



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI - LIKA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS NÚCLEO-
COROA DE PLGA/QUITOSANA COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DA
 β -LAPACHONA**

REBECCA RIBEIRO TORELLI DE SOUZA

Maio/2012

Recife - PE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI - LIKA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
NÚCLEO-COROA DE PLGA/QUITOSANA COMO SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA DA β -LAPACHONA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**.

Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rosa Valéria da Silva Amorim

Co-Orientadora

Rebecca Ribeiro Torelli de Souza

Mestranda

Recife/PE

2012

Souza, Rebecca Ribeiro Torelli de

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas núcleo-coroa de PLGA/quitosana como sistemas de liberação controlada na β -lapachona/ Rebecca Ribeiro Torelli de Souza. – Recife: O Autor, 2012.

94 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Rosa Valéria da Silva Amorim

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Farmacologia 2. Quitosana 3. Câncer I. Magalhães, Nereide Stela Santos II. Amorim, Rosa Valéria da Silva III. Título**

615.321 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-143

Torelli-Souza, Rebecca Ribeiro. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas núcleo-coroa de PLGA/quitosana como sistema de liberação controlada da β -lapachona. Defesa de Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Área de Concentração: Biotecnologia, Recife – PE, Brasil.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães - Orientadora
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^a Dr^a. Adriana Fontes - 1º Examinadora
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^a. Dr^a. Mariane Cajubá de Britto Lira - 2º Examinadora
(Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória CAV/ UFPE)

*Dedico este trabalho aos meus pais com
muito amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Dirijo os meus sinceros agradecimentos...

À Deus por sempre está comigo em todos os momentos de minha vida e em especial, no decorrer destes dois anos do mestrado. Muito obrigada Deus, por me conceder garra, coragem, saúde, sabedoria e discernimento.

Aos meus amados pais, José Carlos e Jane por serem sempre o meu maior exemplo a ser seguido, o meu braço forte, meu porto seguro. Por me concederem todo amor, educação e toda estrutura para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu irmão, Matheus por me ensinar através de suas atitudes que devemos batalhar por um sonho e não desistir dele, mesmo que seja difícil concretizá-lo.

Ao meu noivo Júnior, por está sempre ao meu lado me dando apoio, amor, carinho e atenção. Agradeço por dividir comigo todos os meus sonhos e por ter sido presente em todos os momentos de mudanças e adaptações que a vinda para Recife proporcionou. Em especial, agradeço pela compreensão nos momentos de ausência durante estes dois anos. A sua família, em especial D. Glória, Sr. Arnou por todo apoio.

À toda minha família e em especial as minhas avós, Enisa e Giselda por serem exemplo de força e perseverança.

À Maria do Socorro, minha segunda mãe, por todo apoio e cuidado, dando sempre auxílio para o meu crescimento pessoal.

Aos amigos de João Pessoa e em especial a Ana Elizabeth, Layanna, Vanice, Sara e Danielle por dividirem comigo todos os momentos de minha vida. Em especial, agradeço as amigas-irmãs Géssica Costa e Rafaela Tigre, a minha família construída em Recife e que como família me acolheram. Foram maravilhosos todos os momentos juntos a vocês.

À Prof^a Dr^a Nereide Stela Santos Magalhães pela orientação, paciência e confiança. Sou muito grata por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, contribuindo para o meu crescimento acadêmico, científico e pessoal.

À Prof^a Dr^a Rosa Valéria da Silva Amorim pela co-orientação e por contribuir com a minha formação acadêmica desde a graduação, me apoiando e estimulando a continuar traçando novos caminhos.

À todos do grupo de pesquisa Sistema de Liberação Controlada (SLC) que me receberam com todo carinho e atenção, me dando apoio em todos os momentos necessários. Em especial ao aluno de iniciação científica Michael Quirino pelo esforço e dedicação na realização deste trabalho e aos novos amigos Thiers Campos e Camilla Vila Nova por todo carinho e pela amizade construída.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica do LIKA-UFPE pela saudável convivência em laboratório.

À Prof^ª Dr^a Nereide Magalhães, Prof^ª Dr^a Adriana Fontes, Prof^ª Dr^a Mariane Lira, Prof^ª Dr^a Maria Tereza Correia e a Prof^ª Dr^a Noêmia Santos pela disponibilidade e contribuição na avaliação desta Dissertação de Mestrado.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE-PE) pelo suporte dado a este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – PPGCB pela formação e por todo serviço prestado com excelência.

Ao Ministério da Educação do Brasil – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro durante o curso deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamaís voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

RESUMO

A β -lapachona (β -lap) é um fármaco com diversas propriedades farmacológicas comprovadas, dentre elas atividade anticâncer. Entretanto, este fármaco apresenta baixo índice terapêutico acarretando em toxicidade para as células. Dessa forma, a incorporação da β -lap em sistemas de liberação controlada, tais como as micropartículas representa uma alternativa viável para a sua aplicação terapêutica. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar microesferas núcleo-coroa de PLGA revestida por quitosana contendo β -lap com propriedades bioadesivas para a administração oral e avaliar a cinética de liberação da β -lap. As microesferas de PLGA foram preparadas pelo método de emulsão múltipla água em óleo em água seguido de evaporação do solvente e, posteriormente, revestidas por quitosana (CS), em diferentes concentrações, pelo método de adsorção (razão CS:PLGA 0:1, 0.3:1, 0.6:1 e 1:1, p/p). O perfil de liberação da β -lap a partir das microesferas foi avaliado simulando as condições gastrointestinais. As microesferas de PLGA revestidas por quitosana apresentaram eficiência de encapsulação da β -lap variando de 74% a 85% (razão β -lap:PLGA 1:15, p/p). As microesferas de PLGA exibiram tamanho de partícula de 6.14 μ m (span de 2.38) e potencial zeta de -9.33 mV. Por outro lado, os sistemas microparticulados revestidos por quitosana apresentaram tamanho de partícula entre 5 - 7 μ m com forma esférica e distribuição de tamanho homogênea (span de 2.00 - 2.84) e potencial zeta positivo, evidenciando a formação das microesferas núcleo-coroa. As análises de caracterização físico-química por FTIR, DSC e XRD sugeriram a formação de interação a nível molecular entre a β -lap e a matriz polimérica. A cinética de liberação da β -lap a partir das microesferas exibiu um padrão de liberação bifásico, no qual o efeito *burst* foi influenciado pelo revestimento de quitosana nas microesferas, pois as microesferas de PLGA apresentaram maior efeito *burst* que as microesferas revestidas por quitosana. Ademais, os parâmetros cinéticos calculados pelo modelo exponencial mostrou que a liberação do fármaco a partir das microesferas CS:PLGA 1:1 favoreceram mudanças no padrão de liberação da β -lap. Portanto, a microencapsulação da β -lap em microesferas núcleo-coroa revestidas por quitosana representa uma alternativa para o desenvolvimento de sistema de liberação controlada administração por via oral devido às propriedades de gastroresistência e bioadesividade que facilitam sua captura pelo epitélio intestinal.

Palavras-Chave: β -lapachona, Microesferas, Caracterização físico-química, Cinética.

ABSTRACT

The β -lapachone (β -lap) is a drug with several pharmacological properties, such as anticancer activity. However, this drug has a low therapeutic index, resulting in toxicity to the cells. Thus, the incorporation of β -lap in drug delivery systems, such as microparticles represents a viable alternative to their therapeutic application. The aim of this study was to develop and characterize chitosan-coated PLGA core-shell microspheres containing β -lap with bioadhesive properties for oral administration and evaluate the β -lap release kinetics. The PLGA microspheres were prepared using water-in-oil-in-water double emulsion method and subsequently coated with chitosan (CS), in different concentrations, by adsorption method (CS:PLGA ratio: 0:1, 0.3:1, 0.6:1 and 1:1, w/w). The β -lap release profile from microspheres was evaluated simulating gastrointestinal conditions. The chitosan-coated PLGA microspheres showed β -lap encapsulation efficiency ranging from 74% to 85% (1:15 β -lap:PLGA ratio, w/w). The PLGA microspheres presented particle size of 6.14 μm (span of 2.38) and zeta potential of -9.33 mV. However, the chitosan-coated microparticles had particle size between 5 and 7 μm with spherical shape and homogenous size distribution (span de 2.00 – 2.84) and positive zeta potential, suggesting core-shell microparticle formation. The microparticulate systems had particle size between 5 μm to 7 μm with spherical shape and regular size distribution. The chitosan-coated PLGA microspheres showed positive zeta potential, indicating the formation of core-shell microspheres. The physicochemical analysis by FTIR, DSC and XRD suggested a molecular level interaction between β -lap and the polymeric matrix. The β -lap kinetic release from microspheres showed a biphasic release pattern, in which the burst effect was influenced by the chitosan coating, because PLGA microspheres showed higher burst effect compared to chitosan-coated microspheres. In addition, kinetic parameters calculated by the exponential model showed that the 1:1 CS:PLGA microspheres allowed changes in the β -lap release patterns. Thus, it is possible to presume that the microencapsulation of β -lap into chitosan-coated core-shell microspheres represents a alternative to oral drug delivery systems due to their gastroresistance and bioadhesive properties that facilitate their uptake by intestinal epithelium.

Keywords: β -lapachone, Microspheres, Physicochemical characterization, Kinetics.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

β -lap	β -lapachona
BET	Brunauer-Emmette-Teller
BJH	Barret- Joyner-Halenda
CIM	Concentração inibitória mínima
CS	Quitosana
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos animais
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Dv	Diâmetro volumétrico médio
DSC	Calorimetria Térmica Diferencial
FDA	Food and drug administration
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
IC ₅₀	Concentração do princípio ativo capaz de inibir 50% da atividade enzimática
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1
PEG	Polietileno glicol
PGA	Polímero de Ácido Glicólico
PLA	Polímero de Ácido Lático
PLGA	Copolímero de Ácido DL-Lático e Glicólico
PVA	Álcool polivinílico
TGA	Análise termogravimétrica
UV-Vis	Espectrofotometria na região Ultravioleta-visível
XRD	Difratometria de Raios-X
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS - REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1	Estrutura química do lapachol (a), β -lapachona (b) e α -lapachona (c). (Fonte: Silva et al., 2003).	20
Figura 2	A árvore do Ipê Roxo (<i>Tabebuia avellandae</i> Lor.). (a) Ipê-roxo com detalhe da sua floração; (b) Cerne do tronco da árvore do Ipê-roxo. (Adaptado de Cunha-Filho, 2008).	21
Figura 3	Aspecto macroscópico (a) e microscópico (b) da β -lapachona (Fonte: Alves et al., 2008; Cavalcanti et al., 2011).	22
Figura 4	Ação inibitória da β -lap sobre as enzimas Topoisomerases I e II. (Fonte: Silva et al., 2003).	25
Figura 5	Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos (Fonte: Lira, 2007).	29
Figura 6	Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas: microesferas (a) e microcápsulas (b). (Fonte: Pimentel et al., 2007).	30
Figura 7	Estrutura molecular do ácido glicólico (PGA), do ácido láctico (PLA) e do ácido láctico-co-glicólico (PLGA). (Disponível em: http://www.drugdeliverytech.com).	33
Figura 8	Rota metabólica de bioreabsorção dos poliésteres (PLA e PGA). (Fonte: Barbanti et al., 2005).	34
Figura 9	Estrutura química da quitosana (a) e da quitina (b). (Fonte: Pillai et al., 2009).	35
Figura 10	Representação das três possíveis rotas de entrada das micropartículas no sistema linfático e circulação sanguínea. (1) Células M das placas de Peyer; (2) Transporte transcelular via enterócitos; (3) Transporte paracelular através das junções oclusas entre as células. (Fonte: Florence, 1997).	40

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO CIENTÍFICO

- Figure 1** The morphological aspect of microspheres by scanning electron 64
microscopy (SEM): β -lap-loaded PLGA microspheres (a) and core-shell
CS/PLGA-microspheres containing β -lap (b). Magnification of 5000 $\times$.
- Figure 2** Adsorption isotherms microspheres with N₂ at 77 K: 1:0 PLGA/CS (■); 65
1:0.3 PLGA/CS(□); 1:0.6 PLGA/CS (●); 1:1 PLGA/CS (○).
- Figure 3** Pore size distribution of microspheres determined using the BJH method 66
applied to N₂ adsorption isotherms: 1:0 PLGA/CS (■); 1:0.3 PLGA/CS(□
); 1:0.6 PLGA/CS (●); 1:1 PLGA/CS (○).
- Figure 4** Infrared spectra of β -lapachone (a), chitosan (b), PLGA (c), β -lap-loaded 67
uncoated PLGA-microspheres (d), and β -lap-loaded microspheres: 0.3:1
CS:PLGA (e), 0.6:1 CS:PLGA (f), 1:1 CS:PLGA (g).
- Figure 5** DSC thermograms of β -lapachone (a), chitosan (b), PLGA (c), β -lap- 69
loaded uncoated PLGA-microspheres (d), and β -lap-loaded microspheres:
0.3:1 CS:PLGA (e), 0.6:1 CS:PLGA (f), 1:1 CS:PLGA (g).
- Figure 6** X-ray diffractograms of chitosan (b), PLGA (c), β -lap-loaded uncoated 69
PLGA-microspheres (d), and β -lap-loaded chitosan coated PLGA-
microspheres 0.3:1 CS:PLGA (e), 0.6:1 CS:PLGA (f), 1:1 CS:PLGA (g).
The insert (a) is the X-ray diffractogram of β -lapachone.
- Figure 7** *In vitro* release of β -lap from β -lap-loaded PLGA/CS microspheres in pH 72
1.2 KCl-HCl buffer solution (Fig. 7a) and pH 7.4 sodium phosphate buffer
solution (Fig. 7b) at 37 °C: 0:1 CS:PLGA (■); 0.3:1 CS:PLGA (□); 0.6:1
CS:PLGA (●); 1:1 CS:PLGA (○). Each point represents the mean of
three different experiments conducted at 37 °C with error bars. Lines
represent the non-linear fitting using of Fickian diffusion model.
-

LISTA DE TABELAS - REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1	Exemplos de sistemas de liberação microparticulados de agentes terapêuticos.	31
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS - ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1	Encapsulation efficiency of β -lap into PLGA microspheres.	61
Table 2	Size properties, zeta potential and encapsulation efficiency of β -lap in CS/PLGA microspheres.	63
Table 3	Porosity measurements for different formulations.	64
Table 4	Calculated release parameters from β -lap-loaded CS-coated PLGA microspheres using exponential and linear models.	70

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS – REVISÃO DA LITERATURA	xi
LISTA DE FIGURAS – ARTIGO CIENTÍFICO	xii
LISTA DE TABELAS – REVISÃO DA LITERATURA	xiii
LISTA DE TABELAS – ARTIGO CIENTÍFICO	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. β -lapachona	20
2.1.1. Atividades farmacológicas da β -lapachona	22
2.1.1.1. Atividade antiproliferativa e antitumoral	24
2.2. Sistemas de liberação controlada de fármacos	28
2.2.1. Micropartículas	29
2.2.1.1. Polímeros utilizados na preparação de micropartículas	32
2.2.1.1.1. Ácido láctico-co-glicólico (PLGA)	32
2.2.1.1.2. Quitosana	34
2.2.2. Métodos de preparação de micropartículas	36
2.2.2.1. Emulsões	37
2.2.3. Absorção de micropartículas pelo trato gastrointestinal	38
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4. OBJETIVO GERAL	52
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
ARTIGO:	54
Core-shell PLGA/chitosan microspheres as β -lapachone oral delivery system	
5. CONCLUSÕES	79
6. PERSPECTIVAS	81
ANEXOS:	83
ANEXO 1	
Normas da revista: International Journal of Pharmaceutics	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A β -lapachona (β -lap, $C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3) é uma ortonaftoquinona que pode ser obtida por semi-síntese do lapachol. O lapachol é uma substância de coloração amarelada extraído do cerne do caule do Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), da família Bignoneaceae, árvore nativa da América do Sul com alta frequência no Brasil (Alves et al., 2008).

A β -lap apresenta um amplo espectro farmacológico com diversas atividades comprovadas, principalmente anticancerígena (Silva et al., 2003) contra diferentes linhagens de células dos cânceres de próstata (Li et al., 1995), mama (Pink et al., 2000) e pulmão (Cunha-Filho, 2008). Vários estudos relatam a ação inibitória deste fármaco sobre as enzimas topoisomerases I e II, as quais atuam sob o DNA nos processos de replicação e de transcrição. A presença de β -lap induz a formação de radicais livres, que por sua vez desencadeiam a apoptose das células cancerígenas (Li et al., 1993a). Além disso, relata-se que o efeito citotóxico da β -lap é aumentado significativamente pela presença da NAD(P)H-quinona oxidorreductase 1 (NQO1), a qual caracteriza-se por sua super-expressão em uma variedade de células tumorais (Blanco et al., 2007).

Apesar do potencial farmacológico comprovado, a β -lap apresenta características limitantes para sua utilização por formas farmacêuticas convencionais relacionadas à baixa hidrossolubilidade e baixa biodisponibilidade que acarretam em toxicidade às células sadias, necessitando de alternativas para sua aplicação biomédica (Nasongkla et al., 2003). Dessa forma, a incorporação da β -lap em sistemas de liberação controlada de fármacos representa uma estratégia tecnológica para superar as limitações apresentadas por esta molécula permitindo deste modo, a sua veiculação na terapêutica do câncer (Blanco et al., 2007; Cavalcanti et al., 2011).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos caracterizam-se por modificar o perfil cinético do fármaco encapsulado, mantendo a concentração plasmática constante, promovendo uma vetorização do fármaco às células-alvo, reduzindo a frequência de doses administradas e redução dos efeitos colaterais e tóxicos (Hamidi et al., 2008; Singh et al., 2009). Consta na literatura o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para a β -lap, tais como lipossomas (Cavalcanti et al., 2011) e micelas (Blanco et al., 2007) para administração por via venosa. Entretanto, a administração oral destas formulações farmacêuticas se torna inviável, pois são susceptíveis ao meio

gastrointestinal. Assim, a incorporação da β -lap em micropartículas com propriedades bioadesivas representa uma proposta inovadora para o uso deste fármaco para veiculação por administração oral.

As micropartículas poliméricas merecem destaque, tendo em vista a estabilidade físico-química e biológica, sendo utilizadas para a encapsulação de diferentes substâncias, destinadas principalmente para a via oral de administração (Garbayo et al., 2008; Wischke et al., 2008). As micropartículas apresentam diâmetro variando de 1 μ m a 1000 μ m, classificando-se em microesferas e microcápsulas. Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, tais como os poliésteres poli- ϵ -caprolactona (PCL), poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA) e seus copolímeros de ácido láctico-co-glicólico (PLGA) são comumente empregados no desenvolvimento de micropartículas (Santos-Magalhães et al., 2000; Fernández-Carballido et al., 2008).

O PLGA é um polímero sintético amplamente utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Nafee et al., 2009). Por outro lado, a quitosana, um polissacarídeo obtido a partir a desacetilação da quitina, possui além das características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, propriedades como mucoadesividade a superfícies negativas, a exemplo da mucosa intestinal, sendo, portanto, amplamente explorada em sistemas de liberação controlada por via oral (Hejazi et al., 2003; Pillai et al., 2009). Deste modo, torna-se pertinente o desenvolvimento de sistemas microparticulados revestidos por quitosana formando micropartículas com estrutura núcleo-coroa para a administração de fármacos por via oral.

