidas capacidades em controlar a liberação de fármacos - a etilcelulose, um derivado semissintético biocompatível da celulose, e a poli(ϵ -caprolactona), um poliéster sintético biodegradável. Com relação ao componente oleoso, dois óleos foram selecionados no início do trabalho, triglicerídeos de cadeia média e óleo de amêndoas, a fim de identificar alguma influência desta matéria-prima sobre as características das nanocápsulas. De acordo com a literatura, o componente oleoso é de extrema importância, pois é nele que ocorrerá a solubilização da substância que se pretende encapsular, sendo que a lipossolubilidade do fármaco neste meio é um fator importante para a sua capacidade de encapsulamento (SCHAFFAZICK et al., 2003). Dentre os óleos mais usados para a preparação de nanocápsulas, destacam-se os triglicerídeos de cadeia média pela questão da biocompatibilidade e pela capacidade de solubilizar uma ampla gama de

substâncias (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Avaliações prévias mostraram que, independentemente do óleo utilizado, os resultados da caracterização físico-química foram semelhantes. Além disso, os estudos de liberação *in vitro* indicaram que não houve diferença significativa no perfil de liberação em função do óleo utilizado. Assim, decidiu-se conduzir os estudos referentes ao artigo 2 utilizando-se apenas o óleo de amêndoas como núcleo oleoso das nanocápsulas.

Com a necessidade de quantificação do fármaco em diversas etapas do trabalho, tornou-se importante o desenvolvimento de um método analítico validado que permitisse o doseamento do fármaco incorporado nas nanocápsulas, necessário tanto na etapa de caracterização físico-química quanto nos experimentos de liberação *in vitro* e de fotoestabilidade. Devido ao ineditismo desta parte do trabalho, os resultados obtidos originaram o primeiro artigo da presente dissertação. No contexto deste artigo, optou-se por apresentar somente os dados obtidos para as nanocápsulas preparadas com PCL e óleo de amêndoas (NC-0.5P). Os resultados mostraram que o método de CLAE desenvolvido foi linear na faixa de concentração de 5.0-25.0 µg/mL de DB, preciso, exato (98-101%), robusto, específico. Vale ressaltar que este método demonstrou limites de detecção e quantificação adequados para as análises que foram conduzidas. O DB puro foi submetido a um ensaio de degradação forçada, o qual apresentou comportamento diferenciado dependendo das condições de estresse as quais foi submetido. Em meio básico, houve degradação significativa do DB, (aproximadamente 99%), com um pico principal adicional detectado em 3,6 min. Em meio ácido, aproximadamente, 55% de DB foi degradado e nenhum pico adicional foi detectado. Submetido a condições fotolíticas (luz UVC), o DB em solução metanólica foi degradado e não apareceram picos adicionais nos cromatogramas, indicando que os produtos de degradação não foram detectados.

Na continuação do trabalho tratou-se de avaliar as nanocápsulas de EC e PCL. Com o intuito de realizar uma análise comparativa, nanoesferas (formulações sem óleo) e nanoemulsões (formulações sem polímero) contendo DB foram preparadas. Em ambos os casos, as formulações precipitaram no momento da concentração dos solventes em rotaevaporador. Desta forma, as nanocápsulas mostraram-se sistemas adequados para a incorporação do fármaco. Uma vez que para a formação de tais estruturas vesiculares é imprescindível que o polímero seja insolúvel tanto no óleo quanto na água, testes de inchamento/dissolução de filmes de PCL e EC em óleo de amêndoas foram conduzidos e indicaram que este é adequado para compor o núcleo oleoso das nanocápsulas, visto que não foram observadas alterações nos filmes poliméricos em 60 dias de experimento.

