



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***COMPLEXO DE INCLUSÃO ÁCIDO ÚSNICO: β -
CICLODEXTRINA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
NANOENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS***

MARIANE CAJUBÁ DE BRITTO LIRA

RECIFE, 2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

COMPLEXO DE INCLUSÃO ÁCIDO ÚSNICO: β
CICLODEXTRINA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
NANOENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de mestre na área de concentração em Produção e Controle de Medicamentos.

Mestranda: MARIANE CAJUBÁ DE BRITTO LIRA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

Orientador externo: Prof. Dr. RUBÉN DÁRIO SINISTERRA MILLÁN

Recife, 2007

Lira, Mariane Cajubá de Britto
Complexo de inclusão ácido úsnico:β-
ciclodextrina: preparação, caracterização e
nanoencapsulação em lipossomas / Mariane Cajubá
de Britto Lira. – Recife: O Autor, 2007.
xii, 89 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2007.

Inclui bibliografia, anexo.

1. Farmácia – Nanotecnologia farmacêutica . 2.

Sistema de Liberação Controlada - Lipossomas. 3.

Ciclodextrina. I. Título.

615.014
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2007-80



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 27 de fevereiro de 2007.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2007 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Deptº de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Nereide Stela Santos Magalhães

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Beate Saegesser Santos (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Beate Saegesser Santos

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim Santos (Deptº de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí).

Assinatura: Hercília Maria Lins Rolim Santos

Dedico esta dissertação a minha família, aos professores e aos amigos que, de alguma forma, me ajudaram a crescer profissionalmente e como pessoa durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela Vida! Por estar constantemente ao meu lado me protegendo e abençoando;

A minha amada família (Gilvandro Lira, Eliane Lira e Gilzinho) pelo apoio, carinho, ensinamentos e sábias lições de vida;

Ao meu namorado Sidney Nogueira agradeço pelas incansáveis palavras de força, pela doação, companheirismos, carinho e amor;

À Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela orientação, pela confiança e por compartilhar conhecimentos não só durante o mestrado, mas desde a iniciação científica (2001) e, com certeza, nos próximos anos do doutorado; Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Rubén Dário Sinisterra Millán e a Profa Dra. Maria Esperanza Cortés Segura pelas grandes contribuições neste trabalho e principalmente por ter me recebido muito bem em seus respectivos laboratórios na UFMG;

À grande amiga Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim pela “longa” caminhada juntas, dividindo experiências, motivações, vontade de crescer, amizade verdadeira e respeito. Agradeço de coração por tudo!

Aos amigos que fizeram e fazem parte do Grupo de Sistema de Liberação Controlada pela grande colaboração, união e pelos inesquecíveis momentos de descontração no dia-a-dia (no laboratório), nas confraternizações e viagens;

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, em especial aos do laboratório de Bioquímica por toda ajuda e amizade;

A todos os funcionários do Laboratorio de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA pelo apoio técnico;

Aos amigos da UFMG pela ajuda e força no momento em que estive morando em Belo Horizonte;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial a secretária Conceição pelas ajudas burocráticas;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE pelo apoio financeiro durante parte da elaboração dessa pesquisa;

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	13
2 – REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 – Substâncias liquênicas – Ácido úsnico	16
2.1.1 – Atividades biológicas do ácido úsnico	18
2.2 – Ciclodextrinas – Aspectos gerais	20
2.2.1 – Classificação das ciclodextrinas	22
2.2.2 – Complexos de inclusão com ciclodextrinas	24
2.2.3 – Métodos de preparação dos complexos de inclusão	25
2.2.4 – Caracterização dos complexos de inclusão	27
2.2.5 – Utilização das ciclodextrinas	28
2.3 – Sistemas de liberação controlada de medicamentos	29
2.3.1 – Classificação dos lipossomas	32
2.3.2 – Métodos de preparação dos lipossomas	35
2.3.3 – Caracterização dos lipossomas	36
2.3.4 – Aplicações Farmacêuticas	37
3 – OBJETIVOS	39
3.1 – Geral	39
3.2 – Específicos	39
4 – ARTIGO I – Inclusion complex of usnic acid/β-cyclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into liposomes.	41
5 – CONCLUSÕES	65
6 - PERSPECTIVAS	66
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ANEXO A – Artigos

**ANEXO B – Resumos enviados para congressos
– Palestras ministradas**

ANEXO C – Normas da Revista

LISTA DE ABREVIATURAS

AU ou UA	Ácido úsnico livre
βCD	β -ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina-glicosiltransferase
CH	Colesterol
DL₅₀	Dose letal para 50% dos animais estudados
DMSO (DMSOd)	Dimetilsulfóxido (dimetilsulfóxido deuterado)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
IV ou IR	Infravermelho
IC₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
SjPC	Fosfatodilcolina de soja
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares grandes
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	ácido polilático e glicólico
PM	Mistura física
RMN ou NMR	Ressonância Magnética Nuclear
SA	Estearilamina (octadecilamina)
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TG	Termogravimetria
UA:βCD	Ácido úsnico complexado à β -ciclodextrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XDR	Difração de raios X

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Estrutura molecular do ácido úsnico.	17
Figura 2 – Aspecto macro e microscópico (óptico) do ácido úsnico.	18
Figura 3 – Estrutura química da ciclodextrina.	21
Figura 4 – Ilustração da associação entre a ciclodextrina e droga; (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2.	24
Figura 5 – Diagrama de Solubilidade de Fases.	28
Figura 6 – Farmacocinética comparativa das formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada.	30
Figura 7 – Passos da formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma.	31
Figura 8 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas.	32
Figura 9 – Classificação dos lipossomas quanto a constituição.	34
Figura 10 – Esquema representativo dos diversos parâmetros que caracterizam os lipossomas. Adaptado de ref. Santos & Castanho, 2002.	37

