

Rita de Moura e Sá Cunha

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2009

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

Rita de Moura e Sá Cunha

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2009

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

Rita de Moura e Sá Cunha

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciada em Ciências Farmacêuticas.

Glossário

Siglas

ACI – Andersen Cascade Impactor

CFC – Clorofluorcarbonetos

DPI – Dry Powder Inhaler

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DPR – Desvio Padrão Relativo

FPD – Fine Particle Dose

FPF – Fine Particle Fraction

FR – Fase Reversa

GSD – Desvio Padrão Geométrico

HFC – Hidrofluorcarbonetos

HMWP – High Molecular Weight Protein

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ISD – Insulin Spray Dried

MDI – Metered Dose

MMAD – Diâmetro Aerodinâmico de Massa Média

SEM – Scanning Electron Microscopy

USP – United States Pharmacopoeia

Sumário

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de uma formulação de insulina para administração pulmonar, que poderá ser uma alternativa válida à administração injectável pós prandial em pacientes com diabetes devido não só ao seu melhor perfil farmacocinético, mas também por ser uma via de administração menos invasiva. Foi explorado neste trabalho um sistema inalatório de pó seco (Dry Powder Inhaler – DPI) preparado de modo a que a insulina atinja a região alveolar, que não contem propelentes como CFC ou HFC. Mais especificamente, foram produzidos vários lotes deste péptido em pó sem a adição de excipientes através da técnica de Spray Drying a partir de uma solução ácida de insulina.

Estes sistemas foram devidamente caracterizados e as propriedades aerodinâmicas em termos de respirabilidade e fracção de partículas finas foram avaliadas. O dispositivo Turbospin® (Ph&T, MI, Italy) de dose única de “pó seco inalável” foi o escolhido para aerosolizar e administrar o pó de insulina.

A estabilidade química foi estudada armazenando o pó em diferentes condições de temperatura/humidade (25°C 60% U.R.; 2-8°C), sendo analisadas as amostras em tempos diferentes por HPLC de acordo com métodos descritos na Farmacopeia Europeia (5ª Edição) e na USP 29.

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, carinho e paciência que demonstraram ao longo de todo o meu percurso acadêmico.... e em toda a minha vida.

À minha irmã e à Matilde também por todo o apoio que ofereceu e por ter partilhado tantos momentos comigo durante este percurso! Saudades das conversas na hora do estudo...

Ao meu Avô Cunha e Avó Linda, apoiantes incondicionais na minha vida, por toda a experiência de vida transmitida... e por transmitir!

À minha Tia Mena e primo Zé Pedro, pela porta aberta em todas as fugas! Pela paciência, compreensão e carinho em todos os momentos da minha vida!

Ao Juca, por toda a ternura, paciência e confiança depositada em mim!

Às minhas amigas, pela presença constante e amizade incondicional.

Ao Professor Pedro Barata, pela preocupação desde o início, pela oportunidade, pela compreensão e por toda a ajuda disponibilizada.

Índice

I. Introdução	13
1. Vias de Administração de Fármacos Proteicos	14
1.1. Administração Oral	14
1.2. Administração Nasal	14
1.3. Administração Bucal	15
1.4. Administração Transdérmica	15
1.5. Administração Ocular	16
1.6. Administração Rectal	16
1.7. Administração Pulmonar	17
2. Insulina	18
3. Factores que Influenciam a Deposição Pulmonar de Fármacos Proteicos	22
3.1. Tamanho da Partícula	22
3.2. Densidade	24
3.3. Forma	24
II. Método Analítico de Doseamento de Insulina	26
2.1. Validação do Método Analítico para o Doseamento de Insulina por HPLC	26
2.2. Determinação A21 e Split	28
2.3. Cromatografia de Exclusão de Tamanho – HPLC	29
III. Produção de Insulina pelo Processo “Spray Drying”	31
IV. Caracterização do Pó	33
4.1. Morfologia do Pó “Spray Dried” por SEM	33
4.2. Análise Dimensional de Difracção por Laser	34
4.3. Avaliação Aerodinâmica por Andersen Cascade Impactor	35

Produção de Formas Farmacêuticas Contendo Insulina para Administração Pulmonar

4.4. Estabilidade	40
4.4.1 Conteúdo em Insulina %	41
4.4.2. Massa Proteica de Elevado Peso Molecular (HMWP)	42
4.4.3. Análise de Degradação Split	44
V. Conclusão	48
VI. Bibliografia	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores de DPR% da solução de insulina (n=6 injeções)	27
Tabela 2 - Gradiente de eluição	28
Tabela 3 - Análise dos produtos de degradação da insulina como matéria-prima	29
Tabela 4 - Composição qualitativa e quantitativa do pó preparado pela técnica “Spray Drying” e as condições operativas adotadas	31
Tabela 5 - Tamanho das partículas de insulina enquanto matéria-prima e após o processo “Spray Drying” . Dv 0.1, dv 0.5 e dv 0.9 representam o diâmetro das partículas a 10, 50 e 90% na curva cumulativa	34
Tabela 6 - Parâmetros aerodinâmicos da insulina para inalação por “Spray Drying”	37
Tabela 7 - Conteúdo (%) de insulina no pó “Spray Dried” armazenado a 25° C ao longo do tempo	40
Tabela 8 - Conteúdo (%) de insulina no pó “Spray Dried” armazenado a 5° C ao longo do tempo	40
Tabela 9 - Conteúdo dos produtos de agregação covalente (dímeros) no pó de insulina “Spray Dried” a 25° C	41
Tabela 10 - Conteúdo dos produtos de agregação covalente (dímeros) no pó de insulina “Spray Dried” a 5° C	41
Tabela 11 – Produtos de degradação (%) a 25° (Insulina, A 21 e Split) no pó de insulina “Spray Dried”	43
Tabela 12 - Produtos de degradação (%) a 5° (Insulina, A 21 e Split) no pó de insulina “Spray Dried”	44

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Efeito do tamanho da partícula na deposição das partículas do aerossol no tracto respiratório na sequência de uma inalação lenta e uma suspensão do fôlego por 5 segundos .23	
Gráfico 2 - Curva de calibração do HPLC da amostra de insulina. Pico da área versus concentração da solução padrão da insulina 27	27
Gráfico 3 - HPLC de FR da insulina e respectivos produtos de degradação 29	29
Gráfico 4 - Cromatograma de insulina por HPLC por exclusão de tamanhos e respectivos produtos de degradação 30	30
Gráfico 5 - Distribuição dimensional (%) de insulina “Spray Dried” lote 5207 em ACI 39	39
Gráfico 6 - Distribuição dimensional (%) de insulina “Spray Dried” lote 1307 em ACI 39	39
Gráfico 7 - Distribuição dimensional (%) de insulina “Spray Dried” lote 91007 em ACI 40	40
Gráfico 8 - Produtos de degradação de HMWP no tempo do lote 5207 43	43
Gráfico 9 - Produtos de degradação de HMWP no tempo do lote 1307 43	43
Gráfico 10 - A 21 e produtos de degradação de Split no tempo do lote 5207 (a linha representa limite de degradação da USP) 46	46
Gráfico 11 - A 21 e produtos de degradação de Split no tempo do lote 1307 (a linha representa limite de degradação da USP) 46	46
Gráfico 12 - A 21 e cromatograma do Split do lote ISD 1307 a tempo zero 47	47
Gráfico 13 - A 21 e cromatograma do Split do lote ISD 1307 a 25°60% R.H. após 6 meses..47	47
Gráfico 14 - A 21 e cromatograma do Split do lote ISD 1307 a 5°60% R.H. após 6 meses ...47	47

Índice de Figuras

Figura 1 – Mini Spray – Dryer	31
Figura 2 – Imagens de insulina como matéria prima analisadas através de SEM	33
Figura 3 – Microfotografia de insulina após técnica de “Spray Drying” (Lote ISD1307)	33
Figura 4 - Turbospin [®] . Ph&T Millano	36
Figura 5 – ACI	36

I. Introdução

A terapia proteica representa uma classe terapêutica promissora, e como classe, representa a cota do mercado com maior expansão no que diz respeito a medicina humana. O seu particular potencial prende-se com a sua elevada especificidade, podendo assim ser usada em doses mais baixas e com menores efeitos laterais. Em virtude de terem carga, da sua elevada dimensão e serem hidrofílicas, as proteínas são apresentam problemas de permeabilidade. Torna-se frequentemente necessário adicionar promotores à formulação proteica. Estes promotores foram estudados de modo a serem usados em administração nasal, pulmonar e transdérmica de fármacos. No entanto para todos os promotores, levantam-se problemas no que diz respeito a toxicidade e imunogenicidade (Moeller et al., 2008).

O método típico de administração de fármacos como a insulina, continua a ser a via subcutânea ou endovenosa de uma solução ou suspensão, não sendo de todo a melhor solução para os pacientes devido não só o incomodo das injeções diárias, ao stress psicológico, à dor, aos custos, riscos de infecção, à dificuldade de manusear a insulina e à deposição local da insulina que pode levar a hipertrofia e deposição de gordura no local da injeção. A realidade da administração de insulina por uma via que não a via subcutânea, está cada vez mais atractiva, em grande parte devido às inerentes vantagens anatómicas. Pacientes relutantes à aceitação do tratamento com injeções de insulina, privilegiaram esta escolha. Deste modo, vai ser facilitado o início do tratamento da doença com insulina, havendo portanto um melhor controlo da concentração de insulina, melhorando assim a qualidade de vida destes pacientes. Maior cumprimento de regras é importante na diminuição de graves e debilitantes efeitos a longo termo de diabetes mal controladas (Khafagy et al., 2007).

Algumas das vias de administração promissoras e ainda sob investigação serão agora brevemente descritas.