Com relação às análises de espalhamento de luz dinâmico, ambos os grupos de nanocápsulas (EC e PCL) apresentaram tamanho de partícula na faixa nanométrica (158 – 270 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,20, o que indica uma distribuição estreita. Vale ressaltar que as nanocápsulas de EC mostraram-se mais translúcidas, característica que foi atribuída aos menores tamanhos de partícula destas formulações ($p < 0,05$). Em ambos os casos, a presença do DB não influenciou significativamente o tamanho das partículas ($p > 0,05$). Os valores obtidos estão de acordo com aqueles normalmente encontrados na literatura para estes sistemas preparados pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (SCHAFFAZICK, 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

No que diz respeito ao teor de fármaco das nanocápsulas, foi necessário otimizar a concentração do DB para cada formulação. Inicialmente, as suspensões foram preparadas tendo-se a concentração de 1,0 mg/mL de DB como referência, no entanto, nanocápsulas de PCL precipitaram imediatamente após a preparação. Diversas tentativas resultaram em uma concentração máxima de DB de 0,5 mg/mL para as formulações de PCL. Por outro lado, para as nanocápsulas preparadas com EC foi possível incorporar 1,0 mg/mL, sem precipitação do fármaco. Independentemente da concentração de fármaco, todas as formulações apresentaram teor de DB muito próximo do seu valor teórico, indicando que não houve perda ou degradação do fármaco durante o processo de preparação. Além disso, a eficiência de encapsulamento de todas as amostras foi superior a 98%, resultado atribuído à elevada lipofilia do DB que evita a sua partição na fase aquosa.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram eficiência de encapsulamento do DB superior ou igual a outros sistemas nanoestruturados reportados na literatura. Foi relatado que nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados mostraram eficiências de encapsulamento de 80-90% e 97-99%, respectivamente (JAAFAR-MAALEJ et al., 2011), enquanto que vesículas não-iônicas de polissorbato 20 e colesterol apresentaram eficiências de encapsulamento entre 15-77% (MARIANECCI et al., 2010).

Quanto à avaliação do potencial zeta, todas as amostras apresentaram valores negativos, o que é consistente com a natureza dos polímeros empregados. PCL e EC apresentam grupamentos éster e éter, respectivamente, que justificam o potencial zeta negativo das formulações. A presença do fármaco não alterou significativamente o potencial zeta das amostras ($p > 0,05$). Deve-se ressaltar que os valores de potencial zeta encontrados estão de acordo com outros trabalhos que relataram nanocápsulas preparadas com PCL e polissorbato 80, pela mesma técnica (ALVES et al., 2007; OURIQUE et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; FLORES et al., 2011). No caso de nanocápsulas de EC, não foram

encontrados registros de preparação das mesmas com este polímero a fim de possibilitar uma comparação. No entanto, um estudo recente desenvolvido por SUWANNATEEP e colaboradores (2011), relatou um potencial zeta de aproximadamente -30 mV para nanoesferas de EC contendo curcumina. Quanto ao pH, todas as amostras apresentaram valores próximos da neutralidade, o que torna as formulações compatíveis com a via pulmonar neste aspecto.

Posteriormente, foi avaliada a fotoestabilidade do DB associado às nanocápsulas. De acordo com a literatura, glicocorticoides apresentam susceptibilidade à radiação UV (ALBINI; FASANI, 2006). Os resultados deste experimento mostraram um evidente aumento na fotoestabilidade do DB, sendo este mais acentuado para as formulações preparadas com PCL. Com base na literatura, a maior fotoproteção conferida pelas suspensões de nanocápsulas de PCL ($p < 0,05$) está relacionada à semicristalinidade deste polímero, o que influenciaria a sua capacidade de refletir e espalhar a radiação UV (JIMENEZ et al., 2004). Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com outros estudos descritos na literatura, nos quais se verificou a fotoproteção proporcionada pelas nanocápsulas de PCL aos fármacos tretinoína (OURIQUE et al., 2008), clobetasol (FONTANA et al., 2009) benzofenona (PAESE et al., 2009) octilmetoxicinamato (WEISS-ANGELI et al., 2008) e resveratrol (DETONI et al., 2012). No que diz respeito à EC, apenas um trabalho foi encontrado relatando a capacidade de nanoestruturas preparadas com este polímero. Neste estudo (PERUGINI et al., 2002), o filtro químico *trans*-2-etilhexil-*p*-metoxicinamato foi incorporado em nanoesferas de PLGA ou de EC e mostrou maior fotoestabilidade frente a luz UVB nas formulações preparadas com PLGA. Entretanto, os autores não fizeram nenhuma consideração a respeito desta diferença.