Assim, este estudo tem o objetivo de desenvolver micropartículas núcleo-coroa de PLGA e quitosana contendo β -lap com propriedade bioadesivas para administração oral. Além disso, propõe caracterizá-los quanto às propriedades físico-químicas, assim como avaliar a cinética de liberação da β -lap *in vitro*. Desta forma, o presente trabalho viabiliza a ampliação dos estudos com a β -lap explorando a tecnologia da microencapsulação, contribuindo como uma alternativa em potencial no avanço da utilização deste princípio ativo na terapêutica.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. β -lapachona

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos de acordo com o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico, classificando-se como benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas. Baseado na isomeria das naftoquinonas, o anel naftalênico pode apresentar, dependendo das disposições relativas das carbonilas, diferentes compostos. No arranjo da base naftalênica tem-se a forma isomérica 1,2 ou orto-quinonoídica, quando as carbonilas são vizinhas (Fig. 1b), ou 1,4, para-quinonoídica, com as carbonilas dispondo-se com dois carbonos entre si (Fig. 1c). Estas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica (Silva et al., 2003).

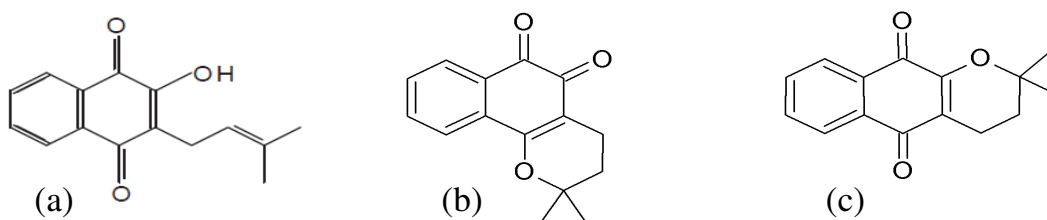


Fig. 1. Estruturas químicas do lapachol (a), β -lapachona (b) e α -lapachona (c). (Fonte: Silva et al., 2003).

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol (Fig. 1a) encontrado como constituinte de várias plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae, sendo mais comum na família Bignoneaceae, particularmente no gênero *Tabebuia* (Fonseca et al., 2004). O lapachol é quimicamente, a 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butanil)-1,4-naftoquinona, uma substância amarela extraído do cerne do ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor) (Fig. 2), árvore nativa da América do Sul com alta frequência no Brasil (Alves et al., 2008). O tronco da árvore do ipê roxo (Fig. 2b) é o componente mais importante no que se refere seu potencial terapêutico, já que a partir dele se obtém os extratos os quais a medicina popular atribui várias propriedades curativas (Cunha-Filho, 2008). O lapachol foi avaliado clinicamente nos tratamentos de carcinoma de Walker-256 e do sarcoma de Yoshida, com a produção do medicamento sendo realizada

pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Embora promova a regressão definitiva de neoplasias em aproximadamente 30% dos portadores com estas patologias, além de agir como analgésico, seus efeitos colaterais, tais como anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais agravam o quadro clínico de pacientes com câncer (Silva et al., 2003).



Fig. 2. A árvore do Ipê Roxo (*Tabebuia avellandae* Lor.). (a) Ipê-roxo com detalhe da sua floração; (b) Cerne do tronco da árvore do Ipê-roxo. (Adaptado de Cunha-Filho, 2008).

A β -lapachona (β -lap) ($C_{15}H_{14}O_3$) classifica-se como orto-naftoquinona conhecida quimicamente por 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butanil)-1,2-naftoquinona, derivada do lapachol (Lee et al., 2005). A β -lap é produzida em larga escala por semi-síntese, especificamente pela reação de ciclização ácida do lapachol pelo tratamento com ácido sulfúrico (Cunha-Filho et al., 2009). Tal qual o lapachol, esta orto-naftoquinona apresenta diversas atividades farmacológicas (Silva et al., 2003). A β -lap caracteriza-se por ser uma substância de caráter hidrofóbico (0,16 mM ou 0,038 mg/mL) (Nasongkla et al., 2003), porém muito solúvel em quase todos os solventes orgânicos. Além disso, possui uma forma bem definida de cristais aciculares, laranja-avermelhado, visíveis a

olho nu (Fig. 3). O ponto de fusão da β -lap está entre 154 °C e 156 °C e sua massa molar é 242,3 g/mol (Alves et al., 2008).

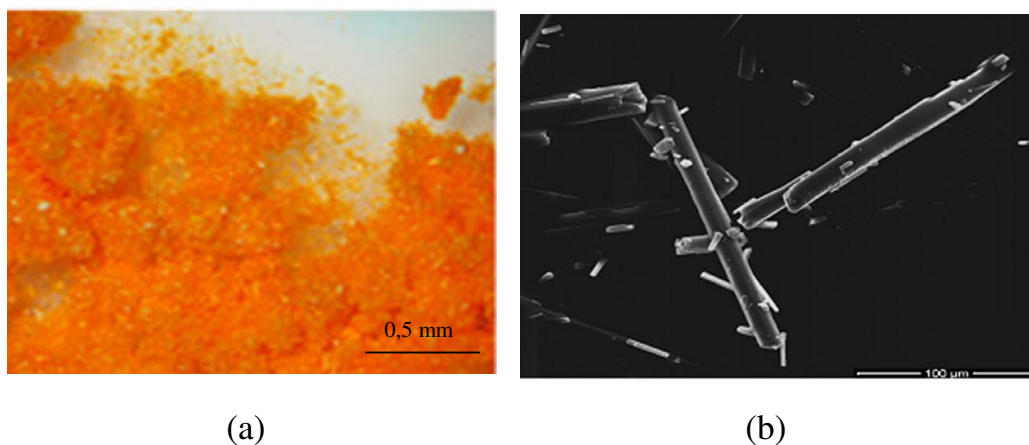


Fig. 3. Aspecto macroscópico (a) e microscópico (b) da β -lapachona (Fonte:Alves et al., 2008; Cavalcanti et al., 2011).

2.1.1. Atividade Farmacológica da β -lapachona

A β -lap tem sido amplamente estudada com abrangência mundial desde a década de setenta, devido ao seu excelente potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo* (Li et al., 1999; Li et al., 2003). A sua alta toxicidade relacionada à hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade limitam sua utilização farmacêutica, estimulando o desenvolvimento de novas pesquisas visando sua utilização na terapêutica (Nasongkla et al., 2003; Cavalcanti et al., 2011). Estudos mostram que a toxicidade aguda (DL_{50}) em ratos albinos via intraperitoneal do lapachol foi de 1600 mg/Kg, da α -lapachona 350 mg/Kg e da β -lapachona 80 mg/Kg (Santana et al., 1968). Apesar da β -lapachona possuir atividades antineoplásica e antibiótica, superiores às do lapachol, este isômero apresenta-se 20 vezes mais tóxico que o lapachol (Cunha-Filho, 2008).

A β -lap apresenta uma variedade de efeitos farmacológicos, tais como: antibacteriana (Antunes et al., 2006), antifúngica (Guiraud et al., 1994; Medeiros et al., 2010), tripanossomicida (Goulart et al., 1997; Moura et al., 2001; Silva et al., 2003), antiviral (Li et al., 1993b) e principalmente atividade antineoplásica contra linhagens celulares cancerígenas humanas (Woo et al., 2005). Muitos estudos nos últimos anos são dirigidos a desvendar os mecanismos bioquímicos relacionados à ação antitumoral

em diferentes tipos de linhagens cancerígenas, como o de mama, pulmão, colo-retal, próstata, melanomas e leucemias (Planchon et al., 1995; Cunha-Filho, 2008).

Estudos realizados por Antunes e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de naftoquinonas a exemplo do lapachol, β -lapachona e α -lapachona frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados mostraram que o lapachol e seus análogos (200 μ g/mL) apresentaram potencial antimicrobiano diante das cepas testadas, com maior atividade para *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Observou-se ainda, que as substâncias testadas apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 100 μ g/mL para as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Além disso, a β -lap apresentou CIM de 50 μ g/mL frente *S. aureus*.

Considerando a atividade antifúngica da β -lap, Medeiros e colaboradores (2010) investigaram a atividade antifúngica *in vivo* da β -lap contra infecção disseminada por *Cryptococcus neoformans* em camundongos *swiss*. Sete dias após a infecção, os camundongos foram divididos em grupos e tratados por via intraperitoneal com β -lap (10 mg/Kg) por 7 e 14 dias. O tratamento com β -lap reduziu as leveduras do baço e do fígado após sete dias, e a carga de fungos diminuiu cerca de 10^4 vezes nos pulmões e no cérebro 14 dias após a infecção, quando comparado ao grupo controle (tratados com tampão PBS), evidenciando o potencial antifúngico da β -lap.

A atividade tripanossomicida *in vitro* de várias quinonas, dentre elas a β -lap foi evidenciada por Salas e colaboradores (2008). Os resultados mostraram inibição do crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* e os compostos testados apresentaram atividade similar ou maior quando comparado com fármacos tripanossomicida convencionais, como nifurtimox e benzonidazol. Silva e colaboradores (2003) ressaltam a ação mais ativa contra o *Trypanosoma cruzi* da β -lap quando comparada a do seu isômero natural, α -lapachona.

Estudos descritos por Moon e colaboradores (2007) avaliaram o mecanismo molecular de ação da β -lap na expressão do óxido nítrico (NO), da cicloxigenase (COX-2), das prostaglandinas E_2 e das citocinas proinflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em células de microglia da linhagem BV2. O tratamento com β -lap inibiu significativamente o óxido nítrico e a liberação de prostaglandinas E_2 na microglia. Liu e colaboradores (1999) avaliaram a ação antiinflamatória da β -lap e também puderam

observar a inibição da produção de NO em macrófagos alveolares e em vasos isolados de ratos. Estes resultados demonstram que a β -lap apresenta potencial anti-inflamatório para atenuar doenças inflamatórias.

2.1.1.1. Atividade antiproliferativa e antitumoral

O crescimento no índice de casos de câncer impulsiona a busca por novos tratamentos envolvendo o desenvolvimento de agentes antitumorais que alcancem o efeito terapêutico desejado com conseqüente redução dos efeitos colaterais. Neste aspecto, a β -lap tem sido amplamente investigada nos últimos anos, pois esta molécula possui atividades antiproliferativa e antitumoral comprovadas por diversas pesquisas. Os estudos de atividade antitumoral da β -lap estão sendo direcionados a desvendar os mecanismos bioquímicos relacionados a esta ação anticâncer utilizando diferentes linhagens celulares de câncer de mama (Pink et al., 2000), colo-retal (Huang et al., 1999), pâncreas (Ough et al., 2005), próstata (Planchon et al., 2001), melanomas (Li et al., 2000) e leucemias (Planchon et al., 1995). Sabe-se que células normais são relativamente mais resistentes a β -lap do que as células tumorais em cultura (Li et al., 2003).

Vários estudos relatam a ação inibitória da β -lap sobre as enzimas topoisomerasas I e II, como mostra a Figura 4. Estas enzimas atuam sob o DNA nos processos de replicação e de transcrição (Li et al., 1993a; Frydman et al., 1997). Os primeiros relatos relacionaram a atividade da β -lap com a inibição da topoisomerase I, que retém a enzima no DNA bloqueando assim, a continuidade do processo replicativo e induzindo a apoptose (Boothman et al., 1989; Planchon et al., 1995; Li et al., 1995). De acordo com Li e colaboradores (1993a), este mecanismo de ação da β -lap sobre a topoisomerase I apresenta-se diferente em relação a outros fármacos antitumorais, como a camptotecina, a qual atua estabilizando o complexo enzima-DNA. A incubação direta desta substância com a topoisomerase I, antes da adição de DNA como substrato, aumenta drasticamente o efeito inibitório, sugerindo a interação direta da β -lap com a topoisomerase I. Posteriormente, se provou a ação da β -lap sobre a enzima topoisomerase II, inibindo sua atividade, o que resulta em citotoxicidade. A topoisomerase II é uma enzima fundamental para o funcionamento normal da célula, pois ela mantém a integridade do DNA, reparando-o quando danificado (Frydman et al., 1997).

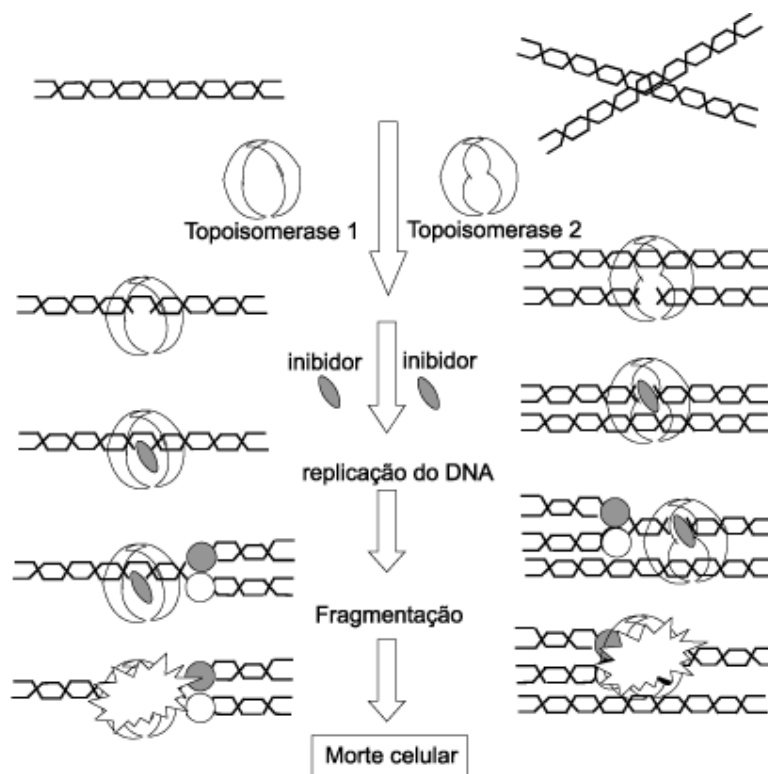


Fig. 4. Ação inibitória da β -lap sobre as enzimas Topoisomerases I e II. (Fonte: Silva et al., 2003).

Verificou-se que o efeito citotóxico da β -lap é aumentado significativamente pela presença da NAD(P)H: quinona oxidoredutase 1 (NQO1), uma flavoproteína super-expressa (até 20 vezes mais do que em células normais) em uma variedade de células cancerígenas. Na presença da NQO1, a β -lap induz o estresse oxidativo nas células, devido à formação de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 e O_2), desencadeando a apoptose das células cancerígenas (Planchon et al., 2001; Reinicke et al., 2005; Blanco et al., 2007). Pink e colaboradores (2000) mostraram que a resposta citotóxica das células de câncer de mama à β -lap foi evidenciada pela expressão de NQO1. Nesse estudo, desenvolveu-se a transfecção de uma linhagem celular deficiente na expressão de NQO1 (MDA-MB-468) com um plasmídeo de expressão de NQO1. Observou-se que após o tratamento das células com a β -lap (solubilizada em Me_2SO e adicionada a cultura de células na diluição 1:1000), obteve-se um aumento da resposta apoptótica e da letalidade. Planchon e colaboradores (2001) constataram que a expressão da enzima NQO1 em células prostáticas cancerígenas (LNCaP) é o fator determinante para a apoptose e letalidade após exposição a β -lap (concentração de 25 μM e solubilizada em

DMSO). Em seus experimentos, células LNCaP deficientes de NQO1 foram significativamente mais resistentes a apoptose do que as células expressoras de NQO1. Os estudos de Ough e colaboradores (2005) mostraram que a β -lap apresentou atividade antiproliferativa e antitumoral *in vitro* e *in vivo*, respectivamente contra células de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2), devido à alta expressão de NQO1. Nos estudos *in vivo*, células tumorais MIA PaCa-2 (2×10^6) foram inoculadas por via subcutânea nos camundongos. O tratamento dos animais envolveu a administração da β -lap solubilizada em DMSO (50 μ M, 250 μ M ou 500 μ M) ou complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina (50 mg/Kg ou 75 mg/Kg) por via intratumoral ou intraperitoneal. Observou-se que a β -lap solubilizada em DMSO demonstrou maior inibição tumoral quando administrada por via intratumoral em comparação a via sistêmica. Além disso, a inibição tumoral da β -lap foi maior quando complexada com a hidroxipropil- β -ciclodextrina do que dissolvido em DMSO. Além disso, constatou-se que as células de câncer de pâncreas foram mais sensíveis a β -lap do que as células normais, assim como evidenciado nos estudos de Planchon e colaboradores (2001). Em todos os estudos descritos (Pink et al., 2000; Planchon et al., 2001; Ough et al., 2005), a administração concomitante do dicumarol, um inibidor de NQO1, com a β -lap protegeu significativamente as células que expressam NQO1, bloqueando a resposta apoptótica e letalidade, reduzindo assim, a citotoxicidade da β -lap.

Estudos mostram que as células tumorais expressam mutação na via p53 (Huang et al., 1999). A β -lap tem mostrado induzir morte celular apoptótica em linhagens celulares cancerígenas humanas, como leucemia e câncer de próstata por via p53 independente (Chau et al., 1998; Li et al., 1999). Huang e colaboradores (1999) avaliaram o efeito citotóxico da β -lap em células de câncer do cólon humano e constataram que a β -lap induziu a apoptose das células tumorais independente da expressão da proteína p53.

A β -lap também atua pela ativação direta dos *checkpoints*, pontos de checagem que ocorrem em cada fase do ciclo catalítico e expressam a ação da topoisomerase I como, por exemplo, os pontos de checagem G1 e S. A ação do *checkpoint* consiste em controlar o dano no DNA, perceber os danos, traduzir a informação e executar a resposta ao dano no DNA. As células então sofrem apoptose quando o dano é irreversível, ou quando as condições são adversas para o seu crescimento. Os

checkpoints são deprimidos nas células cancerígenas, resultando em acúmulo de dano genético (Li et al., 2003).

Outro fator importante no mecanismo de ação da β -lap relaciona-se com a inibição da telomerase, enzima responsável pela adição de repetições teloméricas (telômeros) no fim da replicação dos cromossomos (Oulton et al., 2000), os quais estabilizam o cromossomo prevenindo a perda de informação genética. Em células somáticas humanas normais com pouca ou nenhuma atividade da enzima telomerase, os DNAs teloméricos diminuem progressivamente com cada divisão celular. Telômeros muito pequenos sugerem uma parada irreversível de ciclo celular e envelhecimento celular (Odagio et al., 2003). Dessa forma, a β -lap atua nas células de câncer inibindo a telomerase, contribuindo assim, para a inibição de processos tumorais (Woo et al., 2005).