1. Vias de Administração de Fármacos

1.1. Administração Oral

O maior desafio para administração de proteínas continua a ser sem dúvida a via oral, apesar de representar, tanto para péptidos como para proteínas grande dificuldade mas de elevado potencial. As maiores dificuldades nesta via de administração prendem-se com a passagem de proteínas para o intestino, de modo a evitar a degradação enzimática, permear o epitélio intestinal e escapar a mecanismos de efluxo. As estratégias tecnológicas passam por maximizar a biodisponibilidade da insulina oral, ultrapassar barreiras e desenvolver terapias que sejam seguras e eficazes. O uso de promotores para administração oral de proteínas é comum, uma vez que melhoram a absorção da substância activa por aumentar o seu transporte paracelular e transcelular. O sucesso na administração de insulina por via oral, iria melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas, cujo quotidiano passa por várias injeções (Moeller et al., 2008; Khafagy et al., 2008).

1.2. Administração Nasal

Trata-se de uma via de administração com menores exigências a nível tecnológico do que a via pulmonar. Podem ser usadas umas simples gotas nasais ou um spray nasal, e neste caso específico, o tamanho das partículas não é de maior relevância. O epitélio nasal possui uma área de permeação de aproximadamente 150 cm^2 , sendo o seu tamanho determinante para a dose administrada por esta via. Em termos de introdução de mercado, está restrito a péptidos tais como a desmopressina (conhecido anti-diurético), contendo apenas agentes conservantes com uma biodisponibilidade de aproximadamente 3-10%. Este valor pode ser aumentado com sistemas de administração mais avançados, especialmente com a adição de agentes promotores que modulem a permeabilidade do epitélio. A insulina, é a proteína mais estudada no que diz respeito ao desenvolvimento desta via de administração. (Por exemplo, a CPEX Pharmaceuticals, New Hampshire, está na fase II de um estudo clínico que utiliza a uma emulsão líquida de insulina para administração nasal (Moeller et al., 2008), que até à data está com uma taxa de elevado sucesso e sem graves efeitos adversos em mais de 100 ensaios clínicos.

1.3. Administração Bucal

Esta via de administração é bastante referenciada para pequenas entidades químicas, sendo menos estudada para terapia com proteínas. Apesar do epitélio da boca ser de fácil acesso, a porção não queratinizada é relativamente pequena (aproximadamente 100 cm²). A administração através desta via é menos exigente do que outras no que diz respeito a formulação e planeamento, e permite uma passagem directa para a circulação sistémica, evitando assim o efeito de primeira passagem a nível hepático, o que aumenta a biodisponibilidade da substância activa.

O uso de promotores de absorção nesta via de administração melhora a absorção dos péptidos uma vez que estes aumentam a permeabilidade da membrana e/ou a adição de inibidores de enzimas que aumentam a estabilidade da substância activa. Deste ponto de vista, o papel destes potenciadores no transporte bucal de proteínas é crucial. São várias as substâncias que podem funcionar como promotores, devendo no entanto ser prevenido a ocorrência de efeitos laterais tais como a irritação da mucosa bucal (Moeller et al., 2008).

1.4. Administração Transdérmica

Uma vez que a pele é o maior órgão do corpo humano, a administração transdérmica é uma alternativa apelativa à via subcutânea. É uma via que oferece boa adesão dos pacientes, a possibilidade de controlar a libertação ao longo do tempo enquanto que evita a degradação que ocorre ao longo do tracto gastro-intestinal e o efeito de primeira passagem.

Esta via de administração é dificultada pelo facto das proteínas não penetrarem facilmente na pele, devido, mais uma vez ao seu tamanho e hidrofobicidade. A permeação pode depender muito do estado da pele e da sua hidratação. Mais uma vez, o aumento da permeação pode ser alcançada através do uso de potenciadores químicos. Em termos de efeitos laterais desta técnica,

especialmente em regimes de terapia crónica, podemos referir a irritação ou mesmo o dano cutâneo.(Khafagy et al., 2008).

1.5. Administração Ocular

Trata-se de um eficiente sistema de absorção que pode ser utilizado como um meio não invasivo de administração sistémica. Apresenta também a vantagem de ser muito mais prática e fácil do que uma injeção, sendo que a taxa de absorção sistémica pela via ocular é tão rápida quanto a via injectável, o tecido do olho é significativamente menos sensível ao desenvolvimento de reacções imunológicas do que outros tecidos, evita o efeito de primeira passagem a nível hepático assim como degradações que ocorrem a nível gastrointestinal, (Khafagy et al., 2008) sendo estas as responsáveis pela baixa biodisponibilidade de péptidos e outras substâncias aquando administração via oral e não foram detectados efeitos laterais nem tolerância após um longo período de tempo (3 meses) com administrações diárias de gotas contendo insulina.

Como desvantagem refira-se as condicionantes fisiotecnológicas desta forma farmacêutica e algum incómodo na aplicação.

1.6. Administração Rectal

Durante os últimos anos ocorreu um aumento considerável de interesse na via rectal, como via de administração de insulina, que é considerada uma via mais fisiológica para aplicação de insulina. Esta via, comparativamente a outras, oferece várias vantagens: primeiramente, esta via é independente da motilidade intestinal, tempo de esvaziamento gástrico e da dieta. É sabido que a presença de enzimas na parede intestinal diminua da porção proximal para a distal do intestino delgado e do recto. (Khafagy et al., 2008). A maior vantagem sugerida para a administração rectal, seria o facto, o efeito de primeira passagem estar reduzido.

1.7. Administração Pulmonar

Na terapia inalatória, o tracto respiratório é, não só o alvo terapêutico como também o próprio meio de chegada da substância activa.

Esta terapia é comumente utilizada de modo a providenciar um efeito local em patologias como a asma, Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC), bronquite, fibrose cística, entre outras (Daniher et al., 2008). Nos últimos 20 anos, a administração de medicação por via pulmonar foi explorada de modo a obter um efeito sistémico. Uma das grandes vantagens deste modo de administração de proteínas e péptidos prende-se com a reduzida actividade enzimática intra e extra-celular, evitar o efeito de primeira passagem e a elevada permeabilidade da mucosa pulmonar para macromoléculas do tipo da insulina.

Trata-se de uma opção cómoda e não invasiva que oferece certas vantagens comparativamente a rotas tradicionais de administração de medicamentos: a grande superfície de absorção pulmonar (140 m^2), a sua elevada vascularização, a relativa ausência de metabolização de primeira passagem bem como de degradação enzimática. Apesar de os pulmões não serem isentos de actividade enzimática, esta e as vias percorridas diferem daquelas observadas no tracto gastrointestinal, o que faz com que a administração pulmonar de péptidos e proteínas seja extremamente promissora. A biodisponibilidade de proteínas e outras macromoléculas é maior do que por qualquer outra via não invasiva (Patton et al., 2007; Khafagy et al., 2007). A espessura fina do epitélio alveolar permite uma rápida absorção do fármaco e deste modo um rápido início de acção (Agu et al., 2001).

Deste modo, destacam-se duas áreas distintas de aplicação da via pulmonar para obtenção de efeito sistémico que dizem respeito à taxa e extensão de absorção:

(1) a via inalatória para situações onde se pode atingir mais rapidamente a absorção de substâncias activas do que por outras vias não invasivas, especialmente por administração oral, é requerida; e

(2) administração de substâncias activas que possuem uma reduzida extensão de absorção por outras vias não invasivas (este grupo inclui principalmente proteínas e medicamentos peptídeos, tal como a insulina e seus análogos, hormona de crescimento, eritropoetina, interferões, bem como algumas pequenas moléculas) (Gonda, 2000).

A anatomia e fisiologia pulmonar, permitem que estes funcionem como um filtro aerodinâmico eficiente uma vez que possuem uma estrutura ramificada que não favorece uma profunda deposição do medicamento. Além disso, a eficácia farmacológica de um fármaco veiculado por aerossol depende não só da quantidade de partículas que depositam, mas também da quantidade que é retida localmente. A deposição é o processo que determina a fracção de partículas inspiradas que ficam retidas no tracto respiratório e que, portanto, não são expiradas. Processos distintos actuam de modo a mover partículas suspensas no ar em direcção à superfície do tracto respiratório: forças de inércia, sedimentação e difusão Browniana. Partículas menos solúveis e moléculas com pior absorção que são depositadas no cobertor de muco que recobre grandes e pequenas vias pulmonares são direccionadas em direcção à faringe pelos cílios. As partículas que depositam em porções não ciliadas dos pulmões podem ser ingeridas pelos macrófagos alveolares ou podem até ser dissolvidas (Brain, 2007).

2. Insulina

A insulina, substância activa estudada neste trabalho, é uma hormona produzida pelas células beta que se localizam no interior do pâncreas. Após cada refeição, estas células libertam a insulina que ajuda o corpo a usar ou armazenar a glucose proveniente dos alimentos ingeridos. Em pessoas com diabetes tipo I (insulino-dependente) , as células beta foram destruídas, existindo então a impossibilidade por parte do pâncreas de produzir insulina. De modo a reparar esta falta, existe a necessidade de injeções de insulina para utilizar a glucose que se acumula no organismo. A diabetes, aparece com maior frequência em crianças e jovens, podendo no entanto aparecer em idades mais avançadas. Pessoas afectadas por diabetes tipo 2 (não insulino-dependente), produzem insulina mas as células do organismo oferecem resistência à sua acção da. Este tipo de diabetes surge normalmente na idade adulta e o seu tratamento, numa primeira fase, consiste na adopção de uma dieta alimentar e exercício físico, de modo a normalizar o mais

possível os níveis glicémicos. Caso estas medidas não sejam suficientes o doente tem de recorrer a medicação específica, e em certos casos ao uso de insulina, que tem de ser injectada por via subcutânea de modo a entrar na corrente sanguínea (Katzung, 2007).