A análise dos perfis de fotodegradação das amostras estudadas demonstrou que a solução do fármaco livre (BD-MS) e a nanocápsula de PCL (NC-0.5P) apresentaram cinética de reação de ordem zero, ou seja, a velocidade de reação é independente da concentração do fármaco. Neste caso, o fator limitante pode ser a solubilidade ou a absorção da luz (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Por outro lado, uma cinética de reação de primeira ordem foi verificada para as nanocápsulas de EC (NC-0.5E), ou seja, a velocidade de reação depende da concentração do fármaco. O fato das amostras apresentarem diferentes cinéticas de reação pode estar relacionado a alguns fatores, tais como os constituintes das formulações, pH, entre outros, os quais podem acelerar ou diminuir a velocidade de reação. Dentre eles, o pH, a força iônica e a constante dielétrica exercem papel importante (NUDELMAN, 1975). Cabe salientar que durante o estudo de fotoestabilidade do DB, os

cromatogramas obtidos foram monitorados quanto à pureza do pico do fármaco e o surgimento de picos adicionais. A pureza do pico foi observada para todos os tempos e amostras analisadas, o que demonstrou a especificidade do método na quantificação do DB nas amostras degradadas, de acordo com as condições experimentais utilizadas. Após a realização deste ensaio, concluiu-se que os constituintes das nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho influenciaram na proteção do DB frente à fotodegradação induzida pela radiação UVC.

O estudo da liberação *in vitro* do DB a partir das nanocápsulas foi realizado através do método de difusão em sacos de diálise. Para padronizar o meio de liberação foram testadas diferentes composições: água pura ou tampão fosfato pH 7,4 com e sem polissorbato 80 ou laurilsulfato de sódio ou polietilenoglicol. Os solventes puros não provocaram a liberação do fármaco, enquanto que a adição dos tensoativos ou do polietilenoglicol afetou o pico do fármaco no cromatograma. Na busca de um componente que favorecesse as condições *sink* e, ao mesmo tempo, não interferisse na determinação do fármaco por HPLC, chegou-se ao meio de liberação constituído por água e etanol na proporção 70:30 (v/v). Desta forma, foi possível traçar os perfis de liberação do DB em função do tempo a partir das nanocápsulas. Todas as suspensões analisadas foram capazes de controlar a liberação do DB em comparação ao fármaco puro, o qual foi completamente liberado em 24 h de experimento. NC-0.3P e NC-0.5P liberaram 100% do DB em 108 h, enquanto que NC-0.5E e NC-1.0E liberaram 100% do DB em 96 e 60 h, respectivamente. Em todos os casos, a modelagem matemática dos dados experimentais indicou que a liberação do DB a partir das nanocápsulas segue cinética de primeira ordem, sem a ocorrência de uma etapa abrupta de liberação (efeito *burst*). Este resultado confirma a elevada eficiência de encapsulamento, pois reforça a ideia de que o DB está totalmente contido no núcleo da nanocápsula ou que pelo menos parte dele está fortemente associado à membrana polimérica.

Com a finalidade de explicar o mecanismo de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas poliméricas, os dados experimentais foram ajustados ao modelo de Korsmeyer-Peppas. Todas as formulações apresentaram valores de expoente (n) entre 0,43 e 0,85, indicando que a liberação do DB ocorre por transporte anômalo (não Fickiano), o que significa que esta é controlada pelo inchamento ou erosão do polímero, seguido de difusão do fármaco para o meio externo. No trabalho de Jaafar-Maalej e colaboradores (2011), nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados foram avaliados quanto à liberação do DB pela mesma técnica, entretanto, empregando como meio de liberação laurilsulfato de sódio 0,55 mM. Dependendo da composição das nanopartículas

lipídicas sólidas, um máximo de 20% de liberação foi alcançado em 16 dias de experimento, enquanto que os carreadores lipídicos nanoestruturados chegaram a alcançar 77% de liberação do fármaco para o mesmo tempo de experimento. Em todos os casos, o mecanismo de liberação sugerido foi difusão fickiana devido aos elevados coeficientes de correlação obtidos para o modelo de Higuchi neste trabalho.