Li e colaboradores (1999) demonstraram em estudos *in vitro* e *in vivo* que a β -lap combinada com outras substâncias que atuam em diferentes mecanismos celulares pode ser uma boa alternativa quimioterápica. Os experimentos do estudo *in vitro* foram realizados com células humanas de câncer do ovário (A2780DDP), próstata (DU145), mama (MCF-7 and 21 MT), melanoma (Skmel-28), pulmão (G480), cólon (HT-29) e pâncreas (ASPC-1). As células foram tratadas com β -lap (4 μ M) e taxol (0,02 μ M), isoladamente e com a associação dos dois fármacos. Os estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com β -lap e taxol, isoladamente diminuem parcialmente a proliferação celular, enquanto que a β -lap combinada com o taxol constitui uma associação efetiva contra as células humanas de câncer. Por outro lado, foram realizados estudos *in vivo*, inoculando células de câncer de ovário em camundongos por injeção intraperitoneal. Após dez dias de inoculação do tumor, os camundongos foram tratados com β -lap (25 – 50 mg/Kg) e após 1 h tratados com taxol (1 mg/Kg). Grupos de camundongos também foram tratados com β -lap (25–50 mg/kg i.p.) e com taxol (1 mg/kg i.p), isoladamente. Observou-se redução pronunciada do número de tumores (75%) nos animais tratados com β -lap, enquanto que os animais tratados com taxol evidenciaram menor redução dos nódulos tumorais (60%). Em contrapartida, evidenciou-se um sinergismo na combinação de β -lap e taxol, eliminando os focos tumorais e confirmando os resultados do estudo *in vitro*, sugerindo uma possível quimioterapia em humanos baseada na combinação destes dois fármacos.

Apesar da comprovada ação antitumoral da β -lap, as limitações relacionadas ao caráter hidrofóbico e a toxicidade tornam este fármaco de limitado uso médico, necessitando, portanto, de uma alternativa eficaz para sua utilização (Silva et al., 2003). O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como micropartículas, que permitam atingir as células tumorais, mais especificamente do que o fármaco administrado por formas farmacêuticas convencionais representam uma alternativa racional para a administração da β -lap. Dessa forma, é possível minimizar os efeitos colaterais causados por este fármaco, favorecendo o aumento da complacência do paciente ao tratamento (Singh et al., 2009).

2.2. Sistemas de liberação controlada de fármacos

Os sistemas de liberação controlada atuam de forma a permitir que o fármaco tenha sua eficácia e segurança aumentada durante a terapia, uma vez que eles são absorvidos ou encapsulados nos carreadores, atenuando as complicações decorrentes do tratamento por formas farmacêuticas convencionais. O tratamento por sistemas farmacêuticos convencionais pode ocasionar uma baixa eficácia terapêutica, os quais muitas vezes acarretam risco à saúde dos pacientes (Hamidi et al., 2008).

A Figura 5 representa um esquema ilustrativo da farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos. Pode-se observar que as formas de dosagem convencional conduzem freqüentemente a picos altos de concentrações do fármaco na corrente sanguínea. A maioria do conteúdo do princípio ativo é liberado logo após a sua administração, causando rápido aumento da concentração do fármaco nos níveis plasmáticos. O pico e o declínio são agudos, causando possíveis efeitos colaterais, bem como ineficiência (nível subterapêutico), respectivamente (Hamidi et al., 2008; Singh et al., 2009). Por outro lado, os sistemas de liberação controlada permitem a aplicação de fármacos com baixo índice terapêutico; liberação controlada do fármaco; direcionamento a alvos específicos; proteção do princípio ativo; redução do número de doses e quantidade do fármaco administrado, bem como manutenção da concentração plasmática constante do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de doses tóxicas e sub-terapêuticas; redução de efeitos adversos; maior conveniência para o paciente; e redução dos custos na saúde (Brannon-Peppas, 1995; Petitti et al., 2008).

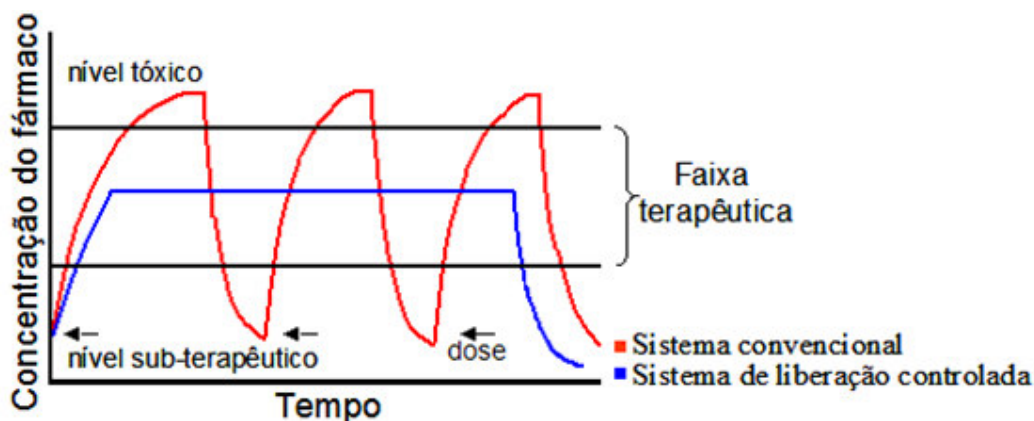


Fig. 5. Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos (Fonte: Lira, 2007).

2.2.1. Micropartículas

A microencapsulação surgiu na década de sessenta com o objetivo da transformação de líquidos em pós com tamanho de partículas na escala micrométrica. A microencapsulação apresenta ampla aplicação tecnológica nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética, permitindo a proteção de substâncias lábeis e voláteis e o controle da liberação do fármaco encapsulado. Associado a estas vantagens, permite melhorias na biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade do princípio ativo (Pimentel et al., 2007).

Micropartículas poliméricas estão sendo cada vez mais investigadas por suas propriedades de liberação controlada do fármaco encapsulado. O termo micropartículas é definido como pequenas partículas sólidas e esféricas com diâmetro variando de 1 a 1000 μm (Tan et al., 2010). As micropartículas poliméricas podem ser classificadas como microesferas ou microcápsulas, diferindo com relação à estrutura da partícula, conforme representado na Figura 6.

Denominam-se microesferas sistemas de matrizes sólidas onde um material polimerizado forma uma rede tridimensional, na qual a substância ativa pode ser adsorvida, incorporada ou ligada covalentemente na matriz polimérica ou na superfície. Por outro lado, as microcápsulas são sistemas do tipo reservatório formadas por uma cavidade central oleosa denominada núcleo e um material de parede ou revestimento, que circunda a região central, de modo que o princípio ativo pode estar contido no núcleo oleoso e/ou disperso na parede polimérica (Silva et al., 2003b).

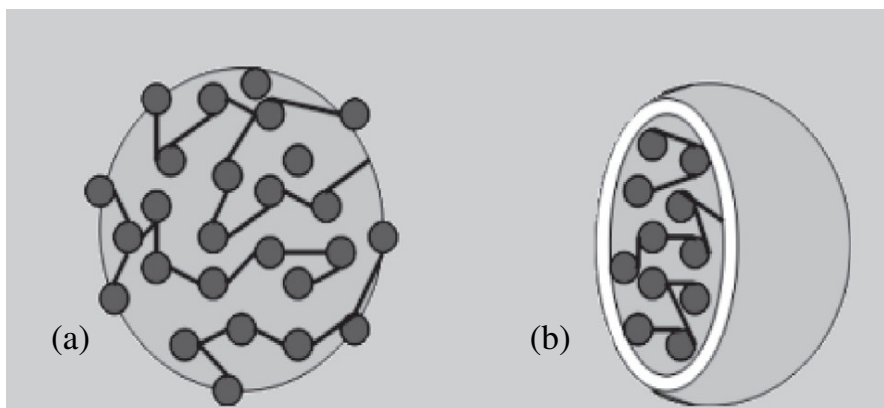


Fig. 6. Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas: microesferas (a) e microcápsulas (b). (Fonte: Pimentel et al., 2007).

A microencapsulação é uma técnica que permite encapsular substâncias sólidas ou líquidas no interior de matrizes poliméricas ou revesti-las com polímeros. De acordo com Silva e colaboradores (2003b), esta técnica tem sido utilizada, especialmente na área farmacêutica, podendo ser utilizada com as seguintes finalidades:

- Produção de formas farmacêuticas de liberação controlada, sustentada e vetorizada;
- Diminuir as flutuações plasmáticas de certos fármacos, diminuindo ocorrência de efeitos colaterais, especialmente quando administrado por via oral;
- Proteger substâncias que degradam facilmente pela ação de agentes externos, tais como umidade, luz e oxigênio, promovendo uma melhoria na sua estabilidade;
- Proteger fármacos degradáveis no trato gastrointestinal;
- Mascaram o sabor e/ou odor desagradáveis de certas substâncias;
- Conversão de líquidos em sólidos.

Devido às vantagens da microencapsulação, uma variedade de compostos bioativos das mais diversas classes terapêuticas têm sido incorporados em micropartículas, como antibióticos, anticancerígenos, antituberculosstáticos, antifúngicos, antiinflamatórios, analgésicos, proteínas, antivirais, dentre outros, e versatilidade de vias de administração (oral, intramuscular, subcutânea, bioadesiva, injetável, pulmonar) estando alguns destes exemplos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de sistemas de liberação microparticulados de agentes terapêuticos.

Sistema microparticulado	Via de Administração	Fármaco	Indicação Terapêutica
PLGA/quitosana	Oral	Paclitaxel (Chakravarthi et al., 2011)	Antitumoral
PLGA	Injetável	Lidocaína (Klose et al., 2006)	Anestésico
PLGA	Injetável	Ácido Úsnico (Ribeiro-Costa et al., 2004)	Antitumoral
PLGA	Oral	Trans-desidrocrotonina (DCTN) (Moraes et al., 2009)	Hipoglicemiante
PLGA/Alginato	Oral	Paracetamol (Wang et al., 2010)	Analgésico
PLGA/Quitosana	Nebulização (Aerosol)	Rinfampicina (Manca et al., 2008)	Antituberlostática
Alginato/Quitosana	Oral	Tamoxifeno (Coppi et al., 2009)	Antitumoral
Alginato/Quitosana	Oral	Budesonida (Crcarevska et al., 2008)	Anti-inflamatório

A determinação do sistema de liberação está relacionada principalmente, a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, às propriedades do fármaco e a via de administração (Rossi-Bergmann, 2008). Visando o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada da β -lap por via oral, torna-se viável a incorporação em micropartículas poliméricas. A escolha de sistemas microparticulados para administração por via oral tem como suporte estudos que mostram que o *uptake* celular

de micropartículas é significativamente aumentado em comparação com as nanopartículas em células Caco-2 (Chakravarthi et al., 2011). Por outro lado, os lipossomas apresentam limitações para a administração por via oral, pois não são resistentes às variações do trato gastrointestinal, sendo afetados pelos sais biliares que se incorporam em suas membranas, induzindo mudança da fase lamelar para micelar, gerando uma série de desestabilizações (Machado et al., 2007).

Consta na literatura o desenvolvimento de complexos de inclusão β -lap:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina encapsulado em lipossomas. Os resultados mostram a formação do complexo de inclusão e uma possível mudança na farmacocinética da β -lap (Cavalcanti et al., 2011). Entretanto, objetivando a administração oral da β -lap torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas com propriedades que favoreçam a sua veiculação no trânsito gastrointestinal e sua associação com a mucosa intestinal e *uptake* celular. Assim, sistemas microparticulados com estrutura núcleo-coroa constituídos de PLGA e quitosana apresentam as características necessárias para a veiculação de fármacos por via oral (Chen et al., 2009; Semete et al., 2010; Chakravarthi et al., 2011).

2.2.1.1. Polímeros utilizados na preparação de micropartículas

Sistemas particulados poliméricos podem ser produzidos em escalas nano e micrométrica, consistindo em sólidos bioerosíveis capazes de incorporar inúmeros agentes terapêuticos (Wischke et al., 2008). Muitos materiais podem ser utilizados para a obtenção de micropartículas, tais como os polímeros naturais (gelatina, goma arábica, alginato, quitosana e os derivados celulósicos), assim como os polímeros biodegradáveis sintéticos. Dentre os polímeros sintéticos, destacam-se os poli (ésteres) alifáticos como o ácido láctico (PLA), o ácido glicólico (PGA) e seu copolímero ácido láctico-co-glicólico (PLGA) que têm sido alvo de muitos estudos (Fernández-Carballido et al., 2008; Garbayo et al., 2008).

2.2.1.1.1. Ácido láctico-co-glicólico (PLGA)

Os copolímeros de PLGA são formados por unidades monoméricas de ácido láctico e ácido glicólico (Fig. 7). O ácido láctico é mais hidrofóbico em comparação ao ácido glicólico e dessa forma, copolímeros de PLGA ricos em ácido láctico apresentam-

se com característica menos hidrofílica, devido a uma menor absorção de água, favorecendo a uma degradação mais lenta (Jain et al., 2000).

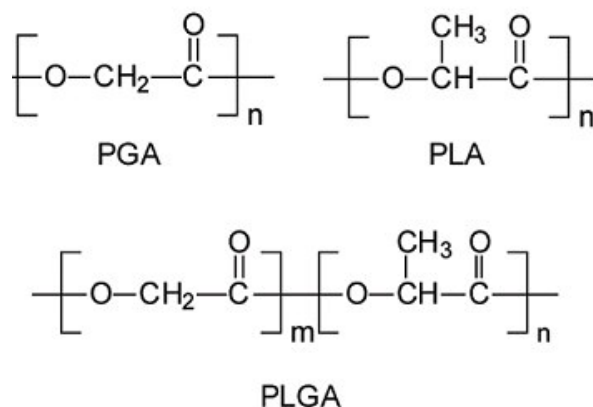


Fig. 7. Estrutura molecular do ácido glicólico (PGA), do ácido láctico (PLA) e do ácido láctico-co-glicólico (PLGA). (Disponível em: <http://www.drugdeliverytech.com>).

Nas últimas décadas, poliésteres como o PLGA têm sido amplamente utilizados nas áreas farmacêutica e biomédica como sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como micropartículas e nanopartículas e, como engenharia de tecidos, devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Ele é um dos poucos polímeros sintéticos aprovados para uso clínico em humanos (Fredenberg et al., 2011). Há cerca de 40 anos, tais poliésteres alifáticos sintéticos são amplamente empregados como suturas médicas, explorando justamente suas propriedades biodegradáveis e bioreabsorvíveis (Wang et al., 2010). Originalmente usados como fios de sutura (Dexon®, Vicryl®, Maxon®, PDS®, etc), atualmente podem ser encontrados em diversos produtos comerciais de fixação óssea, também aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), (Biofix®, FixSorb®, Neofix®, ResorPin®, etc) (Barbanti et al., 2005).

De acordo com a Figura 8, o PLGA é um polímero relativamente hidrofóbico, instável em condições de umidade e sua biodegradação resulta em subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água). As unidades monoméricas do PLGA são eliminadas pelo organismo através do ciclo de Krebs, como dióxido de carbono e água, podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração (Barbanti et al., 2005).

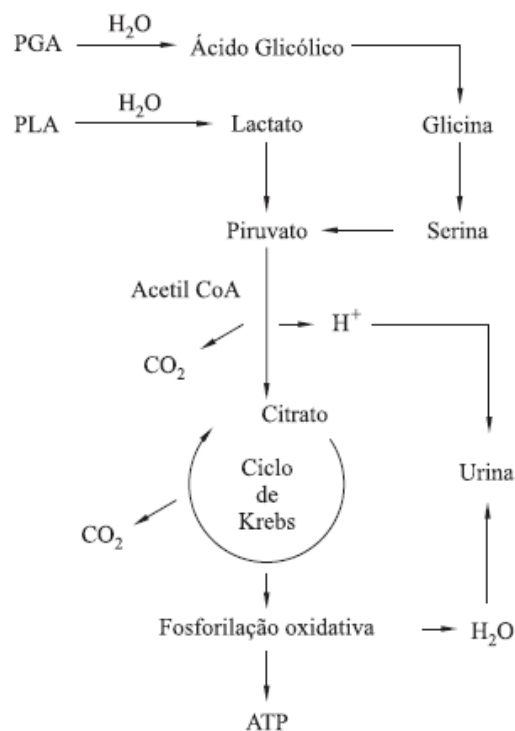


Fig. 8. Rota metabólica de bioreabsorção dos poliésteres (PLA e PGA). (Fonte: Barbanti et al., 2005).

A baixa imunogenicidade, baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas e uma cinética de biodegradação previsível são algumas das propriedades que justificam o uso difundido do PLGA na preparação de sistemas micro e nanoparticulados (Tabela 1) (El-Sherbiny et al., 2011).

O desenvolvimento de sistemas microparticulados bioadesivos representa uma opção viável para os sistemas de liberação controlada de fármacos para a administração por via oral. Assim, o revestimento da superfície das micropartículas de PLGA por um polímero bioadesivo, tal como a quitosana favorece a interação das partículas com a superfície da mucosa intestinal, aumentando a probabilidade do *uptake* celular (Zheng et al., 2004; Chen et al., 2009; Semete et al., 2010; Parveen et al., 2011).

2.2.1.1.2. Quitosana

Dentre os polímeros naturais, a quitosana destaca-se por ser um polímero hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade (Sinha et al., 2004).

A quitosana (Fig. 9a) é um polissacarídeo definido como um copolímero linear de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (D-glicosamina) e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose (N-acetil-D-glicosamina), de composição variável em função do grau residual de acetilação, cujas unidades são unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (George et al., 2006; Pillai et al., 2009). A quitosana pode ser obtida a partir da quitina pela reação de desacetilação em soluções alcalinas (Silva et al., 2006), ou ainda pode estar presente naturalmente na parede celular de alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (Amorim et al., 2003, Amorim et al., 2006). A quitina (Fig. 9b) é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza seguido da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, constituindo também a parede celular de fungos e leveduras (Silva et al., 2006; Onesippe et al., 2008; Zhu et al., 2009). Na quitina, o grau de acetilação (DA) é normalmente 0.90, enquanto na quitosana, um derivado N-desacetilado da quitina, o DA é inferior a 0.35 (Pillai et al., 2009).

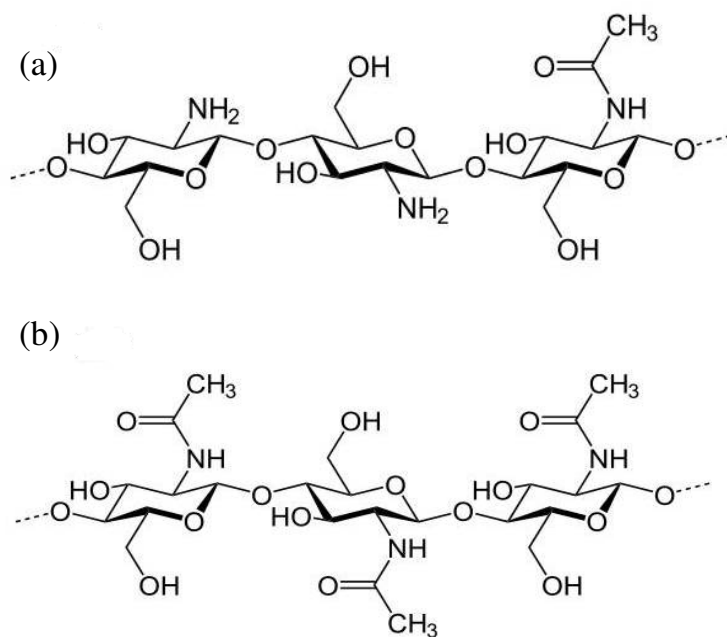


Figura 9. Estrutura química da quitosana (a) e da quitina (b).
(Fonte: Pillai et al., 2009).