No início da terapia com insulina, muitos pacientes acharam incómodo a necessidade de administrarem várias injeções de insulina por dia. Assim, investigadores iniciaram estudos de modo a prolongar a acção da insulina. No início dos anos 30, foi descoberto que a adição de protamina à insulina, reduzia substancialmente a sua solubilidade ao pH normal dos fluidos corporais retardando assim a sua absorção e prolongando a sua acção. Por volta da mesma altura, foi reportado que a adição de zinco à insulina também prolongaria o seu efeito. Por volta de 1946 foi produzida a primeira insulina cristalina – Neutral Protamine Hagedorn (NPH), tornando-se assim possível fazer misturas com insulina de acção rápida. A insulina ultra lenta também estava disponível como insulina protamina-zinco (PZI). Nos anos 50 foram introduzidas formulações com rácios diferentes de insulina de protamina amorfa e zinco cristalino. Nesta fase, os doentes tinham uma grande variedade de escolha de insulinas desde as rápidas às ultra lentas (Heller et al., 2007).

No entanto, a administração de insulina por via subcutânea resulta num perfil de insulina plasmática bastante diferente da resposta prandial normal em indivíduos não diabéticos. A insulina ultra lenta NPH não simula exactamente a secreção de insulina fisiológica no individuo sem diabetes. Assim, episódios de hipoglicémia são por muitas vezes um problema neste tipo de preparações. De modo a ultrapassar este entrave, foram desenvolvidos análogos de insulina, através da substituição de certos aminoácidos na estrutura da insulina de modo a fornecer um perfil de insulina mais fisiológico (Heller et al., 2007).

Actualmente, existem quatro tipos de formulações de insulina para terapia diabética e as três característica de cada uma delas é o início de acção, que corresponde ao tempo que a insulina leva a alcançar a corrente sanguínea e começa diminuir a glicémia, o pico máximo que se traduz pela potencia máxima da insulina, no sentido de baixar a glicémia e a duração que diz como a insulina continua a diminuir a glucose. Assim:

- Insulina de acção ultra-rápida – demora cerca de 5 minutos a produzir efeito após a injeção, o seu pico máximo é após 1 hora, e é eficaz por 2 a 4 horas;
- Insulina de acção rápida – atinge a corrente sanguínea em cerca de 30 minutos, o seu pico está entre as 2 e 3 horas e é eficaz por cerca de 12 a 18 horas;
- Insulina de acção intermédia – geralmente demora cerca de 2 a 4 horas após injeção, o pico está entre as 4 e as 12 horas e a sua eficácia encontra-se entre as 12 e as 18 horas;
- Insulina de longa duração de acção (ultra-lenta) – atinge a corrente sanguínea entre 6 a 10 horas após a injeção e é geralmente eficaz entre as 20 e as 24 horas seguintes.

Em 2006, foi comercializada um produto de insulina pulmonar, Exubera[®], (Sanofi-Aventis). A sua formulação continha citrato de sódio, manitol, glicina e hidróxido de sódio, com uma biodisponibilidade de 10% relativamente à administração subcutânea. Trata-se de uma insulina de acção rápida, em forma de pó, a ser inalado antes de cada refeição. Em 2007, Exubera[®] foi retirado do mercado, não só devido ao insucesso comercial como sobretudo à sobre-representação de cancro de pulmão nos pacientes. Esta insulina provocou também um aumento da incidência de formação de anticorpos relativamente à administração subcutânea de insulina convencional.

Outras formulações de insulina estiveram sob investigação, variando de cristais secos a partículas revestidas ou gotículas de líquidos, mas diversas companhias farmacêuticas optaram abandonar os seus projectos de pesquisa pulmonar, se bem que não admitindo ser por questões de segurança (Moeller et al., 2008).

Após a retirada do mercado da insulina pulmonar Exubera[®] e o término de muitos estudos na indústria farmacêutica sobre terapia proteica pulmonar, o caminho desta terapia era uma ainda uma realidade. Assim, nem a via de administração pulmonar nem outras vias não parenterais eram obsoletas e muitos desenvolvimentos interessantes têm vindo a decorrer sendo que alguns resultados têm sido alcançados para a insulina como já foram alcançados para muitas outras hormonas como a calcitonina e a vasopressina que se encontram no mercado como sprays nasais.

O campo da insulina já deu um tremendo passo em frente com a aprovação do Exubera[®]. A insulina desde há muito tempo que é alvo de estudo por parte da indústria farmacêutica devido ao elevado número de pessoas que a utiliza e dos problemas em torno da dependência de injeções (Khafagy et al., 2007).

Investigadores de instituições académicas e empresas farmacêuticas, iniciaram trabalhos conjuntos em diversas novas tecnologias de distribuição do fármaco de modo a introduzir no mercado uma forma de dosagem, viável e possível, de insulina oral com potencial capacidade de substituir a dolorosa terapia de insulina, desenvolvendo assim tecnologias que ultrapassem os desafios da administração oral de péptidos. Como resultado, há um elevado grau de inovação e competição, com várias substâncias já em fase de ensaio clínico.

Não foi só a fobia a agulhas, mas também o stress psicológico que todo o tratamento de diabetes proporciona que encorajou vários cientistas a investigar e explorar todas as promissoras vias de administração, desde a via oral à rectal, com uma enorme variedade de dispositivos e sistemas de administração. Cada uma das várias vias de administração de insulina possui o seu conjunto de vantagens e desvantagens, mas todas representam possibilidades de administração de insulina a longo termo, estando no entanto a dificuldade de atingir concentrações plasmáticas adequadas, ainda por ultrapassar (Khafagy et al., 2007).

3. Factores que Influenciam a Deposição Pulmonar de Fármacos Proteicos

A região anatômica onde as partículas da formulação inalada se depositam, no pulmão assim como a quantidade de substância activa que nele se deposita, depende tanto das características do próprio doente como das características físicas da partícula tais como o tamanho, densidade, forma, carga eléctrica e higroscopicidade. Quanto às características do doente, deve-se ter em conta a forma do pulmão, o sexo, idade e a sua respiração.

3.1. Tamanho da Partícula

A medida mais apropriada do tamanho de partículas de aerossóis é o d_{ae} , uma vez que relaciona o comportamento dinâmico da partícula e descreve o mecanismo principal da deposição de aerossóis no tracto respiratório. É definido como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente com densidade unitária com a mesma velocidade terminal de sedimentação que a partícula real (Telko et al., 2005; Daniher et al., 2008; Brain 2007). É expresso do seguinte modo:

$$d_{ae} = d_v(\rho/\rho_0\chi) \quad \text{Equação 1}$$

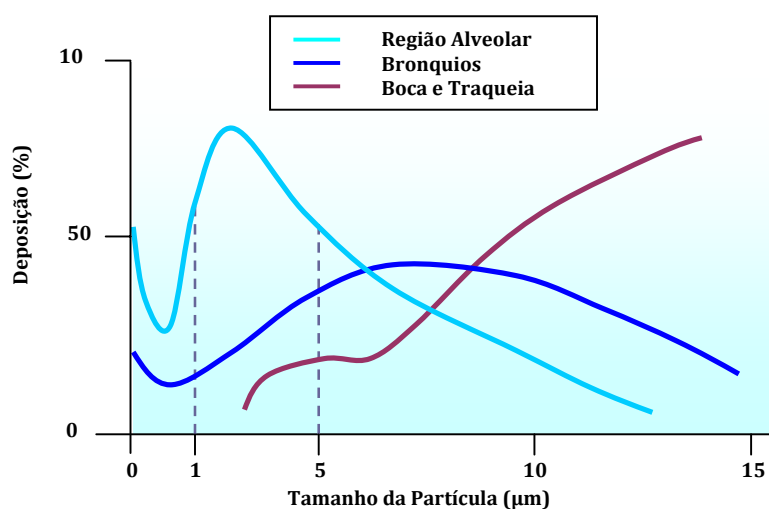
Onde ρ_0 e ρ correspondem respectivamente à partícula e à unidade de densidade e onde χ é o factor da forma dinâmica, que possui igual valor a 1 para uma partícula esférica perfeita. Este factor, tem em consideração não só o tamanho das partículas, como também a sua forma e densidade (Chow et al., 2007).

Este é parâmetro físico chave que prevê o local de deposição do aerossol nos pulmões para partículas micronizadas inaladas: partículas maiores que 10 μm são depositadas na parte superior do tracto respiratório e possuem pouco, se algum, efeito terapêutico sistémico. Partículas pequenas com diâmetro aerodinâmico inferior a 5 μm passam através das vias respiratórias superiores e depositam na porção inferior sob a influência da gravidade e de movimentos Brownianos. Em contraste, partículas com diâmetro inferior a 0,5 μm correm o risco de não se depositarem de todo, uma vez que elas se estabelecem mais lentamente e podem ser arrastadas pela corrente de ar e finalmente ser expiradas (Atkins, 2005).

Para um aerossol de partículas com um intervalo alargado de diâmetro aerodinâmico (polidispersas), a distribuição dimensional é usualmente caracterizada por *Mass Median Aerodynamic Diameter* – MMAD quando a dispersão segue uma distribuição log-normal, a dispersão pode ser expressa em termos de Desvio Padrão Geométrico – GSD que indica a taxa de polidispersão em torno do valor médio.

O Gráfico 1 representa a distribuição de tamanhos (d_{ae} μm) das micropartículas da substância activa de acordo com o local de deposição no tracto respiratório.