ARTIGO I

Figure 1. Chemical structure of usnic acid ($C_{18}H_{16}O_7$).	44
Figure 2. Phase-solubility diagrams of usnic acid and β -cyclodextrin in water at 37°C.	51
Figure 3. IR Spectra of usnic acid (UA), β -cyclodextrin (β CD), physical mixture (PM) and inclusion complex (UA: β CD). Curves were fitted using Origin 6.0 software.	53
Figure 4. X-ray powder diffraction patterns of usnic acid (UA), β -cyclodextrin (β CD), physical mixture (PM) and inclusion complex (UA: β CD).	56

Figure 5. DSC thermograms of usnic acid (UA), β -cyclodextrin (β CD), physical mixture (PM) and inclusion complex (UA: β CD). **57**

Figure 6. *In vitro* release profiles of usnic acid from complex-loaded liposomes (UA: β CD-Lipo), usnic acid-loaded liposomes (UA-Lipo) and inclusion complex (UA: β CD). **59**

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela I – Algumas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais	22
---	----

ARTIGO I

Table 1. Proton NMR signals of usnic acid and β -CD complex (shifts observed in signals of usnic acid).	54
Table 2. Proton NMR signals of usnic acid and β -CD complexes (shifts observed in signals of β -ciclodextrin).	55

RESUMO

O ácido úsnico é conhecido mundialmente por suas diversas atividades biológicas; no entanto, sua utilização na terapêutica ainda é limitada por apresentar baixa hidrofiliabilidade e elevada hepatotoxicidade. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que podem formar complexos de inclusão com diversos compostos hidrofóbicos. Lipossomas são sistemas de liberação controlada de fármacos, formados por bicamadas de fosfolípidios e têm a capacidade de incorporar compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos. O objetivo deste trabalho foi aumentar a solubilidade do ácido úsnico obtendo complexos de inclusão ácido úsnico: β -ciclodextrina (AU: β CD) e nanoencapsular os complexos em lipossomas para obter sistemas de liberação controlada. Os complexos AU: β CD foram preparados por diferentes metodologias e caracterizados por análise térmica (DSC), difratometria de raios-X, infravermelho, RMN¹ e 2D ROESY, solubilidade de fases e teste de dissolução. A atividade antimicrobiana foi realizada para avaliar se a complexação com a β -ciclodextrina interferiu na atividade biológica do ácido. Os lipossomas foram preparados utilizando-se a técnica de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. As preparações foram avaliadas por estudos de estabilidade e pela cinética de liberação *in vitro*. As modificações nos espectros dos complexos de inclusão mostraram interação entre o ácido úsnico e a β -ciclodextrina, observando-se também um aumento na solubilidade do ácido na forma complexada. Lipossomas contendo o complexo foram preparados e permaneceram, em média, estáveis na forma de suspensão por 4 meses. O doseamento e a taxa de encapsulação foram de $100,85 \pm 5,97\%$ e $99,5 \pm 0,2 \%$, respectivamente. Houve uma liberação mais lenta do ácido úsnico nas formulações contendo o complexo quando comparadas às formulações contendo ácido úsnico encapsulado. A encapsulação de complexos de inclusão entre o ácido úsnico e a β -ciclodextrina em lipossomas pode ser uma alternativa para superar tanto a baixa solubilidade em água do ácido como sua hepatotoxicidade.

ABSTRACT

Usnic acid is world-wide known for its diverse biological activities; however, the therapeutic usefulness of usnic acid potential benefits is limited by the unfavourable physicochemical properties, especially because of the very poor water solubility and the hepatotoxicity. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides which could form inclusion complexes with a variety of hydrophobic compounds. Liposomes are spherical vesicles formed by phospholipid bilayer and could incorporate hydrophilic and hydrophobic compounds. The goal of this research work was to increase usnic acid solubility by the formation of inclusion complex and nanoencapsulate the complexes into liposomes to promote a delivery system. Inclusion complexes were prepared using different techniques and were characterized using standard thermal analysis (DSC), x-ray diffractometry, and Infrared, ^1H and 2D-ROESY NMR spectroscopy, phase solubility method and dissolution test. The antimicrobial activity of inclusion complexes was evaluated to investigate if the complexation interferes on usnic acid biological activity. Liposomes were prepared by the thin film hydration technique. Liposomal formulation was evaluated using standard stability tests and *in vitro* kinetic. Inclusion complex spectral modifications in comparison with UA or β -CD spectra suggest an interaction between both molecules and an increase in usnic acid solubility was observed. The formulation remains stable for approximately 4 months in suspension form, storage at 4°C . The content of usnic acid was $100.85 \pm 5.97\%$ after liposomes preparation, showing that the drug integrity was maintained after the manufacture and the encapsulation efficiency was $99.5 \pm 0.2\%$. *In vitro* kinetic revealed that release of UA from complex-in-liposomes was slower than that from UA-loaded liposomes. The encapsulation of usnic acid inclusion complexes with β -cyclodextrin in liposomes could be an alternative to overcome usnic acid low solubility and toxicity.