Na produção de quitosana pelo processo de desacetilação da quitina, os grupamentos acetil ($-\text{COCH}_3$) da quitina são substituídos em graus variados por hidrogênio formando grupos amino reativos ($-\text{NH}_2$), na posição do carbono-2 de cada

unidade glicosídica (Antonino, 2007). Devido à presença de amino grupos primários na sua estrutura, a quitosana apresenta propriedades interessantes para utilização na área farmacêutica. Comparada a muitos outros polímeros naturais, a quitosana tem a vantagem de apresentar carga positiva, o que confere à mesma propriedade de mucoadesividade a superfícies negativas, como a mucosa intestinal (Hejazi et al., 2003).

A quitosana tem sido extensivamente utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, apresentando vantagens relacionadas à habilidade de modificar a liberação de substâncias ativas, possibilidade de utilização de técnicas de obtenção que não envolvam solventes orgânicos e, principalmente, a propriedade de mucoadesividade, que aumenta o tempo de associação com a mucosa intestinal (Kumar, 2000). A propriedade de mucoadesão apresentada pela quitosana representa uma característica importante na sua aplicação como polímero de revestimento de micropartículas veiculadas por administração oral. Isto está relacionado com a interação estabelecida com a mucosa intestinal permitindo um maior tempo de permanência das partículas neste meio e favorecendo o transporte através das células intestinais (Manca et al., 2008; Chakravarthi et al., 2011).

2.2.2. Métodos de preparação de micropartículas

O processo de microencapsulação é realizado por diferentes métodos favorecendo a formação de micropartículas com tamanho reduzido e com versatilidade e adaptação a uma grande variedade de formas farmacêuticas. As características dos sistemas de liberação dependem, dentre outros fatores, do método de preparação (Dillen et al., 2004). Dessa forma, durante a escolha do método de microencapsulação é importante conhecer as características físico-químicas do fármaco e do polímero, quanto a polaridade, solubilidade, estabilidade, taxa de degradação e o ponto de fusão. A propriedade do fármaco mais importante a ser avaliada para o estudo inicial da microencapsulação é a sua solubilidade em água, em solventes orgânicos e em cosolventes (Silva et al., 2003b).

Os sistemas microparticulados podem ser desenvolvidos por métodos distintos, tais como: a coacervação simples, a coacervação complexa, a emulsão e evaporação do solvente, polimerização interfacial e *spray drying* (Reis et al., 2006).

Dentre os sistemas microparticulados desenvolvidos para formulação de micropartículas de PLGA, o método de formulação mais usado é o de emulsificação

seguido por evaporação do solvente. Manca e colaboradores (2008) desenvolveram micropartículas de PLGA contendo rifampicina utilizando a técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente, obtendo formulações com distribuição homogênea das partículas e boa eficiência de encapsulação do fármaco. Resultados semelhantes foram encontrados por Klose e colaboradores (2010) ao encapsular ibuprofeno em micropartículas de PLGA por emulsão múltipla água em óleo em água (a/o/a) com evaporação do solvente.

2.2.2.1 Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, definidos como a mistura íntima de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de glóbulos. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, estes sistemas classificam-se em óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o). As emulsões, em geral são compostas por três fases: fase aquosa, fase oleosa e fase emulsificante (Florence et al., 1998). As propriedades físico-químicas destas fases influenciam o processo de obtenção, o comportamento de fases, o tipo e a estabilidade do sistema em dispersão (Bouchama et al., 2003). Os agentes tensoativos ou emulsificantes são moléculas com características anfifílicas que se adsorvem na interface entre a fase dispersa e a dispersante durante o processo de emulsificação, e podem prontamente prevenir fenômenos de instabilidade, e conseqüentemente uma possível separação de fases (Florence et al., 1998).

Os métodos de emulsificação com evaporação do solvente costumam ser bastante utilizados e envolvem a formação de emulsões com fases aquosas e oleosas orgânicas com a retirada do solvente orgânico ao final do processo. O polímero e o fármaco são solubilizados nas fases apropriadas e estas são emulsificadas em uma fase contínua (aquosa ou oleosa) contendo um emulsificante adequado com um baixo poder de solubilização do fármaco. No caso de fases contínuas aquosas, o álcool polivinílico (PVA) é o emulsificante mais usado. Ao final do processo, os solventes voláteis podem ser removidos por evaporação ou por extração da fase externa (Wischke et al., 2008). Os métodos de emulsificação desenvolvidos podem ser emulsões simples ou ainda emulsões múltiplas.

Emulsão múltipla são sistemas onde os dois tipos de emulsão (a/o e o/a ou o/a e a/o) existem simultaneamente, podendo assim ser do tipo água em óleo em água (a/o/a)

ou óleo em água em óleo (o/a/o). Estas emulsões possuem várias aplicações em áreas da indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia e química em geral (Reis et al., 2006). Este sistema apresenta propriedades particulares, tais como: (a) capacidade de incorporação de ativos cosméticos ou fármacos; (b) proteção da substância encapsulada quanto a processo de oxidação; (c) habilidade de veicular substâncias incompatíveis, por exemplo, com características hidrofílico/lipofílico/hidrofílico para emulsões a/o/a, respectivamente, em um mesmo sistema e (d) liberação prolongada do ativo ou fármaco encapsulado (Yu et al., 2003). Na formação de emulsões múltiplas usa-se frequentemente os emulsificantes PEG e PVA para estabilizar a fase interna da emulsão simples e a fase contínua da emulsão múltipla, respectivamente (Li et al., 2008). O PEG é amplamente utilizado na indústria farmacêutica devido a sua baixa toxicidade e periculosidade, sendo, portanto aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Ribeiro-Costa e colaboradores (2004) relataram que a presença do PEG como emulsificante da emulsão simples na primeira fase aquosa do sistema melhorou a morfologia das microesferas de PLGA. Além disso, especulou-se que algumas moléculas do PEG podem formar blendas com o PLGA. Uma fração substancial do PEG é normalmente eliminado no processo de lavagem das microesferas. Por outro lado, o PVA utilizado na fase contínua da emulsão múltipla favorece a uma diminuição da tensão superficial entre a fase aquosa e orgânica, reduzindo o tamanho dos glóbulos da emulsão múltipla e conseqüentemente, no tamanho das partículas. O PVA é eliminado no processo de lavagem das micropartículas (Li et al., 2008).

As técnicas com evaporação do solvente apresentam várias vantagens, tais como: possibilidade do uso de polímeros insolúveis em água, produção de amostras monodispersas com controle do tamanho das partículas e conseqüente da cinética de liberação do fármaco; eficiência de encapsulação adequada para fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos e a possibilidade de transposição para a escala industrial (técnica já utilizada em indústrias farmacêuticas) (Li et al., 2008).

2.2.3. Absorção de micropartículas pelo trato gastrointestinal

A administração de fármaco por via oral é considerada a via mais conveniente e segura (Coppi et al., 2006; Pinto et al., 2010). A sua característica não-invasiva relacionada à vantagem de evitar a dor e o desconforto associado à aplicação de

injeções, bem como a eliminação de contaminações a torna uma via de administração que permite uma maior adesão do paciente ao tratamento (Rieux et al., 2006).

Entretanto, um fármaco administrado oralmente necessita chegar à circulação sistêmica a fim de que atinja o local de ação na quantidade e velocidades adequadas de modo a assegurar sua eficácia (Pinto et al., 2010). A biodisponibilidade oral do fármaco é influenciada por diversos fatores e alguns deles ocorrem mesmo antes que o fármaco atravesse as membranas do trato gastrointestinal, ou seja, quando o fármaco ainda se encontra no próprio lúmen intestinal. Por exemplo, o pH do lúmen pode afetar a desintegração, dissolução e a estabilidade do medicamento e do fármaco. Além disso, a permeabilidade intestinal varia conforme os locais específicos do trato gastrointestinal (Wu et al., 1995).

Dessa forma, a administração oral de fármacos encapsulados em micro ou nanopartículas resistente ao ambiente gastrointestinal e transportado através de células do epitélio intestinal podem representar uma ferramenta eficaz para melhorar a biodisponibilidade oral de moléculas caracterizadas pela instabilidade no trato gastrointestinal e baixa permeabilidade intestinal (Coppi et al., 2010; Makhlof et al., 2011).

A passagem através do epitélio intestinal é fundamental para obter disponibilidade sistêmica de um fármaco administrado por via oral. O epitélio intestinal é formado por uma monocamada de células epiteliais constituídas essencialmente pelos enterócitos e células caliciformes, que se ligam nas superfícies apicais por junções paracelulares e estão cobertas à superfície por uma camada de muco (Silva et al., 2002a). O trato gastrointestinal necessita absorver os compostos essenciais e, ao mesmo tempo, ele deve atuar como uma barreira para impedir a entrada dos compostos indesejados potencialmente tóxicos ao organismo. Com isso, o trato gastrointestinal apresenta mecanismos que funcionam como uma barreira seletiva de permeabilidade para o transporte através do epitélio intestinal (Ensign et al., 2011).

Alguns mecanismos para a absorção de micropartículas no intestino após a administração oral são descritos na literatura (Florence, 1997; Rieux et al., 2006; Coppi et al., 2009). Três possíveis rotas são identificadas para o transporte através do epitélio intestinal (Fig. 10): (1) Através das Células-M das Placas de *Peyer* do tecido linfóide associado ao intestino (GALT); (2) Transporte transcelular através dos enterócitos; (3) Transporte paracelular através das junções oclusas entre as células.

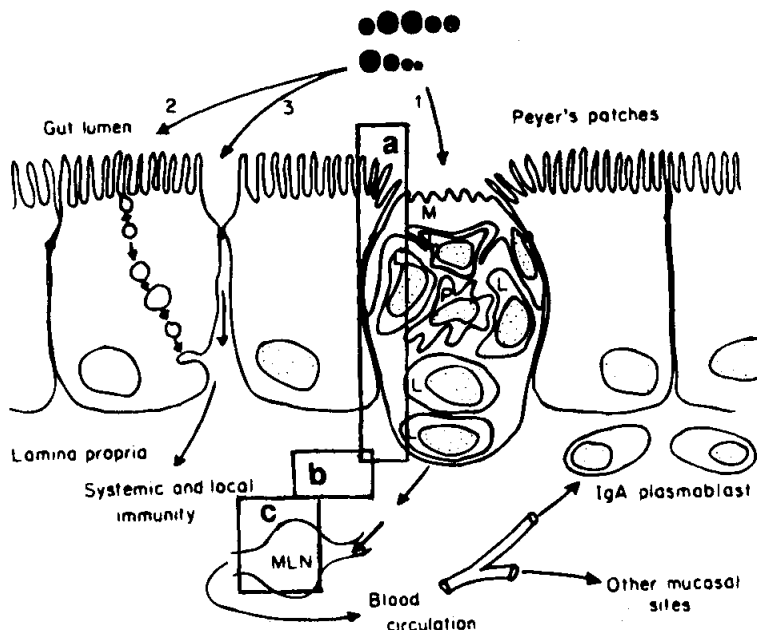


Fig. 10. Representação das três possíveis rotas de entrada das micropartículas no sistema linfático e circulação sanguínea. (1) Células-M das placas de *Peyer*; (2) Transporte transcelular via enterócitos; (3) Transporte paracelular através das junções oclusas entre as células. (Fonte: Florence, 1997).

As células-M das placas de *Peyer* são células especializadas para transportar via endocitose materiais microparticulados do lúmen intestinal para células linfóides intra-epiteliais e, subsequentemente do sistema linfático para a circulação sanguínea (Florence, 1997; Coppi et al., 2009). De acordo com Lubben e colaboradores (2001), micropartículas com diâmetro menor que 10 μm são capturadas pelas células-M e transportadas pelas placas de *Peyer*, de modo que partículas menores que 5 μm são mais facilmente transportadas através dos vasos linfáticos. Coppi e colaboradores (2006) mostraram que micropartículas de alginato/quitosana foram absorvidas pelas placas de *Peyer* em um modelo animal de ratos, confirmando o transporte através das células-M, assim como sua presença no epitélio intestinal.

O transporte passivo transcelular ocorre com a penetração do fármaco pela membrana apical, seguido pela sua difusão através do citoplasma e subsequente permeação pela membrana basolateral. O transporte paracelular ocorre pela passagem através dos espaços intercelulares. De acordo com Silva e colaboradores (2002a), a quitosana é capaz de promover o transporte paracelular, pois promove a abertura das junções oclusas intercelulares devido à interação de seus grupos amino, carregados

positivamente, com grupos siálicos, carregados negativamente, das glicoproteínas ligadas à membrana.

O desenvolvimento de micropartículas com estrutura núcleo-coroa apresenta características vantajosas para a absorção pelo trato gastrointestinal. Micropartículas núcleo-coroa consistem na formação de um núcleo de um polímero circundado pelo revestimento de um segundo polímero (Wang et al., 2010). Várias formas de modificação da superfície dos sistemas micro/nanoparticulados têm sido relatadas, tais como o revestimento por polissacarídeos como a dextrana, fucana e quitosana (Lira et al., 2011, Chakravarthi et al., 2011). As partículas núcleo-coroa apresentam vantagens em comparação às micropartículas não revestidas, as quais estão relacionadas, principalmente à redução do efeito *burst* na liberação do fármaco (Wang et al., 2010).

Assim, as micropartículas núcleo-coroa revestidas por quitosana podem ser aplicadas à administração de fármacos por via oral, devido à adesão celular promovida pela interação da quitosana com superfícies negativas, como a mucosa intestinal. Chakravarthi e colaboradores (2011) e Tahara e colaboradores (2009) demonstraram que o revestimento das partículas de PLGA com quitosana aumentou significativamente o *uptake* celular independente do tamanho da partícula. O revestimento de micro/nanopartículas pode ser obtido pelos métodos de adsorção, incorporação, copolimerização ou ligação covalente (Chakravarthi et al., 2011).

Dessa forma, o desenvolvimento de micropartículas de PLGA revestidas por quitosana formando partículas com estrutura núcleo-coroa representa uma proposta em potencial para o tratamento do câncer, especialmente do trato gastro-intestinal. Deste modo é possível potencializar a atividade anticancerígena da β -lap através de sistemas microparticulados administrados por via oral, a qual representa uma via de maior aceitação devido a sua natureza não invasiva.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. M. C.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; DALCI, A. C. L. L.; BRONDANI, J.; MEDEIROS, F. P. M.; BIEBER, L. W.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, p. 413-416, 2008.
- AMORIM, R. V. S.; LEDINGHAM, W. M.; KENNEDY, J. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* using Sugar Cane Substrates as Inexpensive Carbon Sources. **Food Biotechnology**, v. 20, p. 43-53, 2006.
- AMORIM, R. V. S.; MELO, E. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89 v. 35-39, 2003.
- ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. Tese apresentada no curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba para título de Doutor em Química. João Pessoa - PB (2007).
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CÂMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; RAMALHO CATÃO, R. M.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SARMENTO SILVA, T. M. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação de sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 517-524, 2006.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.
- BLANCO, E.; BEY, E. A.; DONG, Y.; WEINBERG, B. D.; SUTTON, D. M.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. β -Lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. **Journal of Controlled Release**, v. 122, p. 365-374, 2007.
- BOOTHMAN, D. A.; TRASK, D. K.; PARDEE, A. B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by β -lapachone, an activator of topoisomerase I. **Cancer Research**, v. 49, p. 605-612, 1989.
- BOUCHAMA, F.; VAN AKEN, G. A.; AUTIN, A. J. E.; KOPER, G. J. M. On the mechanism of catastrophic phase inversion in emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 231, p. 11-17, 2003.

- BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 1-9, 1995.
- CAVALCANTI, I. M. F.; MENDONÇA, E. A. M.; LIRA, M. C. B.; HONRATO, S. B.; CÂMARA, C. A.; AMORIM, R. V. S.; FILHO, J. M.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; AYALA, A. P.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 332–340, 2011.
- CHAKRAVARTHI, S. S.; ROBINSON, D. H. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, p. 111–120, 2011.
- CHAU, Y. P.; SHIAH, S. G.; DON, M. J.; KUO, M. L. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 660-670, 1998.
- CHEN, H.; YANG, W.; CHEN, H.; LIU, L.; GAO, F.; YANG, X.; JIANG, Q.; ZHANG, Q.; WANG, Y. Surface modification of Mitoxantrone-loaded PLGA nanospheres with chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 212–218, 2009.
- COPPI, G.; SALA, N.; BONDI, M.; SERGI, S.; IANNUCELLI, V. Ex-vivo evaluation of alginate microparticles for Polymyxin B oral administration. **Journal Drug Targeting**, v. 14, p. 599–606, 2006.
- COPPI, G.; MONTANARI, M.; ROSSI, T.; BONDI, M.; IANNUCELLI, V. Cellular uptake and toxicity of microparticles in a perspective of polymyxin B oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 42–46, 2010.
- COPPI, G.; IANNUCELLI, V. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367 p. 127–132, 2009.
- CRCAREVSKA, M. S.; DODOV, M. G.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 565–578, 2008.

- CUNHA-FILHO, M. S. S. **β -lapachona: Estudios de Preformulación y aproximaciones tecnológicas para su formulación.** ISBN 9788497509794. 1. ed. Santiago de Compostela: USC,. 1 (2008) 273 p.
- CUNHA-FILHO M. S. S.; GONÇALVES, C. A. T.; SOARES, P. R. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L.; MARTINEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Validação da metodologia analítica e desenvolvimento do teste de dissolução para o antineoplásico β -Lapachona. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 805-811, 2009.
- DILLEN, K.; VANDERVOORT, J.; VAN DEN MOOTER, G.; VERHEYDEN, L.; LUDWIG, A. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, p. 171–187, 2004.
- ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 557 – 570, 2011.
- EL-SHERBINY, I. M.; ABDEL-MOGIB, M.; DAWIDAR, A.-A. M.; ELSAYED, A.; SMYTH, H. D. C. Biodegradable pH-responsive alginate-poly (lactic-co-glycolic acid) nano/micro hydrogel matrices for oral delivery of silymarin. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1345–1354, 2011.
- FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A.; PASTORIZ, P.; BARCIA, E.; MONTEJO, C.; NEGRO, S. PLGA/PEG derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 50–57, 2008.
- FLORENCE, A. T. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: Neither exceptional nor unusual. **Pharmaceutical Research**, v.14, 1997.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles Pharmacy**. Third edition, ISBN 0-333-69081-8 (1998).
- FONSECA, F. G. C.; SILVA, L. B. L.; CASTRO, R. F.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. **Química Nova**, v. 27, p. 157-159, 2004.
- FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M. AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 34– 52, 2011.