Gráfico 1 – Efeito do tamanho da partícula na deposição das partículas do aerossol no tracto respiratório na sequência de uma inalação lenta e uma suspensão do fôlego por 5 segundos. As partículas maiores depositam na boca e traqueia, e as mais pequenas na zona alveolar. Partículas menor de 1 μm podem ser exaladas (Agu et al., 2001).



3.2. Densidade

O diâmetro aerodinâmico de uma partícula é função da raiz quadrada da sua densidade e portanto, para uma partícula ter um determinado diâmetro de volume, reduzir a densidade, significa reduzir a sua dimensão aerodinâmica.

3.3. Forma

A forma das partículas possui uma notável importância quando da manipulação de pós. Por exemplo, cristais que possuem uma forma irregular são geralmente coesivos, enquanto que as esferas fluem muito melhor. As fibras e partículas em forma de agulha parecem ter bastante interesse no que diz respeito a características de deposição. O seu diâmetro aerodinâmico é quase independente do comprimento e o diâmetro é aproximadamente igual à partícula mais pequena em questão. Por esta razão, as partículas mais alongadas podem exibir um diâmetro aerodinâmico menor do que em relação a partículas esféricas com a mesma massa ou volume.

Tal como foi afirmado anteriormente, a administração de fármacos por via pulmonar oferece a oportunidade de administração sistémica de péptidos e proteínas, que no presente são administradas por via parenteral. A diabetes, por exemplo, é uma doença séria, não só para o indivíduo como para a sociedade. A diabetes está a aumentar rapidamente e a prevalência global é uma causa importante de preocupação. A maioria das estratégias requer uma rigorosa auto-monitorização e injeções frequentes de modo a controlar a hiperglicémia. De modo a aliviar algum fardo destes pacientes e a aumentar a sua adesão à terapêutica, o desenvolvimento de vias alternativas de administração de insulina, vale a pena.

Recentemente, vários avanços significativos na tecnologia de análise e métodos de engenharia de partículas (tais como a técnica “spray-drying”) conferiu aos farmacêuticos, a oportunidade de desenvolver micropartículas de tal modo que seja possível a entrega de um medicamento nas vias aéreas do pulmão de modo eficiente. Apesar da morfologia e as propriedades das micropartículas possa, muitas vezes ser ligeiramente controlada de modo a assegurar uma elevada reprodutibilidade do produto final, uma vez fabricados, são frequentemente incluídos em complexos de ambientes heterogêneos tais como dose calibrada do tipo (MDI) ou do tipo inalador de pó seco (DPI) de modo a facilitar a administração às vias aéreas. Nos DPI, as

micropartículas da substância activa, são frequentemente misturadas com um transportador inerte grosseiro, que após a inalação liberta as micropartículas para o pulmão. No entanto, as micropartículas encontrarão um conjunto diversificado de interacções adesivas decorrentes das propriedades da superfície heterogénea do transportador ditadas por diferenças quer dimensionais quer morfológicas individuais das partículas. Uma razão para o facto de ainda ser tão difícil desenvolver uma formulação que seja de administração inalatória, apesar da disponibilidade de inúmeras tecnologias de engenharia de micropartículas, é a falta de compreensão fundamental do comportamento dessas micropartículas quando em complexos de ambientes heterogéneos.

II Método Analítico de Doseamento da Insulina

2.1. Validação do Método Analítico para a Determinação Quantitativa de Insulina por HPLC

A determinação quantitativa da insulina foi feita por HPLC. A determinação quantitativa da substância activa é realizada reportando os valores das áreas dos picos cromatográficos com um padrão, que foi repetidamente injectado no início e durante a análise.

A curva de calibração foi construída usando seis concentrações de insulina bovina (SIGMA batch 01K1250) dissolvida em HCl 0.01 N a 0.116, 0.232, 0.579, 1.158, 2.895, 5.789 mg/ml. Cada padrão foi injectado seis vezes. A precisão do método analítico (expresso em Desvio Padrão Relativo – DPR%) foi calculada e está indicado na Tabela I.

A análise da insulina foi realizada utilizando as seguintes condições operativas:

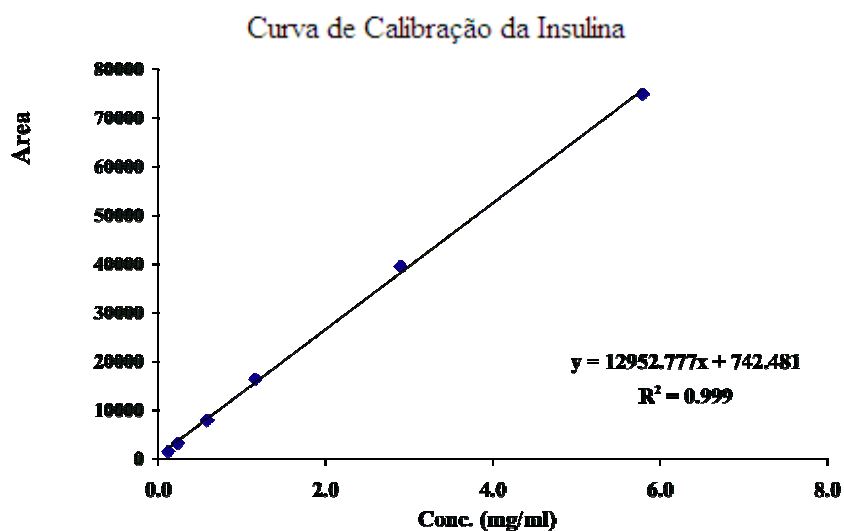
- Coluna: Symmetry 300, C18, 5 μ m (Waters Corp. USA)
- Temperatura da Coluna: 40°C
- Fase Móvel: Solvente A/CH₃CN 74/26 (Farmacopeia Europeia 5 Ed)
- Fluxo: 1.0ml/min
- Tempo de retenção: 13 min
- Comprimento de Onda: 214 nm
- Volume de Injecção: 20 μ l

Tabela 1. Valores de DPR% da solução de Insulina (n=6).

Diluição	Conc Amostra (mg/ml)	Média AUC	Desv. Padrão	DPR %
	5.789	74950	88.6	0.12
1:2	2.895	39603	199.8	0.50
1:5	1.158	16465	62.4	0.38
1:10	0.579	8021	44.3	0.55
1:25	0.232	3295	3.9	0.12
1:50	0.116	1591	1.9	0.12

A reprodutibilidade do método foi considerada aceitável uma vez que os valores obtidos do DPR% para cada padrão foram inferiores a 2% (limite definido pela IHC 24) (Tabela 1). O Gráfico 2 apresenta a linearidade do método.

Gráfico 2. Curva de calibração do HPLC da amostra de Insulina. Pico da área versus concentração da solução padrão da Insulina.



O coeficiente de correlação (R^2) da curva de calibração foi de 0.999 num intervalo de 0.12-5.79 mg/ml o que indica uma excelente linearidade entre a concentração e a resposta analítica.

2.2. Determinação A21 e Split

O método da Fase Reversa em HPLC utiliza um programa de eluições isocráticas. A análise foi feita com uma coluna Simmetry C18, 5 μ m, 4.6 mm x 250mm, (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) a uma temperatura de 40°C. Foram preparadas duas fases móveis para efectuar a análise A21 e Split:

Fase Móvel A: 0.28% m/v de solução anidra de sulfato de sódio (Sigma Chemical, Germany) com 2.7 ml/L de ácido fosfórico a 85%. O pH foi ajustado a 2.3 com etanolamina.

Fase Móvel B: fase móvel A/acetonitrilo 55/45 v/v.

Fluxo: 1ml/min

Tempo de retenção: 16 min

Comprimento de onda: 214 nm

Volume de injeção: 20 μ l

A análise foi efectuada com o seguinte gradiente de eluição:

Tabela 2 – Gradiente de eluição

Tipologia, min	% A	%B
Isocratica 0-30	38	62
Gradiente 30-44	38 \rightarrow 11	62 \rightarrow 89
Isocratica 44-50	11	89

Gráfico 3. HPLC de FR da Insulina e respectivos produtos de degradação.

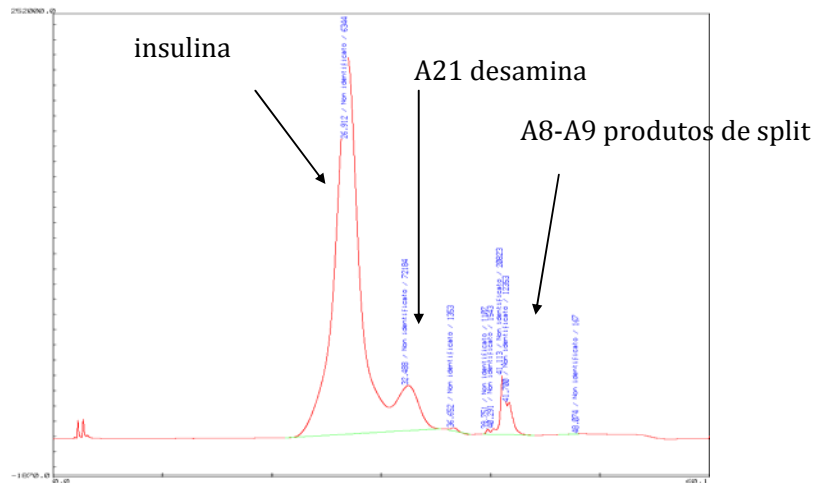
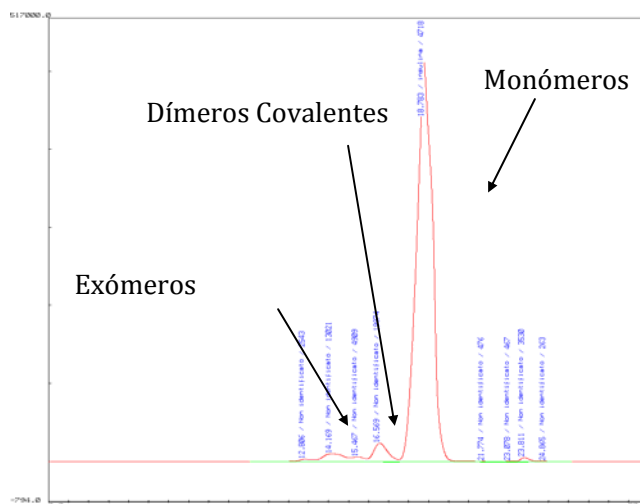


Gráfico 4. Cromatograma da Insulina por HPLC por exclusão de tamanhos e respectivos produtos de degradação.