1 – INTRODUÇÃO

Atualmente há uma diversidade de compostos naturais bioativos com potencial atividade farmacológica, sendo os líquens uma das fontes naturais mais importantes. Dos diversos metabólitos secundários de líquens o dibenzofurano ácido úsnico (2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzenofurano, $C_{18}H_{16}O_7$, PM = 344,3 g / mol) é sem dúvida o mais extensivamente estudado (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). O ácido úsnico é conhecido mundialmente por suas diversas atividades biológicas como antibiótica, antiinflamatória, antiprotozoária, antiviral, antitumoral, antimicótica (COCHIETTO *et al.*, 2002; De CARVALHO *et al.*, 2005; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Mesmo apresentando uma variedade de atividades biológicas, a utilização do ácido úsnico na terapêutica ainda é limitada por apresentar algumas características desfavoráveis como baixa hidrofiliabilidade e hepatotoxicidade (HAN *et al.*, 2004). Deste modo, a utilização do ácido úsnico em sua forma livre torna-se bastante restrito, sendo necessárias alternativas para contornar suas características físico-químicas indesejáveis e diminuir seus efeitos tóxicos, além de manter suas atividades biológicas.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos formados por diferentes números de unidades de glicopirranose, pelo menos seis, as quais estão ligadas por ligações glicosídicas α (1-4) (CHALLA *et al.*, 2005). Apresentam-se na forma de cone truncado e esta conformação faz com que as ciclodextrinas apresentem uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna com características lipofílicas. A presença da cavidade interna hidrofóbica faz com que as ciclodextrinas tenham a capacidade de alojar uma molécula hóspede, formando complexos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (MARTIN Del VALLE, 2004). Os complexos de inclusão têm sido amplamente estudados porque promovem, principalmente, um aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em

água; ademais, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do princípio ativo (DEVARAKONDA *et al.*, 2005). Desta forma, as ciclodextrinas são largamente utilizadas em diversas áreas como a farmacêutica, a área têxtil, a alimentícia, em processos de separação, fermentação, processos catalíticos e proteção para o meio ambiente entre outras áreas.

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas da ciência que envolve aspectos multidisciplinares contribuindo bastante para o avanço da saúde. O principal objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter constante a concentração plasmática do fármaco, dentro de uma faixa terapêutica, eliminando variações que geralmente são observadas no tratamento com sistemas convencionais como, por exemplo, os efeitos tóxicos (concentrações que ultrapassam a faixa terapêutica) e doses subterapêutica (concentrações abaixo da faixa terapêutica) da substância ativa. Das várias formas de sistema de liberação controlada os lipossomas, vesículas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios, despertam grande interesse devido a sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, seja na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (VOINEA & SIMIONESCU, 2002). Os lipossomas não só possibilitam uma diminuição na concentração efetiva da droga utilizada, como também permitem uma maior captação a nível celular quando acrescida a sua superfície moléculas como lectinas (SANTOS-ROLIM, 2005), ligantes químicos, anticorpos, entre outros compostos permitindo um possível direcionamento para sítios específicos, alcançando o principal objetivo destes sistemas que é aumentar a ação terapêutica diminuindo sua toxicidade (ALLEN *et al.*, 1995).

Desta forma, este trabalho visou aumentar a solubilidade do ácido úsnico obtendo complexos de inclusão ácido úsnico:β-ciclodextrina e a nanoencapsulação destes complexos em lipossomas para obtenção de liberação controlada ácido úsnico.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Substâncias liquênicas - Ácido úsnico

Atualmente há uma diversidade de compostos naturais bioativos com potencial atividade farmacológica e muitos deles com atividade já comprovada. Além das plantas, os líquens são umas das mais importantes fontes de compostos biologicamente ativos. Define-se líquens como organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e uma ou mais alga (fotobionte). O micobionte é um organismo heterotrófico que obtém sua fonte de carbono do fotobionte. Os produtos extracelulares, freqüentemente chamados metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex dos líquens, raramente em ambas as camadas. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 630 compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens (HONDA & VILEGAS, 1998). A síntese dos metabólitos secundários fez com que os líquens fossem utilizados durante muito tempo na medicina popular e em vários países; isso porque, essas substâncias apresentam importantes atividades biológicas como antibiótica, anti-herbicida e antimicrobiana (PERRY *et al.*, 1999).

Pesquisas farmacológicas realizadas no início da era dos antibióticos, nos anos 50, definiram o composto ácido úsnico, e produtos relacionados, como sendo substância ativa de origem liquênica (LAUTERWEIN *et al.*, 1995). Dos diversos metabólitos secundários de líquens, o ácido úsnico, dibenzofurano de baixo peso molecular (2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzofurano, $C_{18}H_{16}O_7$, PM = 344,3 g / mol), é sem dúvida o mais extensivamente estudado (INGÓLFSDÓTTIR, 2002) (Fig. 1).

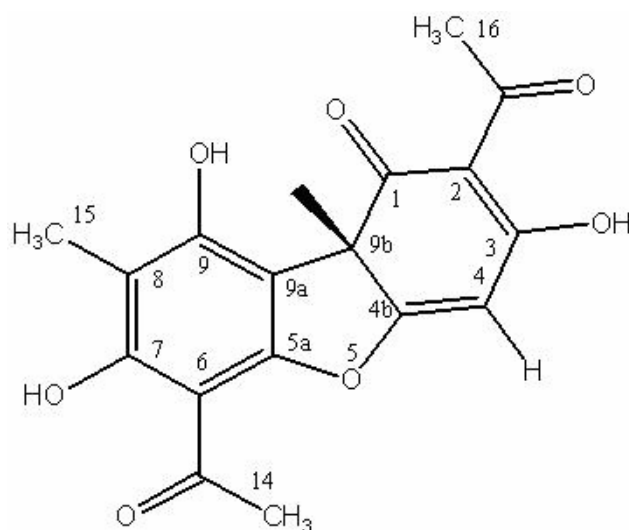


Fig. 1 – Estrutura molecular do ácido úsnico.