- FRYDMAN, B.; MARTON, L. J.; SUN, J. S.; NEDER, K.; WITIAK, D. T.; LIU, A. A.; WANG, H-M; MAO, Y.; WU, H-V.; SANDERS, M. M.; LIU, L. F. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Research**, v. 57, p. 620-627, 1997.
- GARBAYO, E.; ANSORENA, E.; LANCIEGO, J. L.; AYMERICH, M. S.; BLANCO-PRIETO, M. J. Sustained release of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor from biodegradable polymeric microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 844–851, 2008.
- GEORGE, T. M., ABRAHAM, E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1–14, 2006.
- GOULART, M. O. F.; FREITAS, L. R.; TONHOLO, J.; DE ABREU, F. C.; RASLAN, D. S.; STARLING, S.; ZANI, C. L.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 2043-2048, 1997.
- GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SEIGLE-MURANDI, F.; SIMEON DE BUOCHBERG, M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. **Plants Medicine**, v. 60, p. 373-374, 1997.
- HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638–1649, 2008.
- HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 151-165, 2003.
- HUANG, L.; PARDEE, A.B. β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Molecular Medicine**, v. 5, p. 711-720, 1999.
- JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glicolid) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475 – 2490, 2000.
- KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; KRENZLIN, S.; SIEPMANN, J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. . **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 198–206, 2006.
- KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; WILLART, J. F.; DESCAMPS, M.; SIEPMANN, J. Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the “microparticle:bulk fluid” ratio. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 123–131, 2010.

- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1–27, 2000.\
- LEE J. H.; CHEONG J.; PARK Y. M.; CHOI Y. H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 553–560, 2005.
- LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. β -Lapachone, a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with a Mode of Action Different from Camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463-22468, 1993a.
- LI, C. J.; ZHANG, L. J.; DEZUBE, B. J.; CRUMPACKER, C. S.; PARDEE, A. B.; Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Medical Science**, v. 90, p. 1839-1842, 1993b.
- LI, C. J.; LI, Y. Z.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 13369-13374, 1999.
- LI, C. J.; WANG, C.; PARDEE, A. B. Induction of Apoptosis by β -Lapachone in Human Prostate Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 55, p. 3712-3715, 1995.
- LI, Y.; LI, C. J.; YU, D.; PARDEE, A. B. Potent induction of apoptosis by β -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, v. 6 p. 1008-1015, 2000.
- LI, Y.; SUN, X.; LAMONT, J. T.; PARDEE, A. B.; LI, C. J. Selective killing of cancer by β -lapachone: Direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **Medical Science**, v. 5, p. 2674-2678, 2003.
- LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, , v. 363, p. 26–39, 2008.
- LIRA, M. C. B. **Complexo de inclusão ácido úsnico: β -ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; NICOLAS, V.; MARSAUD, V.; SILVA, M. P. C.; PONCHEL, G.; VAUTHIER, C. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 162-170, 2011.

- LIU, S. H.; TZENG, H. P.; KUO, M. L.; LIN-SHIAU, S. Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by β -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 746-750, 1999.
- LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J. C.; AELST, A. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary *in vivo* uptake studies in murine Peyer's patches. **Biomaterials**, v. 22, p. 687-694, 2001.
- MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLÜPPEL, M. L. W. Liposomes applied in pharmacology: a review. **Estud. Biol.**, v. 67, p. 215-224, 2007.
- MANCA, M.-L.; MOURTAS, S.; DRACOPOULOS, V.; FADDA, A. M.; ANTIMISIARIS, S. G. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery? A comparative study of particle stability during nebulization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, p. 220-231, 2008.
- MAKHLOF, A.; FUJIMOTO, S.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of WGA-carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 216-224, 2011.
- MEDEIROS, C. S., PONTES-FILHO, N. T., CAMARA, C. A., LIMA-FILHO, J. V., OLIVEIRA, P. C., LEMOS, S. A., LEAL, A. F. G., BRANDÃO, J. O. C., NEVES, R. P. Antifungal activity of the naphthoquinone β -lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 345-349, 2010.
- MOON, D.; CHOI, Y. H.; KIM, N.; PARK, Y.; KIM, G. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 506-514, 2007.
- MORAIS, W. A.; COSTA, M. P.; PAIXÃO, A. D. O.; MACIEL, M. A. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Encapsulation and release characteristics of DCTN/PLGA microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 529-534, 2009.
- MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 325-338, 2001.

- NAFEE, N.; SCHNEIDERA, M.; SCHAEFERA, U. F.; LEHRA, C.-M. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 130–139, 2009.
- NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BOMMANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of β -lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1626-1633, 2003.
- ODAGO, F. O.; GERSON, S. L. Telomerase inhibition and telomere erosion: a two-pronged strategy in cancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.24, p. 328-331, 2003.
- ONESIPPE, C.; LAGERGE, S. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 317, p. 100-108, 2008.
- OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E. A.; GAO, J.; RITCHIE, J. M.; BORNMANN, W.; BOOTHMAN, D. A.; OBERLEY, L. W.; CULLE, N. J. J. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, p. 95-102, 2005.
- OULTON, R.; HARRINGTON, L. Telomeres, telomerase and cancer: life on the edge of genomic stability. **Current Opinion in Oncology**, v. 12, p. 74-81, 2000.
- PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 372-383, 2011.
- PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A. A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, p. 1294–1300, 2008.
- PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.
- PIMENTEL, L. F.; JÚNIOR, A. T. J.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 503-514, 2007.
- PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) activity is the

- principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5416-5424, 2000.
- PINTO, J.F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 44–52, 2010.
- PLANCHON, S. M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, F.; WITIAK, D. T.; HUTSON, P.; CHURCH, D. R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D. A. β -Lapachone-mediated Apoptosis in Human Promyelocytic. **Cancer Research**, v. 55, p. 3706-3711, 1995.
- PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W. G.; VARNES, M. E.; BOOTHMAN, D. A. β -Lapachone-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Involvement of NQO1/xip3. **Cancer Research**, v. 55, p. 3706–3711, 2001.
- REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMANN, W. G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D.A. Development of β -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 levels. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 3055-3064, 2005.
- REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 53– 65, 2006.
- RIBEIRO-COSTA, R. M.; ALVES, A. J.; SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; GONÇALVES, E. C. P.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 371–384, 2004.
- RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y.-J.; PRÉAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 1–27, 2006.
- ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, p. 60, p. 54-57, 2008.
- SALAS, C.; TAPIA, R. A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYAB, J. D.; MORELLO, A. Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives

- against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 668–674, 2008.
- SANTANA C. F.; LIMA O. G.; D'ALBUQUERQUE I. L. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 8, p. 89-94, 1968.
- SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.
- SEMETE, B.; BOOYSEN, L. I. J.; KALOMBO, L.; VENTER, J. D.; KATATA, L.; RAMALAPA, B.; VERSCHOOR, J. A.; SWAI, H. *In vivo* uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249, p.158–165, 2010.
- SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, 2002a.
- SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, 2003b.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.
- SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.
- SINGH, R.; LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, p. 215–223, 2009.
- SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA R.; BANSAL K.; DHAWAN S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 1–33, 2004.
- TAHARA, K.; SAKAI, T.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; HIRASHIMA, N.; KAWASHIMA, Y. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 198–204, 2009.

- TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v. 31, p. 184–193, 2010.
- WANG, W.; ZHOU, S.; SUN, L.; HUANG, C. Controlled delivery of paracetamol and protein at different stages from core–shell biodegradable microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 437–444, 2010.
- WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 298–327, 2008.
- WOO, H. J.; PARK, K. Y.; RHU, C. H.; LEE, W. H.; CHOI, B. T.; KIM, G. Y.; PARK, Y. M., CHOI, Y. H. β -lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, p. 161-168, 2005.
- WU, C. Y.; BENET, L. Z.; HEBERT, M. F.; GUPTA, S. K.; ROWLAND, M.; GOMES, D. Y.; WACHER, V. J. Differentiation of absorption and first pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporin, **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 58, p. 492, 1995.
- YU, S.-C.; BOCHOT, A.; LÊ BAS, G.; CHÉRON, M.; MAHUTEAU, J.; ROSSIORD, J.-L.; SEILLER, M.; DUCHÊNE, D. Effect of camphor/cyclodextrin complexation on the stability of O/W/O multiple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 261, p. 1- 8, 2003.
- ZHENG, C.-H.; GAO, J.-Q.; ZHANG, Y.-P.; LIANG, W.-Q. A protein delivery system: biodegradable alginate–chitosan–poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 1321–1327, 2004.
- ZHU, L.; MA, J.; JIA, N.; ZHAO, Y.; SHEN, H. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-Fluorouracil: Preparation, characterization and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 1-6, 2009.

OBJETIVOS

4. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem o objetivo de desenvolver micropartículas núcleo-coroa de PLGA e quitosana contendo β -lap com propriedade bioadesivas para administração oral. Além disso, propõe caracterizá-los quanto às propriedades físico-químicas, assim como avaliar a cinética de liberação da β -lap *in vitro*.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar micropartículas núcleo-coroa de PLGA revestidas por quitosana contendo β -lapachona;
- Verificar a eficiência de encapsulação da β -lapachona nas micropartículas;
- Caracterizar a formação de micropartículas núcleo-coroa através da carga de superfície das micropartículas com medição do potencial Zeta;
- Caracterizar morfologicamente as micropartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar a porosidade das micropartículas pelo estudo de superfície e porosidade;
- Caracterizar as interações químicas entre os polímeros e a β -lapachona nas micropartículas por análise espectroscópica por infravermelho (FTIR) e difração de Raio-X;
- Caracterizar as micropartículas por análise térmica através das técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* da β -lapachona a partir das micropartículas.

ARTIGO

**Core-shell PLGA/chitosan microspheres as
 β -lapachone oral delivery system**

A ser submetido para a *International Journal of Pharmaceutics*

Core-shell PLGA/chitosan microspheres as β -lapachone oral delivery system

Rebecca R. Torelli-Souza^a, Rosa Valéria S. Amorim^b and Nereide S. Santos-Magalhães^{a*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil

^bUniversidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia

***Corresponding author:**

Pr. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,
50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-81-21268587; fax: +55-81-21268485

E-mail: nssm@ufpe.br

ABSTRACT

The purpose of this research was to develop core-shell chitosan/PLGA microspheres containing β -lapachone (β -lap) with bioadhesive properties for oral drug delivery. β -lap-loaded PLGA-microspheres were prepared using water-in-oil-in-water double emulsion method and subsequently coated with chitosan (CS) by adsorption at different polymer ratios (CS:PLGA=0:1, 0.3:1, 0.6:1 and 1:1 w/w). The microspheres were characterized according to morphology by electronic microcopy and physicochemical properties. Furthermore, the drug release kinetics was evaluated simulating the gastrointestinal medium. The β -lap encapsulation efficiency in chitosan-coated PLGA microspheres (1:15 β -lap:PLGA, w/w) ranged from 74% to 85%. The microspheres had a regular spherical shape and mean diameter less than 7 μ m. The positive zeta potential of $\sim$ 15 mV for chitosan-coated microspheres suggested the formation of the core-shell chitosan/PLGA microspheres. In the FTIR spectra, DSC and X-ray diffraction studies revealed drug-polymer interactions suggesting that β -lap was molecularly dispersed in polymeric matrix of microspheres. The β -lap kinetic profile from chitosan-coated PLGA microspheres presented a lower burst effect compared with the uncoated PLGA-microspheres. The 1:1 CS:PLGA microspheres modified the β -lap release patterns from microspheres, producing lower diffusion speed k_2 of 0.09 (pH 1.2) and 0.08 (pH 7.4) compared the other formulations. Thus, the microencapsulation of β -lap into chitosan-coated PLGA-microspheres is proposed as oral delivery systems due gastroresistance properties, even as bioadhesive promoted by chitosan coating that can facilitate their uptake by intestinal epithelium.

Keywords: β -lapachone, microspheres, PLGA, chitosan, coating, kinetics.

1. Introduction

The β -lapachone (β -lap) is a semi-synthethic *ortho*-naphthoquinone derived from lapachol, which is isolated from *Tabebuia avellanedae* (Bignoneaceae family), a native tree originating in South America and with high frequency in Brazil (Jeong et al., 2009). The β -lap has shown a variety of pharmacological effects, such as antibacterial (Antunes et al., 2006), antifungal (Medeiros et al., 2010), antitripanosomal (Salas et al., 2008) and antineoplastic activity (Ough et al., 2005).

The action mechanism of the antiproliferative activity of β -lap is by inhibition of DNA topoisomerases, which act in the DNA replication and transcription processes (Frydman et al., 1997). Moreover, β -lap cytotoxic effect is significantly enhanced by the presence of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), a flavoprotein found overexpressed in a variety of human cancers (Blanco et al., 2007), such as pancreas (Li et al., 2011), prostate (Planchon et al., 2001) and breast (Pink et al., 2000).

Even though the potential of β -lap as an anticancer drug, several drawbacks hinder its administration by conventional dosage forms due to its poor water solubility (0.16 mM) and low biodisponibility may lead toxicity (Ough et al., 2005; Blanco et al., 2007). Thereby the encapsulation of β -lap in drug delivery systems such as liposomes, nanoparticles and microspheres becomes an attractive approach to improve its bioavailability and efficacy. In this way, Cavalcanti et al. (2011) proposed the encapsulation of β -lap or its hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in liposomes for parenteral administration. However, the oral administration becomes an interesting choice, because it received great attention due to their noninvasive nature and suitability for managed release of various medicinal agents, including anticancer drugs and proteins (Dudhani and Kosaraju, 2010).

In this research, the incorporation of β -lap in chitosan coated PLGA-microparticles for oral administration is offered taken into accounting the known biadhesive and prolonged drug release properties of these systems over the uncoated microparticles (Manca et al., 2008; Tahara et al., 2009; Semete et al., 2010). Chitosan (CS) is a mucoadhesive polymer that presents permeation enhancing properties by facilitating the opening of the epithelial tight junctions (Dudhani and Kosaraju, 2010). Thus, the development of core-shell chitosan-coated PLGA microparticles present advantages for drug delivery systems, mainly due to the cellular adhesion promoted by interaction of

chitosan with the negative surfaces, such as intestinal mucosa (Chakravarthi and Robinson, 2011). In addition, microparticles would offer several advantages as providing a controlled drug delivery within therapeutic range, allowing less frequent administrations and reducing toxic effects, thereby increasing patient compliance (Wischke and Schwendeman, 2008). According the influence of microspheres particle size in the mechanism of oral drug absorption, Lubben and co-workers (2001) reported that microparticles smaller than 10 μm are taken up by the M-cells and transported into the Peyer's patches, whereas microparticles smaller than 5 μm are more easily transported through the lymphatic vessels. Moreover, Coppi et al. (2006) showed that alginate/chitosan microparticles were absorbed by Peyer's patches in adult rats, confirming the transport of microspheres across M-cells.

Based on these findings, the aim of this study was to develop and characterize core-shell chitosan-coated PLGA microspheres containing β -lap for oral administration as well as to evaluate the *in vitro* release kinetics of β -lapachone for a potential cancer treatment such as gastrointestinal system cancer.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The pure β -lapachone obtained from lapachol by a semi-synthetic route was purchased from Antibiotics Department of the Federal University of the Pernambuco (Brazil). The poly(D,L-lactic-co-glycolic)-acid (PLGA 50/50, inherent viscosity of 0.57 dl/g) was purchased from Birmingham Polymers (Alabama, US). The chitosan (low molecular weight, DD 75-85%), polyvinyl alcohol (PVA, MW of 13,000-17,000 Da), polyethylene glycol (PEG, MW 4,000 Da) and trehalose were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, US). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Methodology

2.2.1. Preparation of β -lap-loaded PLGA microspheres and chitosan-coated microspheres

The β -lap-loaded PLGA microspheres were prepared using a water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique according to Ribeiro-Costa et al. (2004).

Briefly, a simple emulsion (w/o) was prepared by dissolving the PLGA (225 mg) and β -lap (ranging from 11.3 g to 22.5 g) at different drug:polymer ratios (1:10, 1:15, 1:20 w/w) in dichloromethane (6 mL) and emulsified with an aqueous solution (2 mL) containing PEG (125 mg) at 5020 g for 1 min (ultra-turrax T25, IKA, Germany). Subsequently, the w/o emulsion was transferred to an outer aqueous phase (45 mL) consisted of PVA (1.5%, w/v) and emulsified at 5020 g for 30 s, resulting in a double emulsion (w/o/w). This emulsion was then maintained under stirring at 400 rpm for 2 h to allow the solvent evaporation. The microspheres were then recovered through centrifugation (Kubota KN-70 centrifuge, Japan) at 7840 g for 10 min and washed three times with deionized water to remove the excess of emulsifiers. Finally, microspheres were dispersed within 1% (w/v) trehalose aqueous solution, frozen at -80°C and lyophilized (EZ-DRY, FTS System, USA) in equipment operating at 200 bars during 48 h. The storage of lyophilized microspheres was performed at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in a vacuum desiccator.

The chitosan-coating of PLGA microspheres containing β -lap was carried out by adsorption of chitosan on the surface of microparticles previously obtained. First, the chitosan was dissolved in 30 mL of 1% acetic acid (pH 3.6) at different concentrations (0.25, 0.5 and 0.75%, w/v). Then, β -lap-loaded PLGA microspheres were added to chitosan solution at different CS:PLGA ratios (0.3:1, 0.6:1 and 1:1, w/w). After stirring the mixture for 12 h, the chitosan-coated microspheres were recovered by centrifugation at 7840 g, for 10 min at 4°C , washed twice with demineralized water and dispersed within 1% (w/v) trehalose aqueous solution, frozen at -80°C and lyophilized as described.

2.2.2. Characterization of microspheres

2.2.2.1. Drug encapsulation efficiency

Accurately weighed amounts of lyophilized microspheres were dissolved in a mixture of 25 mL of dichloromethane and methanol (3:2) and sonicated for 10 min. The amount of β -lap in microspheres was determined by spectrophotometry at 256 nm, using a standard curve of β -lap at concentrations ranging from 0.5 to 3 $\mu\text{g/mL}$ in methanol. The experiments were carried out in triplicate. The β -lap content was thus used to calculate the encapsulation efficiency in microspheres according to $\text{EE (\%)} = [(\beta\text{-lap}_{\text{found}}/\beta\text{-lap}_{\text{theoretical}}) \times 100]$.

2.2.2.2. Particle size analysis

The volume mean diameter of microspheres (d_v) was measured through laser diffraction technique using a particle size analyzer (Microtrac[®] S3500, Montgomery Ville, USA) and the size distribution (span) was calculated by the equation: $\text{span} = d(v,0.9) - d(v,0.1) / d(v,0.5)$, where $d(v,0.9)$, $d(v,0.5)$ and $d(v,0.1)$ are the volume mean diameters determined at 90th, 50th and 10th percentile of counted particles, respectively. For lyophilized microspheres, measurement was performed redispersing samples in 0.04% Tween 80[®] (w/v) and sonicated for 10 min.

2.2.2.3. Zeta potential measurements

The surface charge of microspheres was evaluated through electrophoretic mobility (μE) measurements using a Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern, UK) at 25 °C. The lyophilized microspheres were dispersed in 1 mM NaCl solution, sonicated for 10 min and analyzed to determine the zeta potential (Gaumet et al., 2009). Samples were analyzed in triplicate and the zeta potential results are reported as the mean and standard deviation.