Para a avaliação da toxicidade das nanocápsulas poliméricas contendo DB (NC-0.5P e NC-0.5E), foram realizados dois ensaios. Primeiramente o ensaio *in vitro* e posteriormente o ensaio *in vivo*. Como não há dados na literatura sobre a toxicidade do DB puro, realizaram-se os mesmos ensaios para o fármaco isolado.

A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em células 3T3 (linhagem de fibroblastos obtida de tecido embrionário de camundongos *Swiss*) e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT, o qual avalia a função mitocondrial da célula. Tanto o DB puro, quanto o nanoencapsulado não apresentaram atividade citotóxica significativa ($p < 0,05$) para as concentrações de 1 e 10 μM de fármaco, em comparação aos controles DMSO e nanocápsulas sem DB. Este resultado mostra-se muito positivo, uma vez que as formulações foram colocadas em contato direto com células fibroblásticas e mesmo assim a viabilidade celular foi elevada. Marianecci e colaboradores (2010) avaliaram a citotoxicidade do DB em fibroblastos primários de pulmão humano de vesículas não-iônicas visando a liberação pulmonar do DB. Neste estudo, foram testadas concentrações de 0,01 a 1 μM e nestas condições as formulações não foram consideradas citotóxicas. Apesar da facilidade de execução e interpretação dos resultados, os testes *in vitro* não avaliam o efeito das formulações no organismo como acontece em um experimento *in vivo*. Assim, decidiu-se conduzir um estudo de toxicidade aguda em ratos *Wistar*.

Quatro horas após a instilação intratraqueal das formulações, o fluido de lavagem broncoalveolar foi analisado quanto à presença de marcadores de dano celular, como a enzima desidrogenase láctica (DHL) e conteúdo de proteínas totais. A escolha do método baseou-se no fato de que este está entre os mais utilizados para avaliação da toxicidade de materiais inaláveis (HENDERSON, 2005). As formulações NC-0.5P e NC-0.5E apresentaram níveis de DHL e proteínas totais significativamente menores em relação ao controle-positivo, dodecilsulfato de sódio ($p < 0,01$). Cabe mencionar que a princípio seria avaliada a toxicidade das formulações NC-0.5P e NC-0.5E, além de suas respectivas formulações brancas. Entretanto, como não foram encontrados registros na literatura sobre a avaliação da toxicidade pulmonar *in vivo* do DB, optou-se por avaliá-lo paralelamente. Da mesma forma como o observado para as nanocápsulas, o fármaco não induziu toxicidade nos modelos testados,

confirmando que o DB apresenta baixa toxicidade pela via pulmonar. Outro aspecto que deve ser salientado, diz respeito à dose de fármaco testada. O estudo *in vivo* foi conduzido com a dose de DB de 0,3 mg/Kg, sendo esta cerca de 10 vezes superior à dose clínica. Portanto, mesmo com uma dose elevada, as formulações apresentaram uma boa performance no teste *in vivo*.

A última parte deste trabalho consistiu na proposição do pullulan para a preparação de nanocápsulas de PCL. Tendo em vista que estas formulações apresentaram um teor máximo de DB de 0,5 mg/mL, hipotetizou-se que a substituição do polissorbato 80 por este polissacarídeo poderia ser vantajosa baseado em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa com outros fármacos (dados não publicados). Assim, as avaliações mostraram que foi possível empregar o pullulan como um agente estabilizador das nanocápsulas, pois as formulações apresentaram características compatíveis com sistemas nanoestruturados empregados na liberação de fármacos. Comparando-se esta formulação com as outras desenvolvidas neste trabalho (NC-0.5P e NC-0.5E) pode-se observar um potencial zeta mais elevado, o que sugere um sistema mais estável, e um teor de fármaco mais elevado quando se compara com a formulação de PCL. No que diz respeito às nanocápsulas de pullulan, estas foram capazes de proteger o DB frente à degradação UVC, visto que 19% do DB não sofreu degradação, enquanto que o DB não encapsulado foi quase totalmente degradado (5% DB). Apesar da maioria dos resultados serem positivos, outras avaliações devem ser feitas a fim de propor esta formulação para a liberação pulmonar do DB.