O ácido úsnico é largamente encontrado em espécies como *Cladonia* (cladoniaceae), *Usnea* (usneaceae), *Lecanora* (lecanoraceae), *Ramalina* (ramalinaceae) e *Parmelia* (parmeliaceae) (KRISHNA *et al.*, 1992; COCCHIETTO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

A biossíntese do ácido úsnico é processada via polimalonato para a formação da metilfloroacetona com a inserção do grupo metil ocorrendo antes da aromatização. Posteriormente ocorre uma oxidação fenólica estereoespecífica, ligando-se duas moléculas de metilfloroacetona dando origem ao ácido úsnico hidratado. Através da desidratação é formada a ligação éter obtendo-se finalmente a molécula do ácido úsnico (EDWARDS *et al.*, 2003).

O ácido úsnico apresenta-se na forma cristalina com coloração levemente amarelada (Fig. 2) e existe na natureza em duas formas enantioméricas: (+) e (-) - ácido úsnico dependendo da posição do grupo metil do carbono quiral 9b (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). É praticamente insolúvel na água, 0,01 g/100 ml à 25°C, solúvel em solventes orgânicos como a acetona, o clorofórmio, o metanol, o acetato de etila e o diclorometano (INDEX

MERCK, 1995); apresenta ponto de fusão em torno de 204°C (KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2002). Em particular, as ligações de hidrogênio intramoleculares contribuem para a característica lipofílica do ácido úsnico; seu efeito citotóxico é atribuído aos grupamentos β -tricetona presentes na molécula (COCCHIETTO *et al.*, 2002; CAMPANELLA, *et al.*, 2002). A hepatotoxicidade do ácido úsnico, observada em roedores (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004) e em pacientes que utilizaram suplementos dietéticos contendo o ácido (NEFF *et al.*, 2004), pode ser atribuída à destruição da membrana dos hepatócitos e à alteração da função mitocondrial (HAN *et al.*, 2004).



Fig. 2 – Aspecto macro e microscópico (óptico) do ácido úsnico.

2.1.1 – Atividades biológicas do ácido úsnico

O ácido úsnico é conhecido mundialmente por suas diversas atividades biológicas como por exemplo: antibiótica, antiinflamatória, antiprotozoária, antiviral, antitumoral, antimicótica (COCCHIETTO *et al.*, 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; De CARVALHO *et al.*, 2005). Dentre as várias atividades são bem descritas na literatura a utilização de ácido úsnico contra leishmania cutânea (FOURNET *et al.*, 1997), bem como seu efeito antimitótico em diferentes sistemas biológicos (CARDARELLI *et al.*, 1997). Ghione e colaboradores (1989) relataram a utilização do ácido úsnico na prevenção e tratamento de placas e cáries dentárias. Os resultados revelaram que nos pacientes os quais fizeram uso de um creme dental contendo o ácido úsnico, houve diminuição no número de unidades

formadoras de colônias (UFC); o estudo revelou que o ácido é um agente antimicrobiano seletivo contra *Streptococcus mutants*, principal causa da placa dentária e principal agente etiológico das cáries e doenças periodontais. Também é relatada na literatura a atividade *in vitro* do ácido úsnico extraído da *Cladonia substellata* contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* (De CARVALHO *et al.*, 2005). Observou-se o potencial uso do ácido na doença de Chagas, uma vez que, a atividade do ácido úsnico foi efetiva frente às formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas causando danos às mitocôndrias e ao cinetoplasto.

Mesmo apresentando várias atividades biológicas, a utilização do ácido úsnico na terapêutica ainda é limitada devido a algumas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como a baixa hidrofiliabilidade e ainda devido a sua hepatotoxicidade (HAN *et al.*, 2004). Deste modo, a utilização do ácido úsnico na sua forma livre torna-se bastante restrita sendo necessárias alternativas para contornar suas características físico-químicas desfavoráveis, diminuir seus efeitos tóxicos e manter suas atividades biológicas. Uma das formas já citadas na literatura é a incorporação do ácido úsnico em sistemas de liberação controlada. Santos e colaboradores (2005) descreveram a ação antiproliferativa do ácido úsnico livre e incorporado em nanocápsulas utilizando-se para o estudo células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H 292); os resultados mostraram uma atividade citotóxica considerável, com IC₅₀ de 10 e 13,8 µg/mL para o ácido úsnico livre e encapsulado respectivamente. Já Ribeiro-Costa e colaboradores (2004) avaliaram o efeito citotóxico do ácido úsnico livre e incorporado em microesferas de PLGA (ácido poli-lático e glicólico) contra carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2); os resultados demonstraram que a concentração requerida para inibir 50% da proliferação celular (IC₅₀) foi de 12,6 µg/mL para o ácido úsnico livre e 14,4 µg/mL para o ácido úsnico incorporado em microesferas. Os dois trabalhos mostraram

a atividade antitumoral do ácido com uma diminuição na sua toxicidade. Desta forma, a encapsulação do ácido úsnico em sistemas de liberação controlada de fármacos proporcionou uma melhoria na atividade do ácido diminuindo sua toxicidade.

Uma outra forma de utilizar compostos insolúveis em água como o ácido úsnico, é aumentando sua hidrossolubilidade através de métodos diversos como: ajuste de pH, utilização de co-solventes, de surfactantes, além da complexação com ciclodextrinas. Kristmundsdóttir e colaboradores (2002; 2005) utilizaram o ácido úsnico como um protótipo de droga insolúvel e tentaram obter um solvente que fosse capaz de solubilizar o ácido, não sendo capaz de interferir nos testes de atividade celular. Na pesquisa utilizaram-se co-solventes (glicofurol 75, propilenoglicol, polietilenoglicol 400), surfactantes (polissorbato 20 e cremofor RH40), o agente complexante 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e diferentes pHs. Os resultados mostraram que somente a ciclodextrina foi capaz de solubilizar o ácido úsnico e não interferir diretamente nos testes realizados nas células, satisfazendo assim, os critérios de solubilidade e baixa toxicidade necessários para realização de testes de atividade biológica em células. Os autores utilizaram a ciclodextrina como agente solubilizante; no entanto, não comprovaram se houve interação entre a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e o ácido úsnico ou possível formação de complexos de inclusão, através de caracterização físico-química.