A Farmacopeia Europeia V exige que no cromatograma, a soma da área dos picos eluídos antes do pico do monómero principal não deve ser superior a 1% da área total dos picos, mas não daqueles eluídos depois do monómero.

Os resultados obtidos da quantificação do lote de insulina como matéria-prima, em termos de produtos de degradação covalente, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Análise dos produtos de degradação da insulina como matéria-prima.

I Lote #	HMWP (1% Limit)	Pureza	
		A2 (3% Limit)	Split (3% Limit)
016k1250	0.54 ± 0.09	2.51 ± 0.21	0.60 ± 0.20

III. Produção de Insulina pelo Processo *Spray Drying*

A micronização de insulina foi efectuada por um processo de spray drying, utilizando um Spray-Dryer Büchi mod.191 (Büchi Laboratoriums- Technik, Svizzera). Através desta técnica é possível obter um pó micronizado cujas propriedades morfológicas e físicas são diferentes das da matéria-prima.

De um modo mais pormenorizado, o pó de insulina micronizado foi produzido através desta técnica utilizando uma solução da hormona (1% p/v) em ácido acético (0.4 M). Inicialmente, o pH desta solução foi corrigido com NaOH 1N ou NH₄OH para um valor dentro do intervalo de 3.1-3.6. Antes de serem levadas para o Spray-Dryer, as soluções foram ainda filtradas por um filtro de papel.

Para a produção do pó, foram utilizadas as seguintes condições operativas do Spray-Dryer:

Figura 1. Mini Spray – Dryer

- Fluxo de ar – 600/h
- Temperatura interior – 120°C
- Fluxo da bomba – 3.25 ml/min
- Aspiração – 100%



Após secagem, o produto foi recolhido para um papel encerado e o seu rendimento foi calculado (Equação 2) sendo posteriormente armazenado hermeticamente em frigorífico.

$$\% \text{Rendimento} = \frac{\text{Massa}_F}{\text{Massa}_S} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde, Massa_F corresponde ao peso do produto após o processo de Spray Drying e Massa_S é a quantidade sólida da suspensão inicial.

A Tabela 4 apresenta os valores de pH, a composição das soluções de insulina antes de sofrer o processo de spray drying e o rendimento do processo.

Tabela 4. Composição qualitativa e quantitativa do pó preparado pela técnica Spray Drying e as condições operativas adoptadas.

	Lote Insulina Matéria-Prima	Base usada para aumentar pH	pH solução antes de Spray Drying	Rendi- mento	pH do pó (1 mg/ml)
ISD5207*	115k1758	NaOH 1N	3.12	84.8%	4.97
ISD1307*	016k1250	NaOH 1N	3.10	86.1%	4.92
ISD91007	016k1250	NH ₄ OH 15%	3.60	72.7%	4.88
ISD101007	016k1250	NH ₄ OH 15%	4.24	58.0%	4.82

*Lote preparado previamente, sendo a sua estabilidade seguida neste trabalho

Os pós de insulina foram obtidos com sucesso pela técnica “Spray Drying” sendo o rendimento em todos os casos superior a 55%. A volatilização do ácido durante o processo de secagem levou a um aumento do pH dos pós (Tabela III). Postula-se que aumento do pH ajuda a diminuir a potencial agressividade dos pós na mucosa pulmonar.

IV. Caracterização do Pó Produzido

4.1. Morfologia do Pó “Spray Dried” por SEM

As características morfológicas do pó foram examinadas por SEM (Scanning Electron Microscopy JSM 6400), não só da matéria prima mas também de todas as amostras produzidas por “Spray Drying” de modo a que fosse possível verificar as alterações morfológicas sofridas nas partículas devido ao processo a que foram submetidas. Assim, as amostras foram depositadas num vidro de microscópio coberto por uma fita bi-adesiva que servia como suporte. As amostras foram ainda cobertas com uma fina camada de dourado, cuja espessura encontrava-se entre 200 Å e 400 Å e que foi analisado a uma distancia de 39 mm e com uma diferença de potencial entre 5-10 KV.

Figura 2. Imagens de insulina como matéria prima analisadas através de SEM.

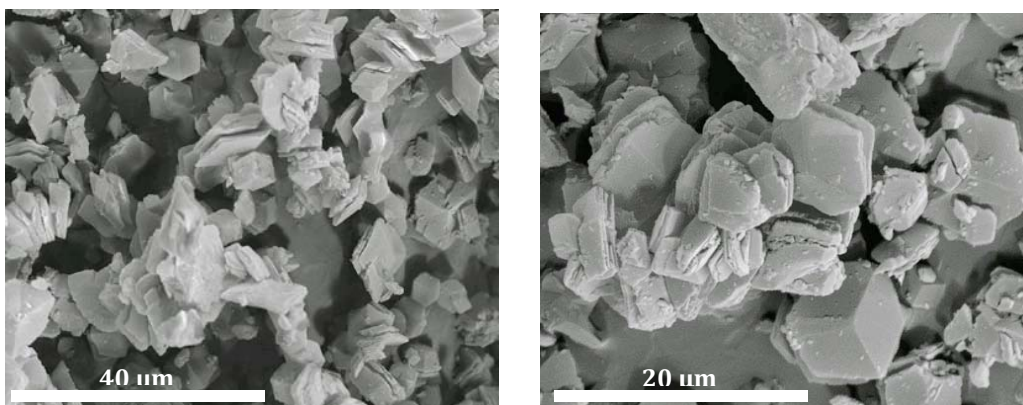
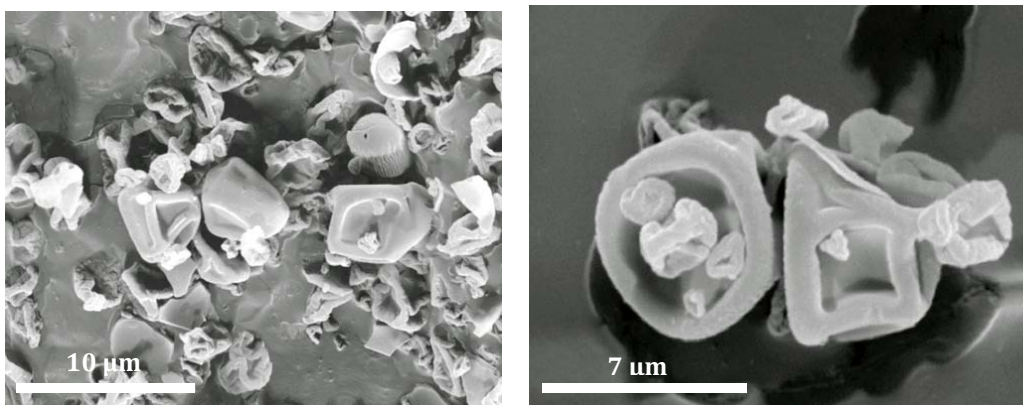


Figura 3. Microfotografia de insulina após técnica de “Spray-Dring” (LoteISD1307).



A figura 2 mostra que os cristais da matéria prima possuem uma forma irregular assim como uma superfície macia. Alguns cristais apresentam uma forma cúbica mas a maioria apresenta uma forma prismática irregular. A dimensão das partículas, em termos de diâmetro varia entre 10-15 μm , sendo deste modo demasiado grandes para administração pulmonar, uma vez que apenas partículas com um diâmetro aerodinâmico inferior a 5 μm são consideradas respiráveis. Comparando as imagens obtidas através de SEM da insulina enquanto matéria prima e insulina “Spray-Dried” é demonstrado que a técnica de “Spray-Drying” modifica a morfologia e o tamanho das partículas dando lugar a micro-partículas irregulares, enrugadas e esponjosas. A formulação resultante apresenta uma morfologia característica em crescente e colapsada de acordo com a corrente definição usada na descrição da partícula. A análise microscópica indica a presença de uma superfície áspera com várias depressões o que pode indicar que por dentro, as partículas são ocas e colapsaram durante a fase de formação.

4.2. Análise Dimensional de Difracção por Laser

O processo de difracção por laser é aplicado a material cujas dimensões variam entre 0.05 e 3500 μm . A distribuição dimensional das partículas é expressa como diâmetro de volume equivalente, isto é, o diâmetro de uma esfera com o mesmo volume da partícula a ser examinada. O pó micronizado foi analisado por um “laser light scattering” Mastersize X (Malvern Instruments Ltd., UK) numa suspensão com uma solução de lecitina-ciclohexano (0.1% p/v). Foi ainda utilizada uma pequena célula com 100 ml de volume dotada de sistema direccional, uma lente de 45 nm (útil num intervalo de 0.2-0.8 μm) que se situava a uma distancia de 5 cm da objectiva. A suspensão foi colocada no sonicador durante 15 minutos antes da análise.

A análise foi repetida 8 vezes para cada amostra e foram analisadas 3 amostras por lote, através de um processo de escolha de amostras aleatório. Os resultados da análise são expressos em termos de $d_v 0.9$, $d_v 0.5$ e $d_v 0.1$ que representam os diâmetros a 90, 50 e 10% de volumes cumulativos respectivamente.