2.2.2.4. Morphological analysis

The morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (JSM-5900, Jeol, Japan). For SEM analysis, the samples were prepared from lyophilized microspheres redispersed in water. After drying, samples were fixed on aluminum stubs with a carbon-based adhesive tape and were sputtered with colloidal gold. The analysis was carried out under low vacuum at 10.00 kV and magnification of 5,000 ×.

2.2.2.5. Porosity analysis

The porosity parameters of microspheres were evaluated through the surface gas adsorption technique. Measurements were performed using a porosimetry system (ASAP 2420, Micrometrics, Norcross, USA). Before analysis a sample of lyophilized microspheres (200 mg) was placed in a volumetric sample tube and degassed under vacuum at 20 °C for 48 h. The sample tube was then immersed in liquid nitrogen and the sample exposed to inner nitrogen under precisely controlled pressures. The pressure at which adsorption equilibrium occurred is measured and the universal gas law applied to determine the quantity of gas adsorbed on the surface of microparticles. Adsorption/desorption isotherms at 77 K were plotted from the volume of nitrogen

adsorbed onto the surface of samples as a function of the relative pressure. The specific surface area was calculated using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method. Pore size distribution was determined by the adsorption branch of the N₂ isotherm (1.7 – 300 nm diameter range) using the Barret–Joyner– Halenda (BJH) model.

2.2.2.6. Vibrational spectroscopy

Infrared spectra were recorded on a Bruker Vertex 70 FT-IR spectrometer with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. KBr pellets of lyophilized microspheres were prepared from mixtures of 200 mg KBr and 1 mg of sample.

2.2.2.7. Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis was performed by Differential scanning calorimetry (DSC) using a Differential Scanning Calorimeter DSC-60 Shimadzu. The samples (5 mg) were scanned in sealed aluminium pans in nitrogen atmosphere (30 mL/min). DSC thermograms were scanned in the first heating run at a constant rate of 10 °C/min, and a temperature range of 25 °C to 250 °C. DSC thermograms of PLGA, chitosan and β -lap-loaded microspheres were recorded.

2.2.2.8. X-ray diffraction

X-ray diffraction (XRD) measurements of lyophilized microspheres were performed using a diffractometer (XRD 7000 SHIMADZU) operating in θ - θ geometry. A copper pipe ($\lambda_1 = \lambda_2 = 1.54060 \text{ \AA}$ and $1.54439 \text{ \AA}$) was used at a voltage of 40 kV and 30 mA, with θ ranging from 2 ° to 90 °, 0.02 ° step and speed of 1 deg/min.

2.2.3. *In vitro* release profile

A previous solubility study of β -lap in buffer solutions at pH 1.2 (0.2 M KCl-HCl) and pH 7.4 (0.2 M potassium phosphate) at 37 °C was performed in order to settle on suitable sink conditions for *in vitro* drug release assays.

Samples of uncoated and chitosan-coated PLGA microspheres containing β -lap (10 mg) were placed in 200 mL of buffer solutions at pH 1.2 and 250 mL of buffer solutions at pH 7.4, at 37 ± 1 °C under magnetic stirring (100 rpm) for 5 days. At pre-determined time intervals, samples of the release medium (1 mL) were withdrawn and replaced with fresh medium, and the β -lap analyzed by spectrophotometry at 256 nm. A

standard curve of β -lap from 0.5 to 3.0 $\mu\text{g/mL}$ was used to determinate β -lap concentration in analyzed samples. Kinetics experiments were conducted in triplicate. The kinetic data were fitted according to an exponential model using the following equation: $M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$, where M_t and M_∞ are the absolute cumulative amount of drug released at time t and initial drug content, respectively; k_1 is a fitting constant and k_2 is the kinetic rate constant. The initial step of the kinetic process (0-6 h) was analyzed by linear model for determining the constant rates.

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Factorial ANOVA was used to test data for β -lap kinetic release. The data were statistically analyzed by Tukey test at a significance level of 5% ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. β -lap-loaded PLGA microspheres

The emulsion-solvent evaporation (w/o/w) method has been widely used to prepare PLGA based microspheres. This method is often used because has several advantages, including control of particle size and the release kinetics of the encapsulated drug (Li et al., 2008). A preformulation study of β -lap-loaded PLGA microspheres prepared with different drug:polymer ratios was carried out in order to evaluate the β -lap entrapment with high efficiency in the PLGA matrix (Table 1). Interestingly, the encapsulation process of β -lap in the PLGA matrix of microspheres is concentration dependent with the optimal at 1:15 drug:polymer molar ratio. As can be seen, the encapsulation efficiency increased with the augmentation of the drug amount, reaching the highest entrapment ($93.5 \pm 1.31\%$) with the initial β -lap amount of 15 mg. However, a decrease in the encapsulation efficiency ($74.35 \pm 2.14\%$) was observed with the initial β -lap amount of 22.5 mg (1:10 β -lap:PLGA molar ratio). A satisfactory entrapment of β -lap into microspheres was due to hydrophobic properties of drug, favoring its interaction with the PLGA matrix and contributing to the development of drug delivery systems. According to literature, other drugs with hydrophobic characteristics similar to β -lap were encapsulated with high encapsulation efficiency in PLGA based microspheres, such as paclitaxel (Chakravarthi and Robinson, 2011; Parveen et al., 2011), ibuprofen (Klose et al., 2010), usnic acid (Ribeiro-Costa et al., 2004) and trans-Dehydrocrotonin (Morais et al., 2009).

The development of preliminary studies found the highest β -lap EE% in the 1:15 drug:polymer ratio, considered the best suited formulation for subsequent coatings of chitosan to prepare β -lap-loaded chitosan-coated PLGA core-shell microspheres.

Table 1. Encapsulation efficiency of β -lap into PLGA microspheres.

β -lap (mg)	β -lap:PLGA ratio	Encapsulation Efficiency (%)
22.5	1:10	74.35 ± 2.14
15.0	1:15	93.55 ± 1.31
11.3	1:20	61.72 ± 0.58
PLGA = 225 mg		

3.2. β -lap-loaded chitosan-coated PLGA microspheres

The development of core-shell microspheres using chitosan as coating polymer represents an important strategy applied to drug delivery systems by oral administration due to the bioadhesive properties of chitosan and the ability to control drug release over than the uncoated microspheres (Manca et al., 2008; Tahara et al., 2009; Coppi et al., 2010). Thus, chitosan-coated microspheres were developed in order to get a gastro-resistant and mucoadhesive system that favors the oral administration.

β -lap EE% in chitosan-coated PLGA microspheres was also found as follows: β -lap EE% = $74.70 \pm 3.15\%$, $85.35 \pm 2.32\%$ and $80.31 \pm 0.51\%$ for 0.3:1 CS:PLGA, 0.6:1 CS:PLGA and 1:1 CS:PLGA, respectively, as shown in Table 2. These unexpected results may be due to the increase in viscosity of the chitosan solution as well as its hydrophilic property when deacetylated in acid solution hinder the β -lap encapsulation (Parveen et al., 2011), resulting in a possible drug loss during the washing process of the microspheres after preparation. The uncoated β -lap-loaded PLGA microspheres presented particle size of $6.14 \mu\text{m}$ and span of 2.38, whereas the size of chitosan-coated PLGA microspheres ranged from $5 \mu\text{m}$ to $7 \mu\text{m}$ with span values ranging from 2.00 to 2.84 (Table 2), suggesting that the formulations are homogeneous. The particle size of microspheres was not significantly altered after modifying the surface with chitosan. It is well known that span values varying from 1.1 to 3.3 classify the particle size distribution as monomodal and is acceptable for controlled release oral systems

(Ribeiro-Costa et al., 2009). Chakravarthi and Robinson (2011) also obtained similar particle size data to chitosan-coated PLGA microparticles by adsorption or conjugation of chitosan. The results showed that the particle size of microparticles did not significantly increase after adsorption or conjugation of chitosan.

The zeta potential of uncoated β -lap-loaded PLGA microspheres was -9.33 ± 0.10 mV (Table 2), whereas the zeta potential of β -lap-loaded chitosan-coated PLGA microspheres was less negative for 0.3:1 CS:PLGA microspheres (-6.14 ± 0.35 mV) and positive for 0.6:1 CS:PLGA and 1:1 CS:PLGA microspheres ($+10 \pm 0.70$ mV and $+15.00 \pm 1.22$ mV, respectively). These results indicated that the chitosan coating on PLGA microspheres led to the formation of core-shell microspheres. The positive charge of chitosan-coated PLGA microspheres is due to the presence of free amines groups on the chitosan molecules at the surface of microspheres (Yang et al., 2009), while the negative surface charge of PLGA microspheres is associated to the carboxylic groups of this polyester (Manca et al., 2008). The zeta potential might influence both particle stability and cell adhesion. The positive values of zeta potential support the interaction of particles with the cell membrane, which is negatively charged, such as the intestinal mucosa. Thus, the cationic microparticles due to chitosan coating can interact with the cell membrane by ionic interaction and promote cellular uptake (Chen et al., 2009).

Table 2. Size properties, zeta potential and encapsulation efficiency of β -lap in CS-coated PLGA microspheres.

CS:PLGA (w/w)	Particle Size		Zeta Potential (mV)	EE $\pm$ sd (%)
	dv (μ m)	Span		
0:1	6.14	2.38	-9.33 ± 0.10	93.55 ± 1.31
0.3:1	6.98	2.84	-6.14 ± 0.35	74.70 ± 3.15
0.6:1	5.35	2.51	10.00 ± 0.70	85.35 ± 2.32
1:1	6.33	2.00	15.00 ± 1.22	80.31 ± 0.51

PLGA = 225 mg; 1:15 (w/w) β -lap:PLGA ratio

The morphological characteristics of microspheres containing β -lap performed by Scanning Electron Microscopy (SEM) are shown in Figure 1. The SEM revealed that β -lap-loaded uncoated PLGA microspheres (Fig. 1a) and chitosan-coated PLGA

microspheres (Fig. 1b) are regular spherical shaped with smooth surface and no free drug needle-like structures are presented.

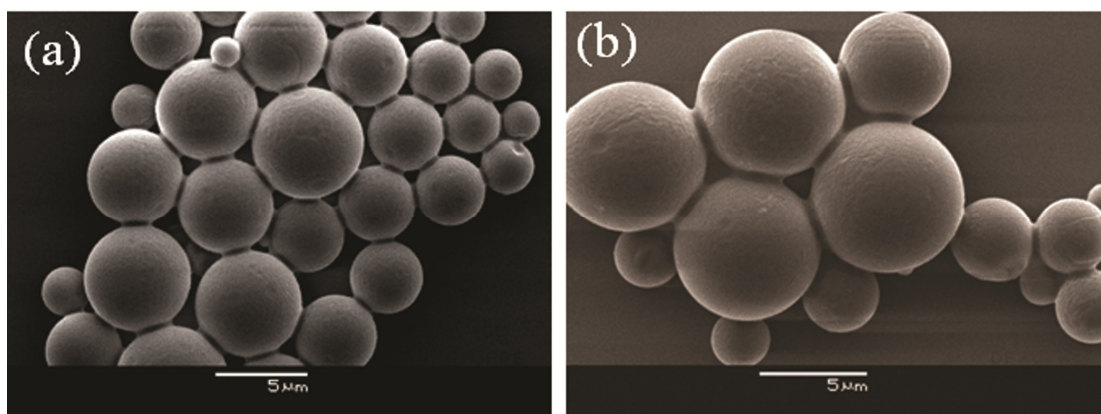


Fig. 1. The morphological aspect of microspheres by scanning electron microscopy (SEM): β -lap-loaded PLGA microspheres (a) and core-shell CS/PLGA-microspheres containing β -lap (b). Magnification of 5000 $\times$.

3.3. Porosity analysis

The characterization of microparticles through porosity analysis provides information about porosity parameters and is determined according to the amount of nitrogen adsorbed on the surface of microparticles (Sant et al., 2005). Thus, from nitrogen adsorption isotherms, some basic structural information such as BET surface area (SA_{BET}), mean pore size and total pore volume can be obtained (Teixeira et al., 2001). The porosity of the β -lap-loaded PLGA and chitosan-coated PLGA microspheres was evaluated using the parameters of specific surface area (BET) and pore size distribution (BJH), as described in Table 3.

Table 3. Porosity measurements for different formulations.

CS:PLGA (w/w)	SA_{BET} (m^2/g)	Pore Size ($\text{\AA}$)	Total pore volume (cm^3/g)
0:1	61.04	32.63	0.05
0.3:1	66.32	32.48	0.05
0.6:1	70.65	34.17	0.06
1:1	37.81	35.00	0.03

PLGA = 225 mg; 1:15 (w/w) β -lap: PLGA ratio; SA: surface area.

As seen from Table 3, the β -lap-loaded 1:1 CS:PLGA formulation showed a lower specific surface area ($SA_{BET} = 37.81 \text{ m}^2/\text{g}$) when compared to other formulations ($SA_{BET} = 61.04 \text{ m}^2/\text{g}$ for 0:1 CS:PLGA; $66.32 \text{ m}^2/\text{g}$ for 0.3:1 CS:PLGA and $70.65 \text{ m}^2/\text{g}$ for 0.6:1 CS:PLGA). According to literature, the specific surface area is directly related to porosity of the surface, so that the larger the specific surface area greater porosity (Ravivarapu et al., 2000). Thus, it suggests that 1:1 CS:PLGA microspheres have a lower porosity degree. The Figure 2 shows the adsorption isotherms of different formulations. These isotherms belong to type IV curves according to the IUPAC classification, which is characteristic for mesoporous (from $20 \text{ \AA}$ to $500 \text{ \AA}$). The BET equation fits this isotherm.

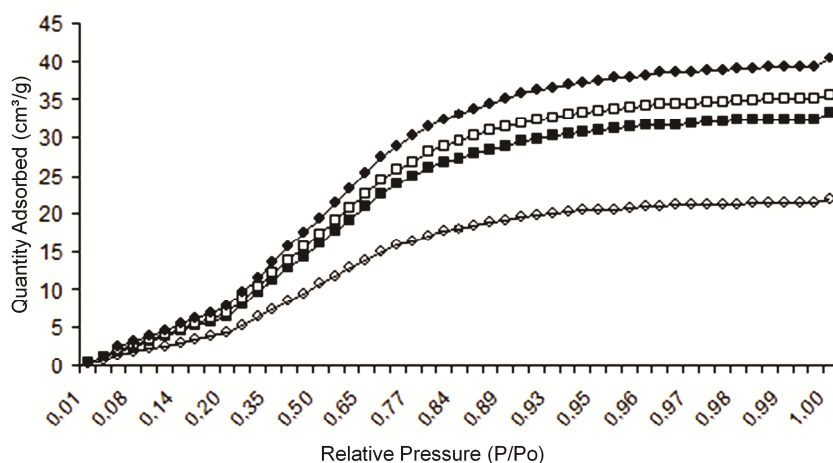


Fig. 2. Adsorption isotherms microspheres with N₂ at 77 K: 0:1 CS:PLGA (■); 0.3:1 CS:PLGA (□); 0.6:1 CS:PLGA (●); 1:1 CS:PLGA (○)

The data of pore size distribution (BJH) represents an important parameter for analyze the porous structure, because it is directly related to the particle surface area (Teixeira et al., 2001). According to Table 3, the microspheres showed pores with diameter range from $32 \text{ \AA}$ to $35 \text{ \AA}$, however there was no significant difference between total pore volume and pore size for different formulations. Figure 3 showed the analysis of N₂ adsorption isotherm profiles using the BJH model for the uncoated PLGA and chitosan-coated PLGA microspheres. According to the IUPAC classification, the BJH curves showed the presence of a small volume of micropores with a diameter of about $19 \text{ \AA}$ and the higher pore volume at mesopore range (from $20 \text{ \AA}$ to $500 \text{ \AA}$). Mesoporous

solids give rise to type IV isotherms, corroborating the results presented for the surface area (Fig. 2).

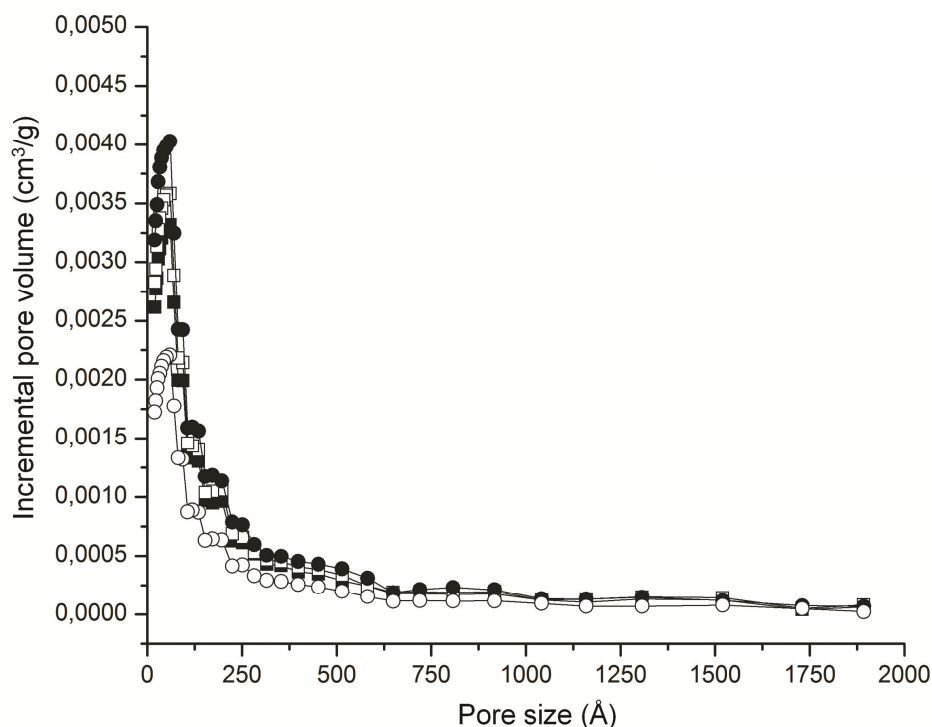


Fig. 3. Pore size distribution of microspheres determined using the BJH method applied to N_2 adsorption isotherms: 0:1 CS:PLGA (■); 0.3:1 CS:PLGA (□); 0.6:1 CS:PLGA (●); 1:1 CS:PLGA (○).

3.4. Polymers–drug interaction analysis

3.4.1. FTIR spectroscopy

The FTIR analysis was performed to obtain the characteristic spectra of the polymers and the β -lap alone and β -lap-loaded microspheres (Fig. 4). According to β -lap spectrum, the characteristics IR bands at 1694 cm^{-1} related to the stretching modes of the C=O stretching were observed (Fig. 4a). The bands at 1643, 1633, 1598 and 1569 cm^{-1} correspond to the aromatic ring in the β -lap molecule (Cunha-Filho et al., 2007a; Cunha-Filho et al., 2007b; Cavalcanti et al., 2011). As previously reported, the chitosan spectrum (Fig. 4b) is characterized by a broad absorption around 1660 cm^{-1} (amide I, C-O stretching mode conjugated with N-H deformation mode) and 1600 cm^{-1} (δ_{NH_2} band of non-acetylated NH_2 groups). The absorption bands at 1154 cm^{-1}

(asymmetric stretching vibration of the C-O-C bridge), 1083 cm^{-1} and 1038 cm^{-1} (skeletal vibration involving C-O stretching) are characteristic of the polysaccharide structure (Chakravarthi and Robinson, 2011; Semete et al., 2010; Dudhani et al., 2010; Chen et al., 2009; Abreu et al., 2008). The PLGA IR spectrum (Fig. 4c) showed an absorption band at 1755 cm^{-1} characteristic of ester group (C=O stretching), as well as bands in a range from 1396 cm^{-1} to 1456 cm^{-1} , which represent the CH_3 group and a band at 750 cm^{-1} related to CH groups, as described by Ganji and Abdekhodaie, 2010. The spectra of chitosan-coated PLGA microspheres exhibit peaks at 3420 cm^{-1} , related to the primary amide band of chitosan, suggesting the presence of chitosan on the surface of PLGA microspheres (Chen et al., 2009).