2.2 – Ciclodextrinas – Aspectos gerais

As ciclodextrinas são conhecidas há mais de 100 anos; e em 1891 foram produzidas pela primeira vez por Villiers através da digestão do amido pelo *Bacillus amylobacter* e em 1903, Schardinger demonstrou a estrutura cíclica das ciclodextrinas (SINGH *et al.*, 2002).

As ciclodextrinas também são conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses e Schardinger dextrinas (MARTIN Del VALLE, 2004). A digestão do amido para obtenção das ciclodextrinas é promovida pela enzima Ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) que, atualmente, pode ser obtida por diferentes microrganismos. A enzima CGTase catalisa a conversão do amido em CDs por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Essa enzima possui massa molecular da ordem de 70-75kD e apresenta uma sequência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima α -amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (CUCOLO *et al.*, 2006).

As ciclodextrinas consistem em diferentes números de unidades de glicopirranose, pelo menos seis, as quais estão ligadas por ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ (CHALLA *et al.*, 2005). Apresentam-se na forma de cone truncado, onde os grupos OH secundários ligados aos carbonos 2 e 3 (C-2 e C-3) ocupam a base de maior diâmetro do tronco, enquanto que as hidroxilas primárias ligadas ao carbono 6 (C-6) localizam-se na base menor do tronco. Esta conformação faz com que as ciclodextrinas apresentem uma superfície exterior hidrofílica, enquanto que a cavidade interna com características lipofílicas (Fig. 3).

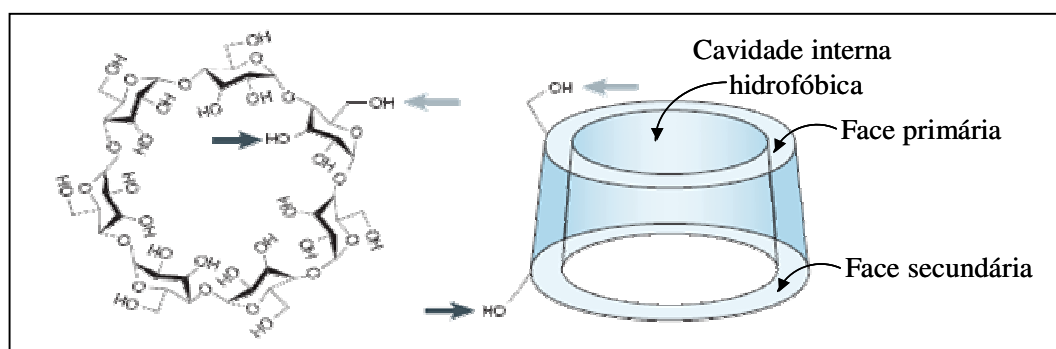


Fig. 3 – Estrutura química da ciclodextrina

2.2.1 Classificação das ciclodextrinas

As ciclodextrinas são classificadas de forma geral em α , β e γ (ciclodextrinas naturais). Essa classificação depende da quantidade de unidades de glicopiranoses (glicose) existentes, as quais determinarão o tamanho da cavidade interna. Assim, as ciclodextrinas α , β e γ possuem seis, sete e oito unidades de glicopiranoses e diâmetro de aproximadamente 5,2; 6,6 e 8,4 Å respectivamente (Tabela 1) (CONNORS, 1997).

Tabela 1 – Algumas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

Propriedade	Ciclodextrina		
	α	β	γ
nº de unidades de glicose	6	7	8
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Peso molecular	972,85	1134,99	1297,14
Largura da cavidade (Å)	8	8	8
Diâmetro da cavidade (Å-aprox)	~ 5,2	~ 6,6	~ 8,4
Solubilidade (água, 25°C) mol L ⁻¹	0,1211	0,0163	0,168
ΔH° (solução), kcal mol ⁻¹	7,67	8,31	7,73
ΔS° (solução), cal mol ⁻¹ K ⁻¹	13,8 ^a	11,7 ^a	14,7 ^a

Dentre as ciclodextrinas naturais, a β -ciclodextrina é largamente utilizada. Esse fato é atribuído tanto devido ao seu preço, como a sua disponibilidade e ainda pelo tamanho de sua cavidade interna, a qual é apropriada para compostos com peso molecular entre 200 e 800 g/mol (ZINGONE & RUBESSA, 2004).

Além das ciclodextrinas naturais, vários derivados de ciclodextrinas têm sido sintetizados com objetivo de se obter uma melhoria na formação dos complexos de inclusão

(DUCHÊNE *et al.*, 1999; HIRAYAMA & UEKAMA, 1999; CALABRÒ *et al.*, 2004). Geralmente esses derivados são produzidos por aminações, esterificações ou eterificações das hidroxilas primárias e secundárias. Dependendo do substituinte, a solubilidade do derivado formado torna-se diferente das ciclodextrinas naturais. De certa forma, em todos os derivados formados houve modificação do volume da cavidade hidrofóbica, aumento da solubilidade, estabilidade contra luz, oxigênio e melhoria na complexação com diversos compostos (DAVIS & BREWSTER, 2004; MARTIN Del VALLE, 2004). Os derivados das ciclodextrinas naturais estão sendo cada vez mais utilizados como é o caso da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Esse derivado hidroxialquil, pode ser uma alternativa para a α , β e γ ciclodextrina, pois apresenta maior solubilidade em água e uma provável menor toxicidade (GOULD & SCOTT, 2005). Após administração oral, a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina é metabolizada por bactérias do cólon sendo uma parte excretada de forma intacta (aproximadamente 60%) e outra parte como metabólitos (aproximadamente 40%). As ciclodextrinas, de um modo geral, apresentam resistência à degradação pelas enzimas presentes no organismo humano. Quando administradas por via intravenosa, elas são essencialmente excretadas de forma intacta pelos rins. No entanto, enzimas bacterianas e fúngicas são capazes de degradar as ciclodextrinas; logo, aquelas ingeridas são metabolizadas no cólon e em seguida excretadas. As ciclodextrinas são praticamente atóxicas e sua toxicidade vai depender da via de administração; quando administrada por via intravenosa, a DL_{50} em camundongos é de 1g, 0,79g e aproximadamente 4,0g por kg para a α , β e γ ciclodextrinas, respectivamente (DAVIS & BREWSTER, 2004).