CONCLUSÕES

- A metodologia analítica, para a quantificação do dipropionato de beclometasona nas nanocápsulas poliméricas, foi desenvolvida e validada, a qual provou ser específica, linear, precisa, exata e robusta. Esta pode ser aplicada para o estudo de estabilidade e cinética de degradação do dipropionato de beclometasona em nanocápsulas poliméricas;
- Utilizando o método de precipitação do polímero pré-formado foi possível preparar nanocápsulas poliméricas com os polímeros etilcelulose e poli(ϵ -caprolactona);
- A substituição do polissorbato 80 pelo pullulan na preparação de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) mostrou-se vantajosa, pois as formulações preparadas com o polissacarídeo apresentaram teor de fármaco e potencial zeta mais elevados, o que sugere maior estabilidade deste sistema;
- Todas as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho apresentaram características físico-químicas adequadas e compatíveis com outros sistemas nanoestruturados relatados na literatura;
- As nanocápsulas poliméricas foram capazes de aumentar a fotoestabilidade do dipropionato de beclometasona frente à luz UVC quando comparadas ao fármaco não-encapsulado;
- Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que as nanocápsulas foram capazes de controlar a liberação do dipropionato de beclometasona por transporte anômalo, seguindo cinética de primeira ordem;
- Através da avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células 3T3, foi demonstrado que as formulações NC-0.5P e NC-0.5E apresentaram viabilidade celular comparável a do controle;
- A avaliação *in vivo* da toxicidade pulmonar indicou que as formulações NC-0.5P e NC-0.5E não causaram toxicidade aguda em ratos. Desta forma, os resultados sugerem que as nanocápsulas poliméricas são promissores carreadores para a liberação pulmonar do dipropionato de beclometasona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANI, A.; FASANI, A. Photochemistry of drugs: An overview and practical problems. **Drugs: Photochemistry and Photostability**, p.1-72, 2006.

ALMEIDA, J.S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L.O.S.; CARVALHO, L.M.; BECK, R.C.R. Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168-172, 2004.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distributio of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

ANTI, S. M. A; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Steroidal antiinflammatory drugs: glucocorticoid. **Einstein**, v. 6, n. 1, p.159-165, 2008.

BRASIL, ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, RE 899, Brasil, 2003.

BARNES, E. J. Inhaled glucocorticoids for asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 868-875, 1995.

BARRATT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BATAVIA, R.; TAYLOR, K.; CRAIG, D.; THOMAS, M. The measurement of beclomethasone dipropionate entrapment in liposomes: a comparison of a microscope and an HPLC method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 109-119, 2001.

BATEMAN, E.D.; HURD, S.S.; BARNES, P.J.; BOUSQUET, J.; DRAZEN, J.M.; FITZ GERALD, M.; GIBSON, P.; OHTA, K.; O'BYRNE, P.; PEDERSEN, S.E. Global strategy for asthmamanagement and prevention: GINA executive summary. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 143-178, 2008.

BENEDEDICTS, F.M.; BUSH, A. Corticosteroids in Respiratory Diseases in Children. **Concise Clinical Review**, v. 188, n. 1, p. 12-23, 2012.

BOOBIS, A. R. Comparative physicochemical and pharmacokinetic profiles of inhaled beclomethasone dipropionate and budesonide. **Respiratory Medicine**, v.92, p. 2-6, 1998.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A.A.; DENBURG, J.; FOKKENS, W.J.; TOGIAS, A. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 63, Suppl 86:8-160, 2008.

BROWN, H.M.; STOREY, G; GEORGE, W.H.S. Beclomethasone dipropionate. A new steroid aerosol for the treatment of allergic asthma. **British Medical Journal**, v. 1, p. 585-590, 1972.

CARAFÀ, M.; DI MARZIO, L.; MARIANECCI, C.; CINQUE, B., LUCANIA, G.; KAJIWARA, K.; CIFONE, M. G.; SANTUCCI, E. Designing novel pH-sensitive non-phospholipid vesicles: characterization and cell interaction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 385–393, 2006.

CHENG, K.; DEMIRCI, A.; CATCHAMARK, J.M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 92-99, 2011.