In order to define the interactions between the drug and the polymers in the core-shell microspheres, samples of β -lap-loaded chitosan-coated PLGA microspheres were investigated. The FTIR spectra of β -lap-loaded microspheres showed that the characteristic peaks of β -lap could not be observed in the chitosan-coated PLGA microspheres (Fig. 4 e,f,g).

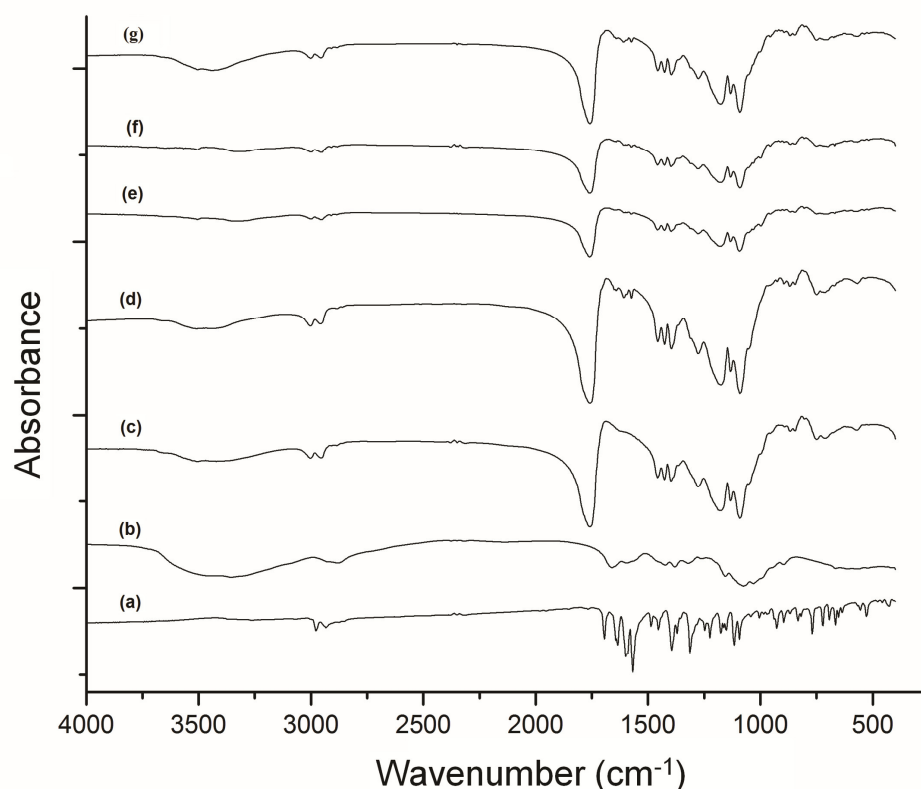


Fig. 4. Infrared spectra of β -lapachone (a), chitosan (b), PLGA (c), β -lap-loaded uncoated PLGA-microspheres (d), and β -lap-loaded microspheres: 0.3:1 CS:PLGA (e), 0.6:1 CS:PLGA (f), 1:1 CS:PLGA (g).

3.4.2. Thermal analysis by DSC and X-ray diffractometry

The Figure 5 shows the DSC thermograms of PLGA, chitosan, β -lap and β -lap-loaded microspheres, which were carried out in the temperature range of 0–250 °C. In calorimetric studies, the thermogram of PLGA (Fig. 5b) is characterized by the glass transition temperature of PLGA between 51 °C and 55 °C. Furthermore, the PLGA DSC curve displays a endothermic event at 98 °C ($\Delta H = -1,03 \text{ mW mg}^{-1}$) related to the polymer melting point, characteristic of a crystalline substance. The endothermic degradation event of PLGA does not appear, because it occurs above 300 °C, as reported in the literature (Mainardes et al., 2006; Silva-Júnior et al., 2008). The DSC thermogram of chitosan (Fig. 5c) showed a broad endothermic peak between 60 °C and 100 °C that can be attributed to dehydration process associated to hydrophilic groups of polymers (Ganji and Abdekhodaie, 2010). The exothermic baseline deviation beginning around 225 °C indicates the onset of chitosan degradation. The β -lap-loaded uncoated and chitosan-coated microspheres showed an endothermic peak like PLGA, except the 1:1 CS:PLGA microspheres (Fig. 5g), which presented an endothermic peak at 92 °C like chitosan ($\Delta H = -0,5 \text{ mW mg}^{-1}$), suggesting the chitosan coating are more evident than other formulations. It can be seen that the β -lap DSC curve (Fig. 5a) displayed a sharp endothermic event at 152.9 °C, which is due to drug melting, characteristic of a crystalline substance (Cunha- Filho et al., 2007a). In the thermogram of β -lap-loaded microspheres this endothermic peak was not evident (Fig. 5d-5g). Thus, can be concluded that the embedding of β -lap in the microspheres is in a molecular form.

Regarding XRD patterns, X-ray diffraction analysis of β -lap, PLGA, chitosan and β -lap-loaded microspheres were carried out (Fig. 6). The diffractogram of β -lap exhibited a main sharp peak at $9.5^\circ 2\theta$ and other secondary peaks at 12.8 , 15.3 and $19.4^\circ 2\theta$ (Fig. 6a, insert), as previous reported (Cunha-Filho et al., 2008). The diffractograms of β -lap-loaded uncoated PLGA (Fig. 5d) and CS/PLGA microspheres (Fig. 6e-6g) showed no sign of the β -lap peaks, which suggests that β -lap is entrapped at a molecular level in the amorphous polymeric matrix of microspheres. These results corroborated with those of FITR analysis.

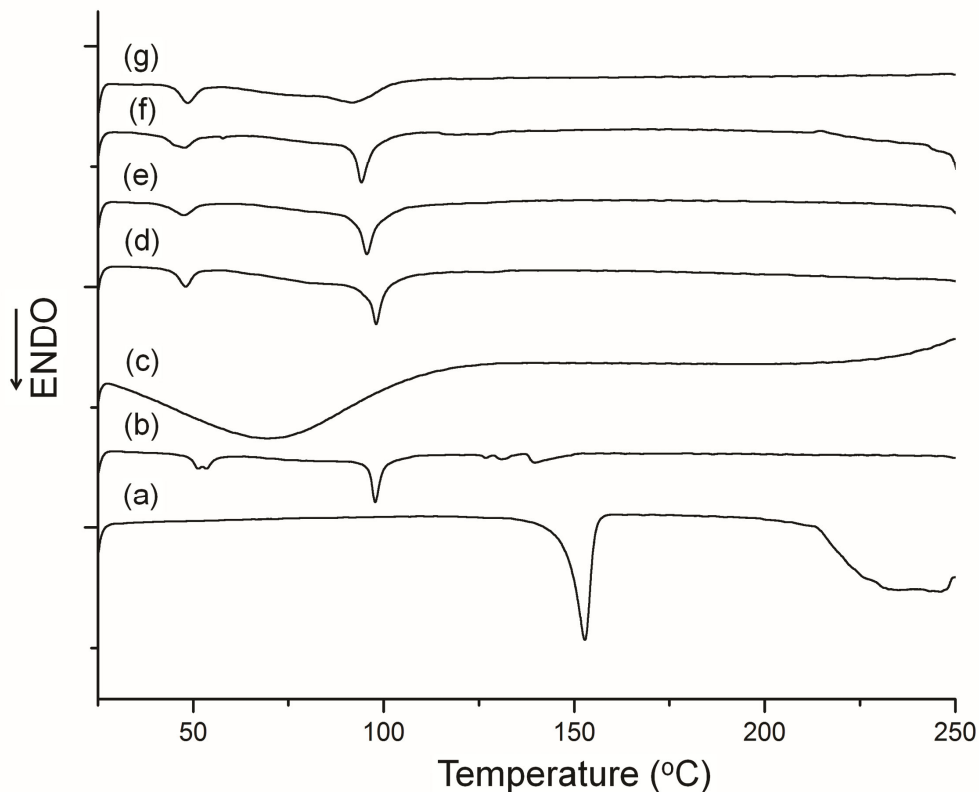


Fig. 5. DSC thermograms of β -lapachone (a), chitosan (b), PLGA (c), β -lap-loaded uncoated PLGA-microspheres (d), and β -lap-loaded microspheres: 0.3:1 CS:PLGA (e), 0.6:1 CS:PLGA (f), 1:1 CS:PLGA (g).

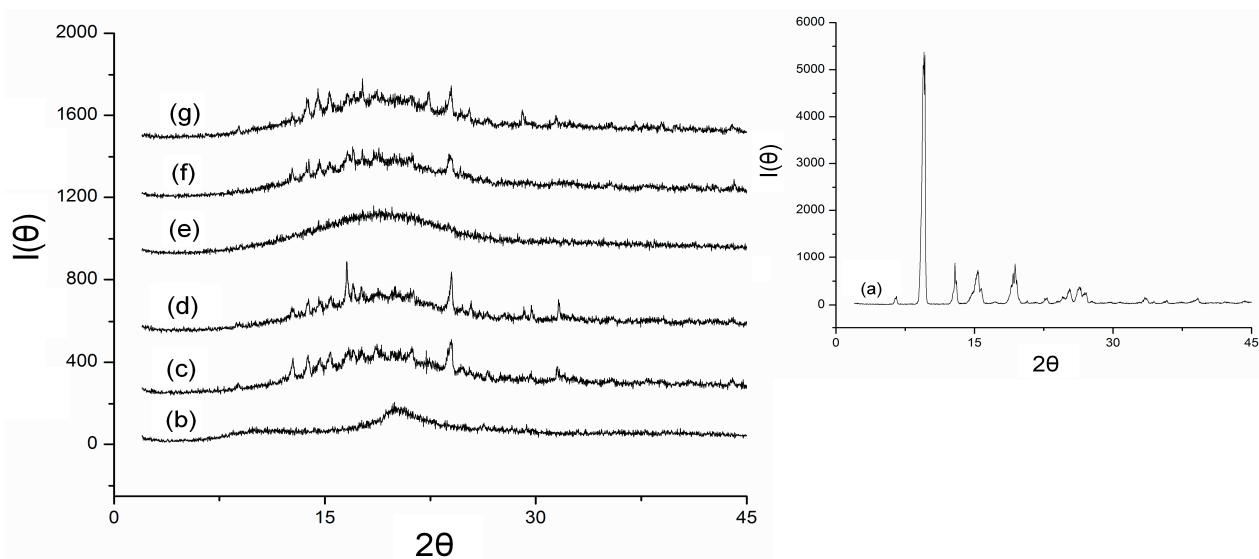


Fig. 6. X-ray diffractograms of chitosan (b), PLGA (c), β -lap-loaded uncoated PLGA-microspheres (d), and β -lap-loaded chitosan coated PLGA-microspheres 0.3:1 CS:PLGA (e), 0.6:1 CS:PLGA (f), 1:1 CS:PLGA (g). The insert (a) is the X-ray diffractogram of β -lapachone.

3.5. *In vitro* release kinetics of β -lapachone from microspheres

The solubility study showed that β -lap solubility in KCl-HCl buffer solution at pH 1.2 was $30.43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and in sodium phosphate buffer solution at pH 7.4 was $28.14 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The *in vitro* release kinetics of β -lap from microspheres was carried out simulating the gastric environment in buffer solution at pH 1.2 (Fig. 7a) and simulating the intestinal environment in buffer solution at pH 7.4 (Fig. 7b). The release kinetics of β -lap from microspheres was fitted according to the exponential model $M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$ and the calculated kinetic parameters of β -lap-loaded microspheres are summarized in Table 4.

Table 4. Calculated release parameters from β -lap-loaded CS-coated PLGA microspheres using exponential and linear models.

pH 1.2				
β -lap-loaded microspheres	Burst effect %	Exponential model $M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$ k_1 k_2		Linear model Release rate ($\mu\text{g/h}$)
0:1 CS:PLGA	26.46 ± 0.78 (3 h)	0.74 ± 0.01	0.11 ± 0.01	3.97 ± 0.31
0.3:1 CS:PLGA	17.76 ± 0.63 (2 h)	0.92 ± 0.01	0.12 ± 0.01	5.53 ± 0.37
0.6:1 CS:PLGA	21.24 ± 0.91 (2 h)	0.89 ± 0.01	0.11 ± 0.01	4.68 ± 0.48
1:1 CS:PLGA	23.86 ± 2.71 (2 h)	0.89 ± 0.00	0.09 ± 0.00	6.93 ± 1.54
pH 7.4				
β -lap-loaded microspheres	Burst effect %	Exponential model $M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$ k_1 k_2		Linear model Release rate ($\mu\text{g/h}$)
0:1 CS:PLGA	34.89 ± 3.34 (3 h)	0.78 ± 0.01	0.14 ± 0.01	6.10 ± 1.12
0.3:1 CS:PLGA	14.49 ± 0.79 (2 h)	0.95 ± 0.01	0.15 ± 0.01	4.96 ± 0.48
0.6:1 CS:PLGA	20.71 ± 0.55 (2 h)	0.92 ± 0.02	0.11 ± 0.01	2.53 ± 1.17
1:1 CS:PLGA	16.82 ± 0.23 (2 h)	0.90 ± 0.01	0.08 ± 0.00	5.88 ± 0.81

The kinetic profile of β -lap from the microspheres showed a biphasic drug release pattern characterized by an initial burst effect followed by a constant and controlled release step with different k_2 (exponential model) and release rate (linear model) values. The burst effect is characterized by a faster release of drug associated with the surface of the particles (Siepmann and Siepmann, 2008; Lee et al., 2011). The uncoated PLGA microspheres showed a β -lap burst effect more pronounced at pH 1.2 (Fig. 7a, insert) and pH 7.4 (Fig. 7b, insert) compared with chitosan-coated PLGA microspheres. According to Table 4, the burst effect of uncoated microspheres reached a period of 3 h with β -lap maximum release of 27% at pH 1.2 and 35% at pH 7.4. On the other hand, the β -lap burst effect of chitosan-coated microspheres was 2 h with β -lap maximum release between 18% and 24% at pH 1.2, while at pH 7.4 the maximum release was from 15% to 21%. It was observed that the values of β -lap burst effect at pH 7.4 differs significantly between the chitosan-coated formulations when compared to uncoated formulation ($p < 0.05$), however at pH 1.2 the data showed no significant difference ($p > 0.05$). These results suggest that the microspheres are gastroresistant, presented low percentage of β -lap release in the 2 initial hours of release as suggests the influence of chitosan coating on the drug release kinetics at pH 7.4. After the burst step, a gradual release stage was maintained during 29 h for all the formulations at pH 1.2 and between 30 h and 32 h for the formulations at pH 7.4.

The diffusion is known to be a dominant mechanism in this type of controlled drug delivery systems (Klose et al., 2008). This result can be confirmed by the good agreement between kinetics profiles and fickian model. Based on calculations of mathematical modeling, the constants k_2 (associated to apparent diffusion coefficients) of 1:1 CS:PLGA in the conditions at pH 1.2 ($k_2 = 0.09 \pm 0.00$) and pH 7.4 ($k_2 = 0.08 \pm 0.00$) had lower diffusion speed k_2 compared with other formulation, changing release properties (Table 4). It indicates a smaller mobility of β -lap, probably related to an increased chitosan coating that favors a slower release of the drug (Yu et al., 2008). The less value of constants k_2 from β -lap-loaded 1:1 CS:PLGA microspheres indicates the dependence of chitosan coating, because it serves as an additional barrier for drug diffusion (Wittaya-areekul et al., 2006; Yu et al., 2008; Manca et al., 2008).

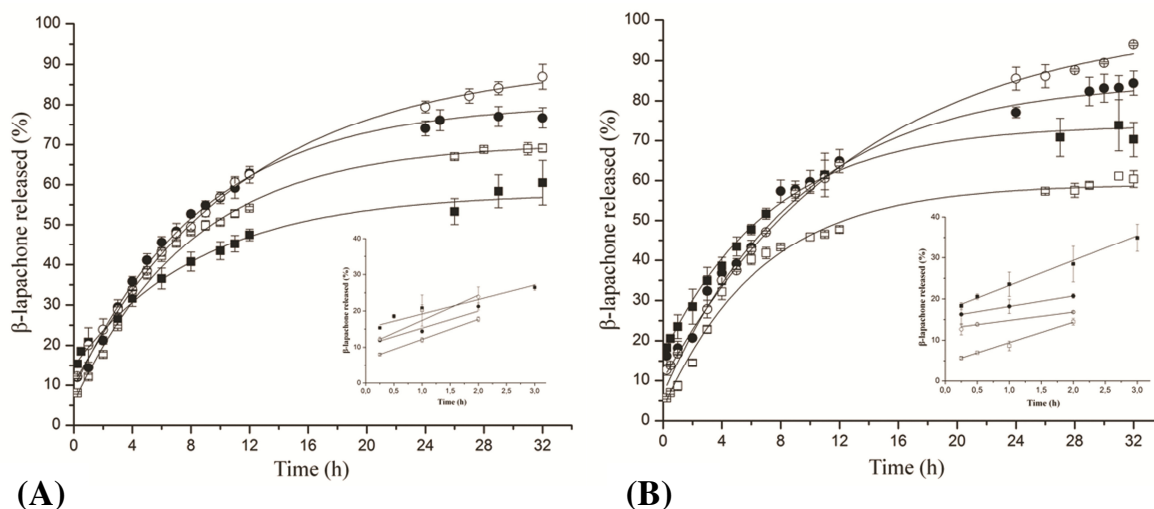


Fig. 7. *In vitro* release of β -lap from β -lap-loaded PLGA/CS microspheres in pH 1.2 KCl-HCl buffer solution (Fig. 7a) and pH 7.4 sodium phosphate buffer solution (Fig. 7b) at 37 °C: 0:1 CS:PLGA (■); 0.3:1 CS:PLGA (□); 0.6:1 CS:PLGA (●); 1:1 CS:PLGA (○). Each point represents the mean of three different experiments conducted at 37 °C with error bars. Lines represent the non-linear fitting using of Fickian diffusion model.