2.2.2 – Complexos de inclusão com ciclodextrinas

Uma das áreas mais importantes da biotecnologia e bioengenharia é o fenômeno da complexação molecular, a qual tem grande importância na seletividade, solubilização e separação de uma diversidade de biomoléculas.

A presença da cavidade interna hidrofóbica das ciclodextrinas faz com que elas tenham a capacidade de alojar uma molécula hóspede formando complexos ou compostos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (Fig. 4) (MARTIN DEL VALLE, 2004). Para a formação de complexos com ciclodextrina é necessário que a molécula hóspede, ou parte da molécula, entre em contato com a cavidade da ciclodextrina para que seja formada uma associação estável. Uma variedade de forças não-covalentes (química supramolecular) como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, são responsáveis pela formação do complexo. É importante ressaltar que não ocorrem interações fortes como ligações covalentes. Os complexos têm sido extensivamente estudados por promover um aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água. Além de melhorar a hidrossolubilidade a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do composto utilizado como princípio ativo (DEVARAKONDA *et al.*, 2005).

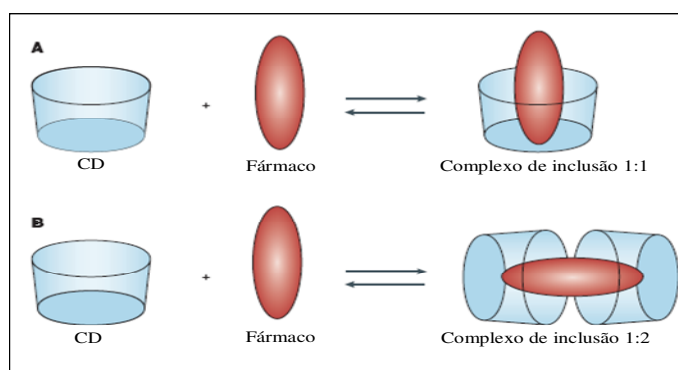


Fig. 4 – Ilustração da associação entre a ciclodextrina e fármaco; (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2 (DEVARAKONDA *et al.*, 2005).

2.2.3 – Métodos de preparação dos complexos de inclusão

O método de complexação tem grande influência no composto final obtido (MURA *et al.*, 1999); desta forma, é importante que seja realizada uma seleção da melhor metodologia levando-se em consideração não só o complexo final obtido, como também simplicidade do método, baixo custo, rendimento elevado, rapidez e principalmente facilidade de transposição de escala. Há diversos métodos de complexação propostos na literatura mas ainda não há “regras gerais” ou “métodos universais” para a formação de complexos de inclusão, isso porque cada composto a ser complexado é um caso particular, ou seja, possui características específicas e por isso as condições ideais podem variar de acordo com as características tanto do composto utilizado como da ciclodextrina (MURA *et al.*, 1999). Além dos diferentes métodos, parâmetros de um único método podem variar como por exemplo: temperatura, tempo de agitação, solventes e a proporção molar de ciclodextrina utilizada. De maneira geral os métodos de complexação são:

- **Mistura física:** a mistura física é obtida simplesmente com a junção da ciclodextrina e da droga a ser complexada. A mistura física é utilizada geralmente como padrão de não-complexação; no entanto, é descrito na literatura que mesmo com a mistura física pode haver interações entre a ciclodextrina e droga. (BARBATO *et al.*, 2003).

- **Pasta:** neste método quantidades equimolares da ciclodextrina e da droga são misturadas em cadinho com auxílio de pistilo. Em seguida é acrescentado solvente (geralmente etanol) e homogeneizado até obtenção de uma pasta uniforme; por fim, a pasta é seca em dessecador com vácuo obtendo-se o pó (MANOLIKAR & SAWANT, 2003; MURA *et al.*, 1999; VILLAYERDE *et al.*, 2004).

- **Co-evaporação:** na co-evaporação a ciclodextrina e a droga são solubilizadas em uma mistura de água e solvente miscível na água (etanol, metanol, etc.). A solução

permanece sob agitação constante e em seguida é levada ao rota-evaporador para que o solvente seja retirado. O complexo obtido é seco em dessecador à vácuo a temperatura ambiente (MANOLIKAR & SAWANT, 2003).

- **Co-precipitação:** esta técnica é bastante utilizada; nela a ciclodextrina é solubilizada em água e a droga em solvente orgânico adequado. Após completa solubilização, os dois compostos são misturados e permanecem sob temperatura e agitação constantes. Em seguida a solução é resfriada a temperatura ambiente; o precipitado obtido é filtrado e lavado com solvente para a remoção da droga que não foi complexada. O precipitado é seco em dessecador à vácuo a temperatura ambiente. (MANOLIKAR & SAWANT, 2003; DEVARAKONDA *et al.*, 2005) ou por liofilização. Este método é essencialmente um método de laboratório; geralmente é utilizado para obter pequenas quantidades de complexos e realizar caracterizações físico-químicas para observar seu comportamento. No entanto, devido a grande quantidade de água utilizada, geralmente este método não é utilizado para formação de complexos em escala industrial, sendo necessária a utilização de outras alternativas para a transposição de escala (HEDGES, 1999).