CIPOLLA, D.C.; GONDA, I. Formulation technology to repurposed drugs for inhalation delivery. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 8, n. 3–4, p. 123-130, 2011.

COLE, C.H.; SHAH, B.; ABBASI, S.; DEMISSIE, S.; MACKINNON, B.; COLTON, T.; FRANTZ, I.D. Adrenal function in premature infants during inhaled beclomethasone therapy. **The Journal of Pediatrics**, v. 135, p. 65-70, 1999.

COLICE, G.L.; DERENDORF, H.; SHAPIRO, G.G. Inhaled corticosteroids: Is there an ideal therapy. **Synergy Medical Education**, 2004. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewprogram/2917>>. Acesso em: 25 ag. 2011.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

CRAPARO, E.F.; TERESIA, G.; BONDI, M.L.; LICCIARDI, M.; CAVALLARO, G. Phospholipid–polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, p. 135–144, 2011.

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, 198-205, 2006.

CRYAN, S. A.; SIVADAS, N.; GARCIA-CONTRERAS, L. *In vivo* animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.1133-1151, 2007.

DALEY-YATES, P.T.; PRICE, A.C.; SISSON, J.R.; PEREIRA, A.; DALLOW, N. Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, p. 400-409, 2001.

DARWIS, Y.; KELLAWAY, I.W. Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 113-121, 2001.

DECRAMER, M.; RENNARD, S.; TROOSTERS, T.; MAPEL, D.W.; GIARDINO, N.; MANNINO, D.; WOUTERS, E.; SETHI, S.; COOPER, C.B. COPD as a lung disease with systemic consequences-clinical impact, mechanisms, and potential for early intervention. **Chronic obstructive pulmonary disease**, v. 5, p. 235- 256, 2008.

DRENT, M.; COBBEN, N. A. M.; HENDERSON, R. F.; WOUTERS, E. F. M.; DIEIJEN-VISSER, M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 9, p. 1736-1742, 1996.

DETONI, B. C.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913-921, 2012.

EERIKÄINEN, H.; KAUPPINEN, E. I. Preparation of polymeric nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p.69-83, 2003.

ENGSTROM, C.P.; PERSSON, L.O.; LARSSON, S.; RYDÉN, A.; SULLIVAN, M. Functional status and well being in chronic obstructive pulmonary disease with regard to clinical parameters and smoking: a descriptive and comparative study. **Thorax**, v. 51, p. 825-830, 1996.

FARMACOPÉIA AMERICANA, The United States Pharmacopeial Convention. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852. 2009.

FARMACOPÉIA BRITÂNICA, Londres: Her Majesty. Stationary Office; v. 1, 2010.

FENG, H.; ZHANG, L.; ZHU, C. Genipin crosslinked ethyl cellulose–chitosan complex microspheres for anti-tuberculosis delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 103, p. 530-537, 2013.

FESSI, H.; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. European Patent 0274961 A1, 1988.

FRANÇA, F. F. DE A. C. DE; KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Edição 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructure system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254, 2009.

FLORES, F.C.; **Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia***: desenvolvimento de formulações e atividade biológica, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R.K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 6, p. 324–333, 2010.

GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7, p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S.S.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas Células-tronco, Terapia gênica e Nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, Cap. 17, p. 247-264, 2007.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319-327, 2002.

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

HUANG., Y.; WAN, C. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 9-14, 2006.

HYVÖNEN, S.; PELTONEN, L.; KARJALAINEN, M.; HIRVONEN, J. Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly(l-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 269-281, 2005.

JAAFAR-MAALEJ, C.; ANDRIEU, V.; ELAISSARI, A.; FESSI, A. Beclomethasone-loaded lipidic nanocarriers for pulmonary drug delivery: preparation, characterization and *in vitro* drug release. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 1841-1851, 2011.

JÄGER, E.; VETURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMAN, A. R. Sustained release from lipid core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface areas. **Journal of Biomedicine and Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JAWAHAR, N.; REDDY, G., Nanoparticles: A novel pulmonary drug delivery system for tuberculosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 8, p. 1901-1906, 2012.

JIMENEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.

KATZUNG B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KUMAR, M.N.V.R. Nano and Microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 234-258, 2000.