4. Conclusions

The core-shell chitosan-coated PLGA microspheres with a higher encapsulation efficiency (1:15 β -lap:PLGA ratio, w/w) were obtained by the adsorption method. The zeta potential and kinetics results confirmed the hypothesis of the formation of core-shell structured CS/PLGA microspheres proposed as bioadhesive systems. In addition, the chitosan-coated PLGA microspheres showed regular spherical shaped and smooth surface with particle size and span values within the acceptable range for oral administration. Moreover, FTIR, DSC and XRD results indicated a molecular interaction between β -lap and polymeric matrix. The β -lap release kinetics from microspheres showed that the chitosan-coated microspheres presented a lower β -lap burst effect compared the uncoated microspheres. Moreover, the β -lap-loaded 1:1 CS:PLGA modified release properties at pH 1.2 and pH 7.4 condition due to lower value of k_2 diffusion constant obtained by exponential analysis. Thus, the results of the release kinetics suggest the influence of chitosan coating on drug release from microspheres. From the results described, it is possible to presume that the chitosan-coated microspheres have potential for development of oral delivery systems, since has gastroresistance and bioadhesive properties that facilitate their uptake by intestinal

epithelium. Thus, these carriers can be proposed as an alternative to use the β -lap in therapy by oral delivery system. Further studies such as bioadhesive and toxicity will be conducted to corroborate the results of this investigation.

Acknowledgements

The first author thanks the Brazilian Ministry of Education-CAPES for a scholarship. Authors are grateful to the Brazilian Council for Development and Research-CNPq (grant #477463/2009-6) and the Science Foundation of Pernambuco, Brazil (FACEPE, APQ-0676-4.03/10).

References

- Abreu, F.O.M.S., Bianchini, C., Forte, M.M.C., Kist, T.B.L., 2008. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels. *Carbohydr. Polymers* 74, 283–289.
- Antunes, R.M.P., Lima, E.O., Pereira, M.S.V., Câmara, C.A., Arruda, T.A., Catão, R.M.R., Barbosa, T.P., Nunes, X.P., Dias, C.S., Silva, T.M.S., 2006. *In vitro* antimicrobial activity and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of natural and synthetic compounds against bacteria and leveduriform fungi. *Braz. J. Pharmacog.* 16, 517-524.
- Blanco, E., Bey, E.A., Dong, Y., Weinberg, B.D., Sutton, D.M., Boothman, D.A., Gao, J., 2007. β -Lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. *J. Control. Release* 122, 365–374.
- Cavalcanti, I.M.F., Mendonça, E.A.M., Lira, M.C.B., Honrato, S.B., Câmara, C.A., Amorim, R.V.S., Filho, J.M., Rabello, M.M., Hernandez, M.Z., Ayala, A.P., Santos-Magalhães, N.S., 2011. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 332–340.
- Chakravarthi, S.S., Robinson, D.H., 2011. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. *Int. J. Pharm.* 409, 111–120.
- Chen, H., Yang, W., Chen, H., Liu, L., Gao, F., Yang, X., Jiang, Q., Zhang, Q., Wang, Y., 2009. Surface modification of Mitoxantrone-loaded PLGA nanospheres with chitosan. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 73, 212–218.

- Coppi, G., Montanari, M., Rossi, T., Bondi, M., Iannuccelli, V., 2010. Cellular uptake and toxicity of microparticles in a perspective of polymyxin B oral administration. *Int. J. Pharm.* 385, 42–46.
- Coppi, G., Sala, N., Bondi, M., Sergi, S., Iannuccelli, V., 2006. Ex-vivo evaluation of alginate microparticles for Polymyxin B oral administration. *J. Drug Target.* 14, 599–606.
- Cunha-Filho, M.S.S., Dacunha-Marinho, B., Torres-Labandeira, J.J., Martínez-Pacheco, R., Landín, M., 2007a. Characterization of β -Lapachone and Methylated β -Cyclodextrin Solid-state Systems. *AAPS PharmSciTech*, 8(3), 1-10.
- Cunha-Filho, M.S.S., Martínez-Pacheco, R., Landín, M., 2007b. Compatibility of the antitumoral β -lapachone with different solid dosage forms excipients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 590–598.
- Cunha-Filho, M.S.S., Martínez-Pacheco, R., Landín, M., 2008. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral β -lapachone by solvent change precipitation of microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 871–877.
- Dudhani, A.R., Kosaraju, S.L., 2010. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydr. Polymers* 81, 243–251.
- Frydman, B., Marton, L. J., Sun, J. S., Neder, K., Witiak, D. T., Liu, A. A., Wang, H-M, Mao, Y., Wu, H-V., Sanders, M. M., Liu, L. F., 1997. Induction of DNA Topoisomerase II-mediated DNA Cleavage by β -Lapachone and Related Naphthoquinones. *Cancer Res.* 57, 620-627.
- Ganji, F., Abdekhodaie, M.J., 2010. Chitosan-g-PLGA copolymer as a thermosensitive membrane. *Carbohydr. Polymers* 80, 740–746.
- Gaumet, M., Gurny, R., Delie, F., 2009. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 465–473.
- Jeong, S.-Y., Park, S.-J., Yoon, S.M., Jung, J., NaWoo, H., Yi, S.L., Song, S.Y., Park, H.J., Kim, C., Lee, J.S., Lee, J.S., Choi, E.K., 2009. Systemic delivery and preclinical evaluation of Au nanoparticle containing β -lapachone for radiosensitization. *J. Control. Release* 139, 239–245.
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Siepmann, J., 2008. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *Int. J. Pharm.* 354, 95–103.

- Klose, D., Siepmann, F., Willart, J.F., Descamps, M., Siepmann, J., 2010. Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the “microparticle:bulk fluid” ratio. *Int. J. Pharm.* 383, 123–131.
- Lee, W.L., Loei, C., Widjaja, E., Loo, S.C.J., 2011. Altering the drug release profiles of double-layered ternary-phase microparticles. *J. Control. Release* 151, 229–238.
- Li, L.S., Bey, E.A., Dong, Y., Meng, J., Patra, B., Yan, J., Xi, X-J., Brekken, R.A., Barnett, C.C., Bornmann, W.G., Gao, J., Boothman, D.A., 2011. Modulating Endogenous NQO1 Levels Identifies Key Regulatory Mechanisms of Action of β -Lapachone for Pancreatic Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* 17, 275–285.
- Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* 363, 26–39.
- Lubben, I.M., Verhoef, J.C., Aelst, A.C., Borchard, G., Junginger, H.E., 2001. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22, 687–694.
- Mainardes, R.M., Gremião, M.P.D., Evangelista, R.C., 2006. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42, 523–530.
- Manca, M.-L., Mourtas, S., Dracopoulos, V., Fadda, A.M., Antimisariis, S.G., 2008. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery? A comparative study of particle stability during nebulization. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 62, 220–231.
- Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J.V., Oliveira, P.C., Lemos, S.A., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P., 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone β -lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 345–349.
- Morais, W.A., Costa, M.P., Paixão, A.D.O., Maciel, M.A.M., Santos-Magalhães, N.S., 2009. Encapsulation and release characteristics of DCTN/PLGA microspheres. *J. Microencapsulation* 26(6), 529–534.
- Ough, M., Lewis, A., Bey, E.A., Gao, J., Ritchie, J.M., Bornmann, W., Boothman, D.A., Oberley, L.W., Culle, N.J.J., 2005. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. *Cancer Biology and Therapy* 4, 95–102.
- Parveen, S., Sahoo, S.K., 2011. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 372–383.

- Pink, J.J., Planchon, S.M., Tagliarino, C., Varnes, M.E., Siegel, D., Boothman, D.A., 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 275, 5416-5424.
- Planchon, S.M., Pink, J.J., Tagliarino, C., Bornmann, W.G., Varnes, M.E., Boothman, D.A., 2001. β -Lapachone-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Involvement of NQO1/xip3. *Cancer Res.* 55, 3706–3711.
- Ravivarapu, H.B., Burton, K., DeLuca, D.D., 2000. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 263-270.
- Ribeiro-Costa, R.M., Alves, A.J., Santos, N.P., Nascimento, S.C., Gonçalves, E.C.P., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S., 2004. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J. Microencapsulation* 21, 371–384.
- Salas, C., Tapia, R.A., Ciudad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmerling, U., 2008. Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 668–674.
- Sant, S., Nadeau, V., Hildgen, P., 2005. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *J. Control. Release* 107, 203–214.
- Semete, B., Booysen, L.I.J., Kalombo, L., Venter, J.D., Katata, L., Ramalapa, B., Verschoor, J.A., Swai, H., 2010. In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249, 158–165.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2008. Mathematical modeling of drug delivery. *Int. J. Pharm.* 364, 328–343.
- Silva-Júnior, A.A., Scarpa, M.V., Pestana, K.C., Mercuri, L.P., Matos, J.R., Oliveira, A.G., 2008. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochim. Acta* 467,91-98.
- Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., Kawashima, Y., 2009. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *Int. J. Pharm.* 382, 198–204.
- Teixeira, V.G., Coutinho, F.M.B., Gomes, A.S., 2001. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. *Quim. Nova* 24, 2001.

- Wischke, C., Schwendeman, S.P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 364, 298–327.
- Wittaya-Areekul, A., Kruenate, J., Prahsarn, C., 2006. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Int. J. Pharm.* 312, 113–118.
- Yang, R., Shim, W-S., Cui, F-D., Cheng, G., Han, X., Jin, Q-R., Kim, D-D., Chung, S-J., Shim, C-K., 2009. Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified PLGA nanoparticle and tumor. *Int. J. Pharm.* 371, 142–147.
- Yu, C-Y., Zhang, X-C., Zhou, F-Z., Zhang, X-Z., Cheng, S-X., Zhuo, R-X., 2008. Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 357, 15–21.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- O estudo de pré-formulação das microesferas de PLGA evidenciou que a β -lap foi eficientemente encapsulada, apresentando um comportamento gaussiano com melhores resultados na razão fármaco:polímero 1:15. Por outro lado, a β -lap foi incorporada nas microesferas revestidas por quitosana com eficiência de encapsulação entre 74% - 85%;
- A microencapsulação da β -lap produziu microesferas homogêneas e esféricas com tamanho médio de partícula (d_v) e polidispersão (*span*) favoráveis para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada por via oral;
- O revestimento de quitosana nas microesferas de PLGA foi sugerido pelas análises de potencial zeta, a qual evidenciou a formação da estrutura núcleo-coroa das microesferas e o desenvolvimento de um sistema com propriedades de bioadesão;
- Os estudos de FTIR, DSC e XRD sugeriram a formação de interação molecular entre a β -lap e a matriz polimérica;
- Os resultados da cinética de liberação da β -lap a partir das microesferas evidenciaram a influência do revestimento de quitosana na liberação do fármaco, devido à redução do efeito *burst* da β -lap nas microesferas revestidas por quitosana;
- Assim, os sistemas microparticulados núcleo-coroa representam uma alternativa em potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada da β -lap por via oral devido às propriedades de bioadesão e gastroresistência favoráveis a interação com a mucosa intestinal.

PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar a morfologia das micropartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Realizar estudos *in vivo* de bioadesão celular e avaliar a adesão celular das Placas de Peyer por Microscopia de Fluorescência;
- Realizar estudo de citotoxicidade e atividade antitumoral;
- Produzir cápsulas contendo as microesferas para administração por via oral.

ANEXO

Normas da revista:

International Journal of Pharmaceutics

DESCRIPTION

The *International Journal of Pharmaceutics* is the journal for **pharmaceutical scientists** concerned with the **physical, chemical and biological** properties of **devices and delivery systems** for **drugs, vaccines and biologicals**, including their **design, manufacture and evaluation**. This includes evaluation of the properties of **drugs, excipients** such as **surfactants and polymers** and **novel materials**. The journal has special sections on **pharmaceutical nanotechnology and personalized medicines**, and publishes research papers, reviews, commentaries and letters to the editor as well as special issues.

Editorial Policy

The over-riding criteria for publication are originality, high scientific quality and interest to a multidisciplinary audience. Papers not sufficiently substantiated by experimental detail will not be published. Any technical queries will be referred back to the author, although the Editors reserve the right to make alterations in the text without altering the technical content. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the manuscript shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher.

Authors must state in a covering letter when submitting papers for publication the novelty embodied in their work or in the approach taken in their research. Routine bioequivalence studies are unlikely to find favour. No paper will be published which does not disclose fully the nature of the formulation used or details of materials which are key to the performance of a product, drug or excipient. Work which is predictable in outcome, for example the inclusion of another drug in a cyclodextrin to yield enhanced dissolution, will not be published unless it provides new insight into fundamental principles.

AUDIENCE

Pharmaceutical Scientists, Clinical Pharmacologists, Chemical Engineers, Biotechnologists.

IMPACT FACTOR

2010: 3.607 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
CAB Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents (Life Sciences, Clinical Medicine)
EMBASE
Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences
International Pharmaceutical Abstracts
MEDLINE®
PASCAL M
Science Citation Index
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

A.T. Florence, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK, **Email:** ataylorflorence@aol.com

Editors:**for Europe, Africa and Near East**

A.T. Florence, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK, Email: ataylorflorence@aol.com

for the Americas, Australia and New Zealand

D.J. Burgess, School of Pharmacy, University of Connecticut, 69 North Eagleville Road, Unit 3092, Storrs, CT 06269-3092, USA, Email: d.burgess@uconn.edu

for Japan and Far East

T. Sonobe, Miyagi University, 1-1 Gakuen, Taiwa-cho, Kurokawa-gun, 981-3298 Miyagi-ken, Japan, Email: sonob-ta@myu.ac.jp

Review Editor:

J. Siepmann, College of Pharmacy, Université Lille Nord de France, 3, rue du Professeur Laguesse, 59006 Lille, France, Email: juergen.siepmann@univ-lille2.fr

Advisor:

T. Nagai, Tokyo, Japan

Editorial Board:

G. Alderborn, Uppsala, Sweden

E. Allémann, Geneva, Switzerland

M.J. Alonso, Santiago de Compostela, Spain

D. Attwood, Manchester, UK

K.L. Audus, Lawrence, KS, USA

G. Barratt, Chatenay-Malabry, France

G. Betz, Basel, Switzerland

M.J. Blanco-Prieto, Pamplona, Spain

G. Borchard, Geneva, Switzerland

H.-K. Chan, Sydney, NSW, Australia

W.N. Charman, Parkville, VIC, Australia

P. Colombo, Parma, Italy

D.Q.M. Craig, Norwich, UK

D.J.A. Crommelin, Utrecht, Netherlands

F.-D. Cui, Shenyang, China

D. Duchêne, Châtenay-Malabry, France

J.L. Ford, Liverpool, UK

J. Hadgraft, London, UK

AUTHOR INFORMATION PACK 10 May 2012 www.elsevier.com/locate/ijpharm 3

B.C. Hancock, Sandwich, UK

H. Harashima, Sapporo, Japan

M. Hayashi, Tokyo, Japan

L. Illum, Nottingham, UK

T. Itoh, Tokyo, Japan

M. Khan, Silver Spring, MD, USA

M.E. Lane, London, UK

V.H.L. Lee, Shatin, N.T., Hong Kong

T. Loftsson, Reykjavik, Iceland

P. Macheras, Athens, Greece

Y. Maitani, Tokyo, Japan

G.P. Martin, London, UK

C. Melia, Nottingham, UK

A.K. Mitra, Kansas City, MO, USA

R.H. Müller, Berlin, Germany

J.M. Newton, London, UK

S.D. Patil, Cambridge, MA, USA

N.A. Peppas, Austin, TX, USA

Y. Perrie, Birmingham, UK

F. Podczek, London, UK

T. Rades, Copenhagen, Denmark

J.P. Remon, Gent, Belgium

A.K. Salem, Iowa City, IA, USA

E. Shefter, San Diego, CA, USA

Y. Shen, Hangzhou, Zhejiang, China

J.D. Smart, Brighton, UK

Y. Sugiyama, Tokyo, Japan
 M. Ticehurst, Sandwich, UK
 I.G. Tucker, Dunedin, New Zealand
 I. Uchegbu, London, UK
 A. Urtti, Helsinki, Finland
 G. van den Mooter, Leuven, Belgium
 S.P. Vyas, Sagar, India
 D.E. Wurster, Iowa City, IA, USA
 S.H. Yalkowsky, Tucson, AZ, USA
 A. Yamamoto, Kyoto, Japan

Honorary Board Member:

W.I. Higuchi, Salt Lake City, UT, USA

AUTHOR INFORMATION PACK 10 May 2012 www.elsevier.com/locate/ijpharm 4

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *International Journal of Pharmaceutics* publishes innovative papers, reviews, mini-reviews, rapid communications and notes dealing with physical, chemical, biological, microbiological and engineering studies related to the conception, design, production, characterisation and evaluation of drug delivery systems *in vitro* and *in vivo*. "Drug" is defined as any therapeutic or diagnostic entity, including oligonucleotides, gene constructs and radiopharmaceuticals.

Areas of particular interest include: pharmaceutical nanotechnology; physical pharmacy; polymer chemistry and physical chemistry as applied to pharmaceutics; excipient function and characterisation; biopharmaceutics; absorption mechanisms; membrane function and transport; novel routes and modes of delivery; responsive delivery systems, feedback and control mechanisms including biosensors; applications of cell and molecular biology to drug delivery; prodrug design; bioadhesion (carrier-ligand interactions); and biotechnology (protein and peptide formulation and delivery).

Note: For details on pharmaceutical nanotechnology, see Editorials in [279/1-2](#), [281/1](#), and [288/1](#).

Types of paper

(1) Full Length Manuscripts

(2) Rapid Communications

- (a) These articles should not exceed 1500 words or equivalent space.
- (b) Figures should not be included otherwise delay in publication will be incurred.
- (c) Do not subdivide the text into sections. An Abstract should be included as well as a full reference list.

(3) Notes

Should be prepared as described for full length manuscripts, except for the following:

- (a) The maximum length should be 1500 words, including figures and tables.
- (b) Do not subdivide the text into sections. An Abstract and reference list should be included.

(4) Reviews and Mini-Reviews

Suggestions for review articles will be considered by the Review-Editor. "Mini-reviews" of a topic are especially welcome.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of

authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, Who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Authors whose articles are published in the International Journal for Parasitology will be asked to transfer copyright for that article to the Australian Society for Parasitology, Inc. If there are any issues or conflicts of interest which might prevent the author transferring copyright, they should inform the Editor when submitting the manuscript.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of

these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must state in a covering letter when submitting papers for publication the novelty embodied in their work or in the approach taken in their research. Routine bioequivalence studies are unlikely to find favour. No paper will be published which does not disclose fully the nature of the formulation used or details of materials which are key to the performance of a product, drug or excipient. Work which is predictable in outcome, for example the inclusion of another drug in a cyclodextrin to yield enhanced dissolution, will not be published unless it provides new insight into fundamental principles.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a Double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract must not exceed 200 words.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more, but should be readable on screen at a size of 200 × 500 pixels (at 96 dpi this corresponds to 5 × 13 cm). Bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **ASTM**: ASTM Standards Database (ASTM ID: G63)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **GEO**: Gene Expression Omnibus (GEO ID: GSE27196; GEO ID: GPL5366; GEO ID: GSM9853)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **MINT**: Molecular INteractions database (MINT ID: 6166710)
- **NCBI Taxonomy**: NCBI Taxonomy Browser (NCBI Taxonomy ID: 48184)

- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
 - **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
 - **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- AUTHOR INFORMATION PACK 10 May 2012 www.elsevier.com/locate/ijpharm 9
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
 - **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations:

- Use continuous line numbering (every 5 lines) to facilitate reviewing of the manuscript.
- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.