Tabela 5. Tamanho das partículas de Insulina enquanto matéria prima e após o processo “Spray-Drying”. D_v 0.1, d_v 0.5 e d_v 0.9 representam o diâmetro das partículas a 10, 50 e 90% da área cumulativa.

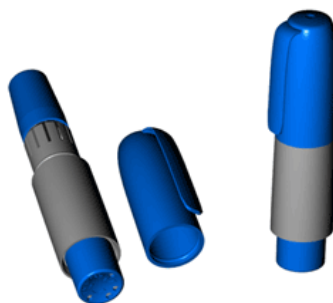
	d_v 0.1 (µm)	d_v 0.5 (µm)	d_v 0.9 (µm)
I 016k1250	2.78 ± 0.04	8.81 ± 0.13	15.54 ± 0.06
ISD5207	1.38 ± 0.02	4.52 ± 0.10	8.55 ± 0.26
ISD1307	1.42 ± 0.06	4.74 ± 0.11	8.84 ± 0.12
ISD91007	0.92 ± 0.03	4.04 ± 0.17	9.33 ± 0.47
ISD101007	1.55 ± 0.18	3.67 ± 0.39	7.87 ± 0.79

Cada lote preparado por este processo dispunha de micropartículas com dimensões correctas para deposição nas vias aéreas inferiores (ex. um diâmetro médio entre 1-5 µm, assumindo uma densidade de aproximadamente 1). O diâmetro médio foi sempre inferior a 5 µm. Por estes motivos, os pós preparados têm um valor aerodinâmico útil de modo a atingirem a zona respiratória e produzir a sua acção farmacológica.

4.3. Avaliação Aerodinâmica por Cascata de Impacto de Anderson

O aparelho DPI (Dry Powder Inhaler) utilizado neste estudo, foi o inalador multi-doses Turbospin[®] (Chiesi Farmaceutici, IT). Turbospin[®] é um aparelho com capacidade para uma cápsula (monodose) com o pó, que consiste numa peça branca onde se coloca a boca, o corpo que acomoda a cápsula e ainda um par de agulhas que fura a cápsula (Figura 8). Consegue dosear e aerosolizar uma pequena quantidade de fármaco (2 mg de pó) e é de simples manejo para os pacientes.

Figura 4. Turbospin[®], Ph&T Millano.



Com o ACI é possível determinar a respirabilidade dos pós (Figura 5). O seu uso permite a obtenção da distribuição dimensional em termos de diâmetro aerodinâmico (d_{ae}) e o cálculo da fracção das partículas que atinge os níveis inferiores considerados críticos para a fracção respirável (inferior a 5 μ m).

O Andersen Cascade Impactor - ACI é composto por uma garganta e um pré-separador que representa a primeira porção do tracto respiratório, e uma sequência de níveis (placas) com pequenas aberturas cujas dimensões diminuem sucessivamente. Assim, quando o pó percorre os diferentes níveis, as partículas ficam retidas de acordo com o seu tamanho (das partículas maiores para as menores). No final do instrumento, existe um filtro conectado a uma bomba que por sistema de vácuo gera um fluxo de ar dentro do sistema.

Figura 5 - ACI



Para se obter um fluxo de 60 l/min de modo a que haja uma correcta activação do Turbospin, é necessário um tempo de activação da bomba de 4 segundos (USP 29). Os vários níveis (placas) deste instrumento possuem uns “pratos” que são revestidos com Span 80/ciclohexano (1% w/v) de modo a que seja possível controlar o retorno das partículas dentro do instrumento. O pó total recuperado foi calculado como uma percentagem da dose carregada e se fosse inferior a 85% o valor era recusado e repetia-se a experiência. Foram feitos três testes para cada formulação de DPI. A fracção respirável é expressa em termos de fracção de pó fino (FPF) que serão as partículas com dimensão inferior a 5 μ m. Foram descarregadas 10 doses de modo a garantir que em cada nível, a quantidade de substancia activa era a suficiente para ser detectada na análise por HPLC.

Foram calculados os seguintes parâmetros de acordo com descrito na USP 29:

Recuperação: representa a percentagem de substância activa recuperada do sistema relativamente à massa de pó emitida pelo Turbospin[®]. De modo a que a análise seja considerada válida, o valor deve estar entre 75% e 125%. Neste trabalho, resultados de Recuperação inferiores a 80% não foram considerados.

FDP (Dose de Partícula Fina): massa (μg) da substância activa com dimensões iguais ou inferiores a 5 μm . Fracções com tais dimensões, que permitam deposição pulmonar, calcula-se:

$$\mathbf{FDP} = \left(\frac{R}{N} \right) \quad \text{Equação 3}$$

R corresponde à massa total de partículas inferiores a 5 μm , e N corresponde ao número de doses descarregadas durante a experiência.

FPF (Fracção de Partícula Fina): expressa a percentagem de massa de substância activa inferior a 5 μm relativamente à quantidade total da mesma retirada do colector do dispositivo. Calcula-se de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mathbf{FPF} = \left(\frac{R}{\sum A} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

R corresponde à massa total da substância activa inferior a 5 μm , e $\sum A$ é a massa total da substância activa retirada do dispositivo.

MMAD (Massa Média Diâmetro Aerodinâmico): diâmetro médio é a dimensão (μm) que separa a distribuição dimensional em duas partes com o mesmo peso. É calculada em diagrama a fracção cumulativa subdimensionada da substância activa na escala de Log Probit versus diâmetro aerodinâmico em escala Log. Através da interpolação de dados é possível verificar a MMAD como o diâmetro correspondente de 50% da fracção cumulativa.

Dose Administrada ou Dose Libertada: representa a dose (mg) libertada do inalador Turbospin® e é entendida como a diferença de peso do dispositivo inalador antes e depois da saída da dose.

Na tabela 6 estão descritos os valores de parâmetros aerodinâmicos (USP 29), a distribuição do pó no ACI e valores extrapolados da MMAD da percentagem cumulativa subdimensionada versus o diâmetro aerodinâmico de todos os pós analisados.

Tabela 6 – Parâmetros aerodinâmicos da insulina para inalação por “Spray Drying”.

Parâmetros Aerodinâmicos					
Batch #	Dose Administrada	Recuperação	MMAD	FPD	FPF
	(mg)	(%)	(μm)	(mg)	(%)
ISD5207	1.70 ± 0.06	92.3 ± 1.5	3.31 ± 0.07	0.94 ± 0.06	65.27 ± 0.91
ISD1307	1.66 ± 0.05	88.6 ± 0.9	3.21 ± 0.11	0.85 ± 0.10	65.54 ± 3.03
ISD91007	1.57 ± 0.01	82.5 ± 2.1	1.79 ± 0.18	1.04 ± 0.09	83.56 ± 4.76

Distribuição Dimensional em ACI

Gráfico 5. Distribuição Dimensional (%) de insulina “Spray-Dried” lote 5207 em ACI

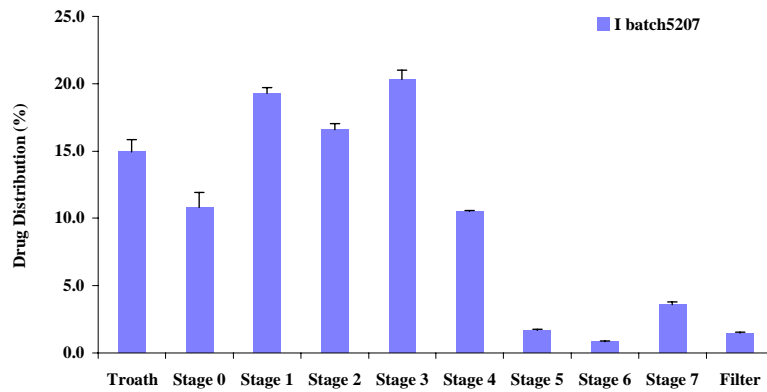


Gráfico 6. Distribuição Dimensional (%) de insulina “Spray-Dried” lote 1307 em ACI

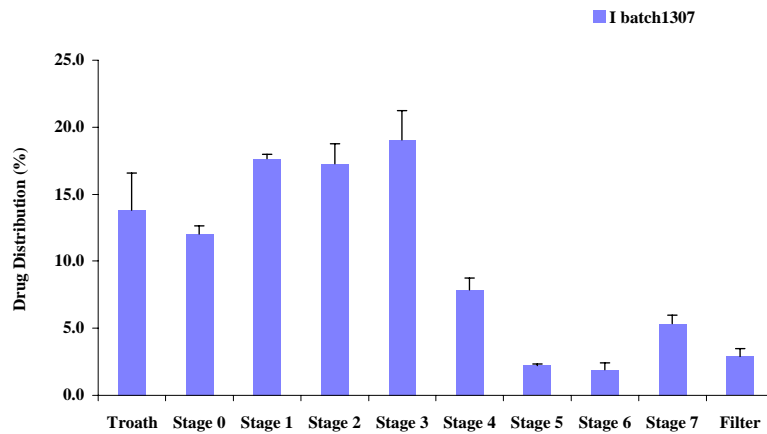
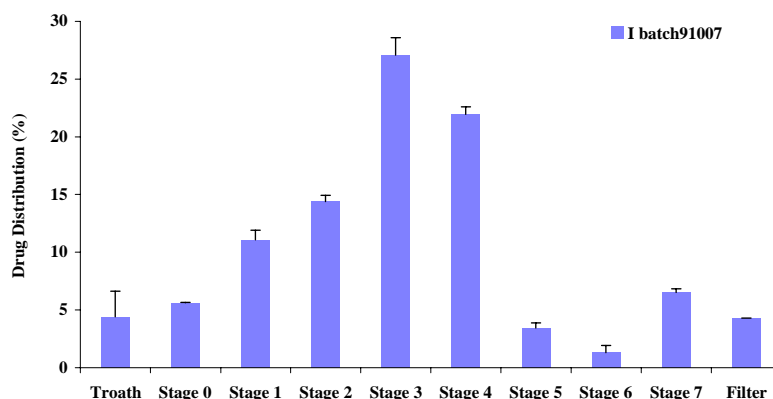


Gráfico 7. Distribuição Dimensional (%) de insulina “Spray-Dried” lote 91007 em ACI



A eficiência (%) da dose libertada (ratio entre a dose libertada e a dose marcada) foi próxima de 82%; os pós têm um bom escoamento e não possuem tendência para formar aglomerados. Todos os lotes de pó de insulina demonstraram possuir uma respirabilidade elevada assim como boas propriedades aerodinâmicas uma vez que a MMAD foi inferior a 4 μm e a FPF superior a 60%. Em particular, o maior valor de FPF (83.6%) foi obtido de um pó preparado por “Spray Drying” em ácido acético/solução de amónia (pH 3.6) do péptido (lote 91007).