KUNDA, N.K.; SOMAVARAPU, S.; GORDON, S.B.; HUTCHEON, G.A.; SALEEM, I.Y. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 325-341, 2013.

KSHIRSAGAR, A; YENGE, V.; SARKAR, A.,SINGHAL, R.: Efficacy of pullulan in emulsification of turmeric oleoresin and its subsequent microencapsulation. XVth International Workshop on Bioencapsulation, Vienna, Au. Sept 6-8, p. 4-8, 2007.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588-599, 2003.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na Indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LEBHARDT, T.; ROESLER, S.; BECK-BROICHSITTER, M.; KISSEL, T. Polymeric nanocarriers for drug delivery to the lung. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 171-180, 2010.

MANUAL FARMACOTERAPEUTICO, Serviço de Farmácia, Hospital Samaritano, São Paulo, 5. Ed., 2009. Disponível em:
<http://espacom medico.samaritano.org.br/ServicosTecnicos/Farmacia/Documents/manual_far macoterapeutico.pdf>Acesso em: 20 jun. 2011.

MAK, J.C.; BARNES, P. J. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lungs. **American Review of Respiratory Disease**, v. 141, n. 6, p. 1559-6, 1990.

MARIANECCI, C.; PAOLINO, D.; CELIA, C.; FRESTA, M.; CARAFA, M.; ALHAIQUE, F. Non-ionic surfactant vesicles in pulmonary glucocorticoid delivery: Characterization and interaction with human lung fibroblasts. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 127-135, 2010.

MELCHOR, R.; BIDDISCOMBE, M.F.; MAK, V.H.; SHORT, M.D.; SPIRO, S.G. Lung deposition patterns of directly labelled salbutamol in normal subjects and in patients with reversible airflow obstruction. **Thorax**, v. 48, n. 5, p. 506-511, 1993.

MOAZENI, E.; GILANI, K.; SOTOUDEGAN, F.; PARDAKHTY, A.; NAJAFABADI, A.R.; GHALANDARI, R.; FAZELI, M.R.; JAMALIFAR, H. Formulation and *in vitro* evaluation of ciprofloxacin containing niosomes for pulmonary delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 7, p. 618-627, 2010.

MOHAMMAD, A.K.; AMAYREH, L.K.; MAZZARA, J.M.; REINEKE, J. Rapid Lymph Accumulation of Polystyrene Nanoparticles Following Pulmonary Administration. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 424-434, 2013.

MONTASSER, I.; BRIANÇON, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Méthodes d' obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 55, n. 6, p. 155-167, 2000.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-167, 2000.

NEWMAN, S.P.; PAIVA, D.; MOREN, F.; SHEAHAN, N.F.; CLARKE, S.W. Deposition of pressurised aerosols in the human respiratory tract. **Thorax**, v. 36, p. 52-55, 1981.

NICOLINI, G.; CREMONESI, G.; MELANI, A.S. Inhaled corticosteroid therapy with nebulized beclomethasone dipropionate. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics** v. 23, p. 145-155, 2010.

NIMESH, S.; MACHANDA, R.; KUMAR, R.; SAXENA, A.; CHAUDARY P.; YADAV, V.; MOZUNDAR, S.; CHANDRA, R. Preparation, characterization and *in vitro* drug release studies of novel polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 146-152, 2006.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.p. 6-10; 45-61; 78-89.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoinloaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and *in vitro* antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 214-223, 2010.

PAESE, K.; JAGER, A.; POLETTO, F. S.; FONSECA, E. P.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid formulation containing nanoencapsulated sunscreen: Effectiveness, *in vitro* photostability and immune response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 240-246, 2009.

PATTON, J. S. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 19, p. 3-36, 1996.

PATTON, J. S.; FISHBURN, C. S.; WEERS, J. G. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, p. 338-344, 2004.

PATTON, J. S. Unlocking the opportunity of tight glycaemic control. Innovative delivery of insulin via the lung. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 5-8, 2005.

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 67-74, 2007.

PAULUHN, J. Inhalation toxicology: Methodological and regulatory challenges. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, p. 111-124, 2008.