- **Spray-Dry:** neste procedimento a droga e a ciclodextrina são solubilizadas em solvente miscível em água e na água, respectivamente. As duas soluções são misturadas por sonicação até obtenção de solução limpa a qual é seca pelo equipamento spray-dry. Segundo Villaverde e colaboradores (2004), complexos de inclusão com o herbicida Norflurazon utilizando um spray-dry foram obtidos seguindo parâmetros como: fluxo de 10 ml s⁻¹, temperatura de entrada de 157°C, temperatura de saída de 90°C, e fluxo de ar 400 l h⁻¹.

- **Freeze-Dry:** Complexos de inclusão seguindo-se este método são obtidos com a completa solubilização da ciclodextrina em água e posterior adição da droga na solução de

ciclodextrina. A mistura permanece sob agitação constante durante certo tempo (24, 48h); em seguida é congelada e a água é retirada por liofilização (ZIGONE & RUBESSA, 2005; BARBATO *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Este método tem como grande vantagem a possibilidade de ser utilizado tanto em escala laboratorial como em escala industrial.

2.2.4 – Caracterização dos complexos de inclusão

A caracterização físico-química dos complexos de inclusão pode ser realizada por diferentes métodos. Na literatura geralmente são encontrados como formas de caracterização a análise térmica: Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), difração de raios-X em pó, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e estudo de dissolução. Além dessas formas de caracterização, um teste de grande importância foi descrito por Higuchi e Connors (1965). Chamado de Estudo de Solubilidade de Fases, este teste tem como objetivo relacionar o efeito da ciclodextrina (agente solubilizante) na solubilidade de um composto. O diagrama de solubilidade de fases é obtido pela relação entre a concentração molar do fármaco em função da concentração molar da ciclodextrina. A curva de solubilidade de fases obtida através do diagrama, pode ser classificada em curvas tipo A e B. A curva tipo A indica a formação de um complexo solúvel em água, por outro lado a curva tipo B sugere que houve formação de complexos de inclusão com baixa solubilidade em água. Há ainda os subtipos B_S e B_I, indicando que houve formação de complexos com solubilidade limitada e insolúveis em água, respectivamente; e os subtipos A_L, A_P e A_N os quais representam um aumento linear da solubilidade do composto com o aumento da concentração de ciclodextrina, desvio positivo e desvio negativo, respectivamente (CHALLA *et al.*, 2005) (Fig. 5). Para os complexos 1:1, é possível calcular a constante de

associação a partir da porção linear da curva utilizando a equação mostrada na Figura 5, onde “slope” é a inclinação da reta e S_0 é a solubilidade intrínseca do composto nas condições estudadas (MARTIN Del VALLE, 2004).

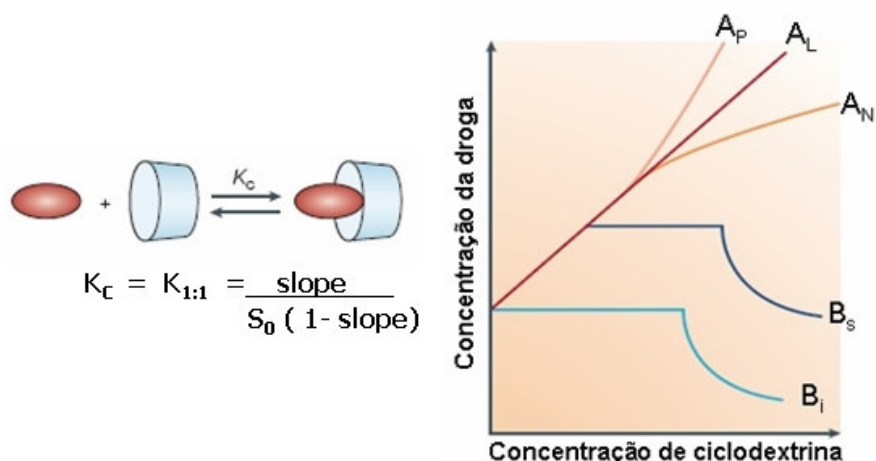


Fig. 5 – Diagrama de Solubilidade de Fases (DEVARAKONDA *et al.*, 2005).

Como ocorrem interações fracas entre a molécula hóspede e a ciclodextrina, alguns testes não apresentam com clareza a formação de um novo composto. É importante que sejam realizados vários testes físico-químicos para que a junção dos resultados confirme, de forma segura, que houve a formação dos complexos de inclusão.

2.2.5 – Utilização das ciclodextrinas

Como as ciclodextrinas têm a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos, elas são largamente utilizadas em diversas áreas como a indústria farmacêutica, a indústria têxtil, a alimentícia, processos de separação, fermentação, catálise, proteção para o meio ambiente entre outras áreas.

Na indústria farmacêutica as ciclodextrinas são bastante utilizadas. Há na literatura complexos de ciclodextrina com uma diversidade de fármacos incluindo, por exemplo, o

Clotrimazol (BILENSOY *et al.*, 2006), a Dorzolamida (SIGURDSSON *et al.*, 2005), o Lorazepan (KOBETIC *et al.*, 2001), a Tolbutamina (SUIHKO *et al.*, 2001), o Diclofenaco (BARBATO *et al.*, 2003), β -lapachona (NASONGKLA *et al.*, 2003) entre vários outros. Os complexos formados oferecem vantagens como o aumento da solubilidade em água, o aumento da estabilidade dos fármacos complexados, melhoria na biodisponibilidade e diminuição dos efeitos adversos.