4.4. Estabilidade

Foi efectuado um estudo de estabilidade de modo a seguir a degradação da insulina em pó durante o período de armazenagem em diferentes condições atmosféricas. Deste modo, o pó foi armazenado em diferentes condições de temperatura: 5°C e 25°C-60% R.H. (Humidade Relativa). As amostras foram analisadas no tempo zero, primeiro, terceiro, sexto, nono e décimo segundo mês. Alguns dos resultados não são apresentados devido à continuidade do estudo.

4.4.1. Conteúdo em Insulina %

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados referentes ao conteúdo em insulina.

Tabela 7. Conteúdo (%) de insulina no pó “Spary-Dried” armazenado a 25° ao longo do tempo.

Conteúdo em Insulina % - 25°C				
	T zero	Mês 1	Mês 3	Mês 6
ISD5207	86.36 ± 1.49	84.74 ± 1.75	85.79 ± 2.77	85.91 ± 2.22
ISD1307	88.86 ± 0.83	82.04 ± 0.39	82.05 ± 3.86	76.12 ± 5.07
ISD91007	95.78 ± 1.58	97.75 ± 2.30	*	*

* Dados não disponíveis.

Tabela 8. Conteúdo (%) de insulina no pó “Spary-Dried” armazenado a 5° ao longo do tempo.

Conteúdo em Insulina % - 5°C				
	T zero	Mês 1	Mês 3	Mês 6
ISD5207	86.36 ± 1.49	86.23 ± 0.87	85.13 ± 1.35	89.31 ± 3.90
ISD1307	88.86 ± 0.83	85.65 ± 0.80	81.01 ± 2.05	84.25 ± 2.04
ISD91007	95.78 ± 1.58	96.63 ± 0.98	*	*

* Dados não disponíveis.

4.4.2. Proteína de Elevado Peso Molecular (HMWP – High Molecular Weight Protein)

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados referentes aos produtos de agregação covalente no pó de insulina.

Tabela 9. Conteúdo (%) dos produtos de agregação covalente (dímeros) no pó de insulina “Spray Dried” a 25°.

	HMWP			
	(Limite 1%)			
	T zero	Mês 1	Mês 3	Mês 6
ISD5207	1.47 ± 0.02	1.86 ± 0.03	2.60 ± 0.02	3.87 ± 0.17
ISD1307	0.44 ± 0.01	0.68 ± 0.05	1.40 ± 0.01	3.74 ± 0.03
ISD91007	0.47 ± 0.01	1,19 ± 0.05	*	*

* Dados não disponíveis.

Tabela 10. Conteúdo (%) dos produtos de agregação covalente (dímeros) no pó de insulina “Spray Dried” a 5°.

	HMWP			
	(Limite 1%)			
	T zero	Mês 1	Mês 3	Mês 6
ISD5207	1.47 ± 0.02	1.48 ± 0.06	1.60 ± 0.00	1.64 ± 0.00
ISD1307	0.44 ± 0.01	0.60 ± 0.04	0.50 ± 0.00	0.54 ± 0.00
ISD91007	0.47 ± 0.01	0.71 ± 0.04	*	*

* Dados não disponíveis.

Produtos de Degradação no Tempo de HMWP

Nos gráficos seguintes apresentam-se a formação de produtos de degradação ao longo do tempo nos diferentes lotes.

Gráfico 8. Produtos de degradação de HMWP no tempo do lote 5207

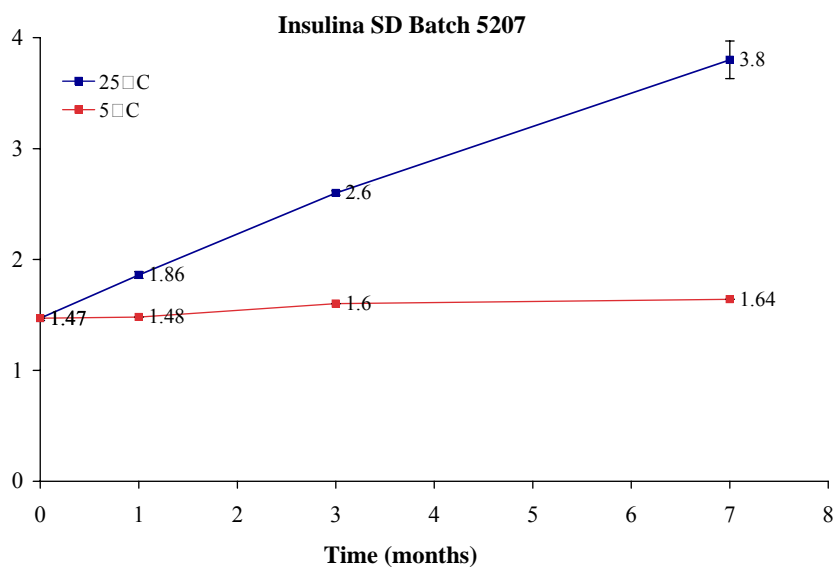
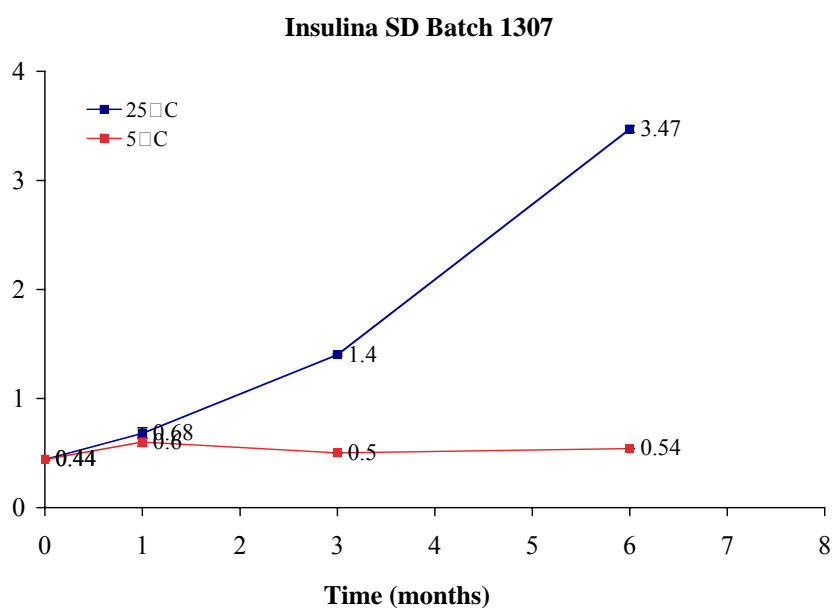


Gráfico 9. Produtos de degradação de HMWP no tempo do lote 1307



4.4.3. A 21 e Split Produtos de Degradação

Tabela 11. Produtos de degradação (%) a 25° (Insulina, A 21 e Split) no pó de Insulina “Spray-Dried”.

Lote #	Degradação A21 e Split (Limite 5% + 6%)	Tempo			
		Tempo Zero	Mês 1	Mês 3	Mês 6
ISD5207	A 21	3.90 ± 0.22	3.22 ± 0.24	3.96 ± 0.35	6.85 ± 0.33*
	Split	4.09 ± 0.39	4.82 ± 0.13	6.24 ± 0.12	10.89 ± 0.10*
	Insulina	92.01 ± 0.33	93.96 ± 0.22	89.81 ± 0.47	82.17 ± 0.23*
ISD1307	A 21	2.53 ± 0.22	3.41 ± 0.18	3.45 ± 0.49	4.45 ± 0.28
	Split	0.77 ± 0.18	2.05 ± 0.18	4.33 ± 0.23	11.40 ± 0.90
	Insulina	96.27 ± 0.38	94.57 ± 0.34	92.22 ± 0.72	84.15 ± 0.64
ISD91007	A 21	3.61 ± 0.26	6.29 ± 0.23		
	Split	1.44 ± 0.24	1.81 ± 0.17	**	**
	Insulina	94.94 ± 0.49	91.90 ± 0.34		

* Mês 7

** Valores de estabilidade não disponíveis.

Tabela 12. Produtos de degradação (%) a 25° (Insulina, A 21 e Split) no pó de Insulina “Spray-Dried”.