PERUGINI, P., SIMEONI, S., SCALIA, S., GENTA, I., MODENA, T., CONTI, B. PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 37-45, 2002.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polymeric Micro and Nanoparticles as Drug Carriers. In: DUMITRIU, Segunda Edição. Polymeric Biomaterials, New York: Marcel Dekker, 1994. Cap. 16.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RAVI KUMAR, M.N.V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

ROBLOT-TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Some Physicochemical Properties of Polyalkylcyanoacrylate Nanospheres and Nanocapsules. **Chimica oggi**, p. 37-39, 1988.

ROHATAGI, S.; DERENDORF, H.; ZECH, K.; NAVE, R.; BANERJI, D. PK/PD of inhaled corticosteroids: the risk/benefit of inhaled ciclofenilol. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, Suppl.2, S218, 2003.

SAARI, M.; VIDGREN, M.; KOSKINEN, M.; TURJANMAA, V.; NIEMINEN, M. Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, p. 1-9, 1999.

SAARI, M. Pulmonary Deposition and Clearance of ^{99m}Tc-labelled beclomethasone liposomes in healthy subjects and in mild and severe asma. **Academis Dissertation, Medical School of the University of Tampere**, 2003.

SAKAGAMI, M. *In vivo*, *in vitro* and *ex vivo* models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1030-1060, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEVILLE, P. C.; LI, H.Y.; LEAROYD, T. P. Spray-dried powders for pulmonary drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 24, n.4, p. 307-360, 2007.

SINHA, B.; MUKHERJEE, B.; PATTNAIK, G. Poly-lactide-co-glycolide nanoparticles containing voriconazole for pulmonary delivery: *in vitro* and *in vivo* study. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, p. 94-104, 2013.

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

SUBBARAO, P.; MANDHANE, P. J.; SEARS, M. R. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. **Canadian Medical Association Journal**, v. 181, n. 9, p. 181-190, 2009.

SUWANNATEEP, N.; BANLUNARA, W.; WANICHWECHARUNGRUAN, A.P.; CHIABLAEM, K.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SVASTI, J. Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomachmucosa and release of curcumin into the circulation. **Journal of Controlled Release**, v. 151,p.176–182, 2011.

THOMPSON, M; ELLISON, SLR; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technocal report) **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002.

TRAINI, D.; SCALIA, S.; ADIC, H.; MARANGONIA, E.; YOUNG, P.M. Polymer coating of carrier excipients modify aerosol performance of adhereddugs used in dry powder inhalation therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 438, p. 150-159, 2012.

TRESCOLI, C.; WARD, M.J. Systemic activity of inhaled and swallowed beclomethasone dipropionate and the effect of different inhaler devices. Asthma Education Centre, Kings Mill Centre for Health Care Services, p. 675-677, 1998.

VIDGREN, M.; WALDREP, J.; ARPPE, J.; BLACK, M.; RODARTE, J.; COLE, W.; KNIGHT, V. A study of ^{99m}technetium-labelled beclomethasone dipropionate dilauroylphosphatidylcholine liposome aerosol in normal volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.115, p. 209-216, 1995.

VON WICHERT, P; SEIFART, C. The lung, an organ for absorption? **Respiration**, v. 72, n. 5, p. 552-558, 2005.

WALDREP, J.; SCHERER, P.; HESS, G.; BLACK, M.; KNIGHT, V. Nebulized glucocorticoids in liposomes: aerosol characteristics and human dose estimates. **Journal of Aerosol Medicine**, v.7, p. 135-145, 1994.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F. S.; ZANCAN, L. R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containingquercetindelayed the photodegradation of both components under ultraviolet a radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456–469, 2011.

XIAOYAN, Y.; YONGJUN, L.; CHUNXI, L.; NA, Z. Biodegradable Solid Lipid Nanoparticle Flocculates for Pulmonary Delivery of Insulin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 834-842, 2012.

ZHANG, Q.; KUSAKA, Y.; ZHANG, Q.; HE, L.; ZHANG, Z.; SATO, K. Dynamic changes of constituents in bronchoalveolar lavage fluid in experimental silicotic rats. **Industrial Health**, v. 34, p. 379-388, 1996.