Lote #	Degradação	Tempo			
	A21 e Split (Limite 5% + 6%)	Tempo Zero	Mês 1	Mês 3	Mês 6
ISD5207	A 21	3.90 ± 0.22	3.80 ± 0.24	3.99 ± 0.10	7.40 ± 0.15*
	Split	4.09 ± 0.39	3.78 ± 0.18	3.44 ± 0.20	3.96 ± 0.89*
	Insulina	92.01 ± 0.33	92.42 ± 0.28	92.57 ± 0.10	88.64 ± 0.79*
ISD1307	A 21	2.53 ± 0.22	3.38 ± 0.15	3.35 ± 0.05	3.62 ± 0.11
	Split	0.77 ± 0.18	1.68 ± 0.4	1.29 ± 0.35	0.83 ± 0.05
	Insulina	96.27 ± 0.38	95.14 ± 0.11	95.36 ± 0.30	95.50 ± 0.47
ISD91007	A 21	3.61 ± 0.26	6.15 ± 0.22		
	Split	1.44 ± 0.24	0.87 ± 0.02	**	**
	Insulina	94.94 ± 0.49	92.97 ± 0.21		

* Mês 7

** Valores de estabilidade não disponíveis.

Progressão de A 21 e Produtos de Degradação de Split no Tempo

Nos gráficos seguintes apresenta-se a degradação do A 21 e Split ao longo do tempo

Gráfico 10. A 21 e produtos de degradação de Split no tempo do lote 5207 (a linha representa o limite de degradação da USP).

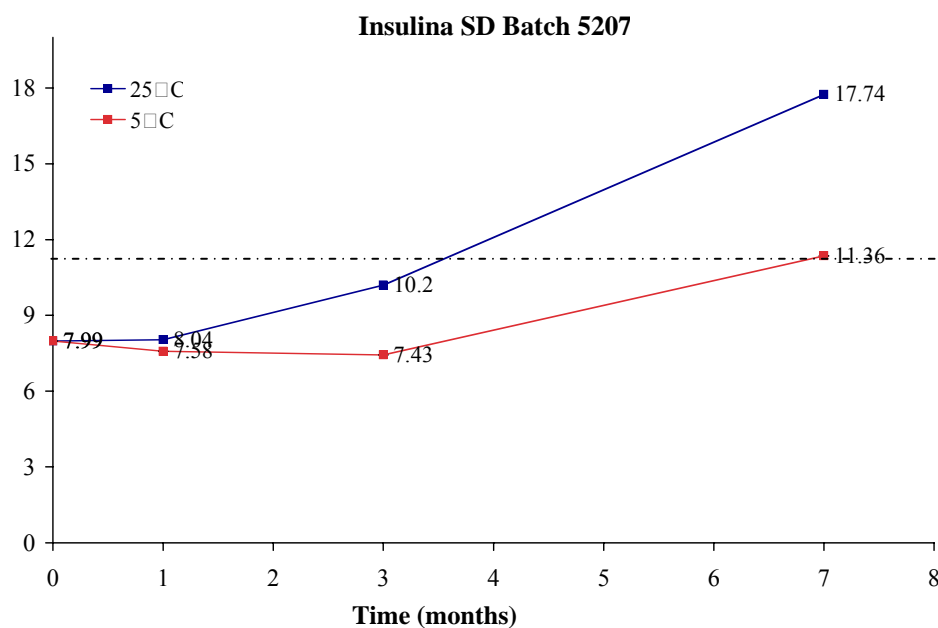


Gráfico 11. A 21 e produtos de degradação de Split no tempo do lote 1307 (a linha representa o limite de degradação da USP).

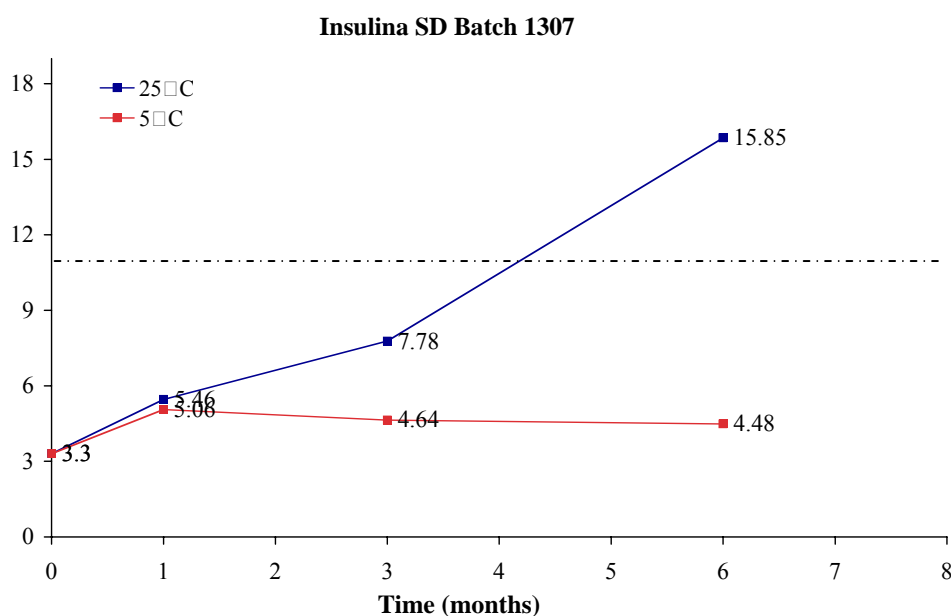


Gráfico 12. A 21 e cromatograma do Split do lote ISD 1307 a tempo zero.

QuickTime™ e un
decompressore TIFF (Non compresso)
sono necessari per visualizzare quest'immagine.

Gráfico 13. A 21 e cromatograma do Split do lote ISD 1307 a 25° 60% R.H. após 6 meses.

QuickTime™ e un
decompressore TIFF (Non compresso)
sono necessari per visualizzare quest'immagine.

Gráfico 14. A 21 e cromatograma do Split do lote ISD 1307 a 5° 60% R.H. após 6 meses.

QuickTime™ e un
decompressore TIFF (Non compresso)
sono necessari per visualizzare quest'immagine.

V. Conclusão

Este estudo demonstrou a capacidade da técnica “Spray Drying” de produzir pó com partículas de tamanho adequado para administração pulmonar. As imagens de SEM de insulina como matéria prima e insulina “spray-dried”, demonstraram que o processo “Spray drying” modifica a morfologia e o tamanho das partículas do pó, dando lugar a micropartículas de formato irregular, enrugadas e esponjoso.

O pó preparado a partir de uma solução aquosa do péptido demonstrou uma elevada respirabilidade e boas propriedades aerodinâmicas, uma vez que para todos os lotes a Massa Média Diâmetro Aerodinâmico foi inferior a 4 μm e a Fração de Partícula Fina foi superior a 60%. De um modo particular, o valor maior de Fração de Partícula Fina (83.6%) foi obtido a partir de um pó do péptido, preparado por “Spray Drying” usando uma solução de ácido acético/amónia (pH 3.6).

Todos os lotes demonstraram ser estáveis quando armazenados a uma temperatura de 5°C, não sendo no entanto, estáveis a temperatura ambiente. Em particular, o A 21 e os valores de Split aumentaram de 9.75% no lote ISD5207 para 12.55% no lote ISD1307 quando armazenados a 25°C-60% R.H. após 6 meses. À temperatura ambiente também houve um aumento das agregações covalentes. Os valores da Proteína de Elevado Peso Molecular são de 2.33% e 3.03% para os lotes ISD5307 e ISD1307 respectivamente quando armazenados a 25°C-60% humidade relativa após 6 meses.

Os resultados obtidos são promissores no desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração pulmonar de insulina.

O trabalho futuro será focado no sentido de melhorar a estabilidade química a temperatura ambiente.

VI. Bibliografia

- Agu, Remigius. U., Ugwoke, Micheal I., Armand, Michoel, Kinget, Renaat and Verbeke, Norbert (2001). *The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides*. Respir Res 2: 198-209.
- Atkins, P. J. (2005). *Dry Powder Inhalers: An Overview*. Respir Care 50 (10): 1304 – 12; discussion 1312.
- Brain, J. D. (2007). *Inhalation, Deposition and Fate of Insulin and Other Therapeutic Proteins*. Diabetes technology and Therapeutics 1(1): S4 – S15
- Chow, Albert H. L., Tong, Henry H. Y., Chattopadhyay, Pratibhash and Shekunov, Boris Y. (2007). *Particle Engineering for Pulmonary Drug Delivery*. Pharm Res 24(3): 411-437.
- Daniher, I.D. and Zhu, J. (2008). *Dry powder platform for drug pulmonary drug delivery*. Canada. Particuology 6, 225-238.
- Heller, S., Kozlovski, P. and Kurtzhals, P. (2007). *Insulin's 85th anniversary – An enduring medical miracle*. Denmark. Diabetes Research and Clinical Practice 78, 149-158.
- I.Gonda (2000). *The Ascent of Pulmonary Drug Delivery*. J. of Pharm. Sci. 89(7).
- Islam, N. and Gladki, E. (2008). *Dry Powders Inhalers (DPIs) – A review of device reliability and innovation*. Australia. International Journal of Pharmaceutics 360, 1-11.

- J.H. Hamman, G.M. Enslin, A.F. Kotze (2005). *Oral delivery of peptide drugs*. *Biodrugs* 19, 165-177.
- Khafagy, El-S., Morishita, M., Onuki, Y. and Takayama, K. (2007). *Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review*. Japan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1521-1546.
- Katzung, G.B. (2007). *Basics and Clinical Pharmacology*. São Paulo, McGraw Hill.
- Mack, G.S. (2007). *Pfizer dumps Exubera*. *Nature Biotechnology* 25, 1331-1332.
- Moeller, E.H. and Jorgensen, L. (2008). *Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals*. Denmark. *Drug Discov Today: Technol*.
- Patton, J. S. and P. R. Byron (2007). *Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs*. *Nat Rev Drug Discovery* 6(1): 67 – 74.
- Telko, M. J. and Hickey, A. J. (2005). *Dry powder inhaler formulation*. *Respir Care* 50(9): 1209 – 27.