Além de fármacos também pode ser encontrado na literatura a formação de complexos de inclusão com herbicidas tais como: o Isoproturon e o Norflurazon (MANOLIKAR & SAWANT, 2003; VILLAVERDE *et al.*, 2004) para utilização na agricultura. As ciclodextrinas também são utilizadas para reduzir a volatilidade de certas substâncias como o mentol, que complexado pode ser seco a uma temperatura de até 100° mantendo praticamente sua quantidade teórica; por outro lado, o mentol sozinho submetido a essa mesma temperatura seria completamente volátil (HEDGES, 1999).

Ademais, com objetivo de melhorar a estabilidade de fármacos lipofílicos e obter uma liberação controlada, vários pesquisadores têm unido a tecnologia da formação de complexos de inclusão aos sistemas de liberação controlada como lipossomas (PIEL *et al.*, 2006; SALEM *et al.*, 2003; FATOUROS *et al.*, 2001; CORMACK & GREGORIADIS, 1998) e nanopartículas (BOUDAD *et al.*, 2001). Assim, a versatilidade das ciclodextrinas tem aumentado cada vez mais sua utilização proporcionando vantagens em diversas áreas.

2.3 – Sistemas de Liberação Controlada - Lipossomas

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas da ciência a qual envolve aspectos multidisciplinares diversos contribuindo bastante para o

avanço da saúde. O principal objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter constante a concentração plasmática do fármaco dentro da faixa terapêutica, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento como os efeitos tóxicos (picos além da faixa terapêutica) e a falta de efetividade (dose subterapêutica) da substância ativa (Fig. 6).

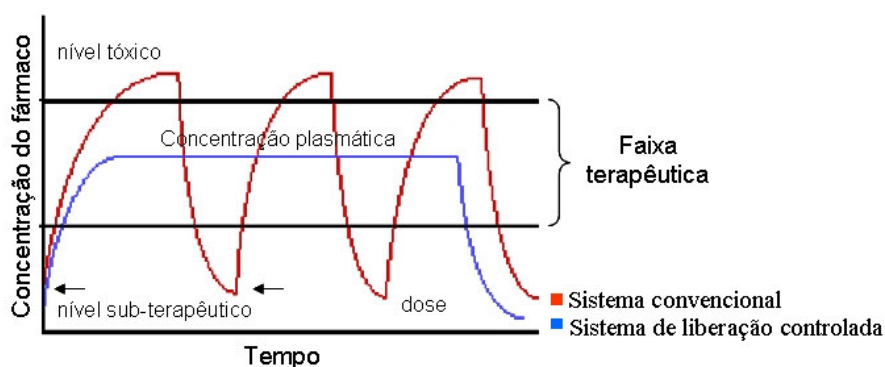


Fig. 6 – Farmacocinética comparativa das formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada.

Das várias formas de sistema de liberação controlada de fármacos os lipossomas, vesículas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolípidios (Fig. 7), despertam grande interesse devido a sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, seja na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (VOINEA & SIMIONESCU, 2002). Os lipossomas vêm sendo estudados por mais de 20 anos como carreadores com o objetivo de melhorar a vetorização de uma diversidade de agentes como quimioterápicos, antígenos, imunomoduladores, hemoglobina e cofatores, compostos quelantes e material genético (STORM & CROMMELIN, 1998). Como sistema de liberação controlada os lipossomas não só possibilitam a diminuição da concentração efetiva da droga utilizada, como também permitem um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos quando

se acrescentam, em sua superfície, ligantes químicos, lectinas, anticorpos entre outros compostos, permitindo alcançar o local de ação alvo e atingir o principal objetivo destes sistemas que é aumentar a ação terapêutica diminuindo sua toxicidade (ALLEN, 1995).

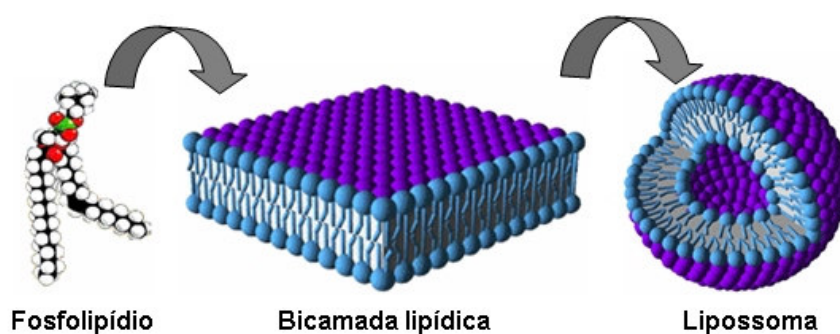


Fig. 7 – Passos da formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma.

A composição da bicamada lipídica é um fator de grande importância na preparação dos lipossomas e obtenção de preparações estáveis. A escolha dos componentes da bicamada pode determinar a fluidez ou rigidez da mesma e ainda proporcionar carga. Por exemplo, a utilização de fosfolípidos saturados como a dipalmitoilfosfatidilcolina forma uma estrutura rígida, enquanto que fosfatidilcolina com insaturações derivadas de fontes naturais como gema de ovo ou de soja, promove maior fluidez da membrana. Algumas preparações contêm lipídeos com carga como a fosfatidilserina, fosfatidilglicerol ou dicetilfosfato que possuem carga negativa; por outro lado a estearilamina e alguns diacil lipídeos são carregados positivamente. A presença de cargas nos lipossomas é importante para aumentar a estabilidade, pois promove repulsão entre as vesículas evitando uma possível fusão entre elas, o que levaria à precipitação e instabilidade das formulações.

2.3.1 – Classificação dos lipossomas

O lipossomas podem ser classificados de várias formas. As Figuras 8 e 9 expõem as duas formas de classificação mais utilizadas baseando-se tanto no número de lamelas como no tamanho das vesículas; a outra classificação baseia-se na composição química dos lipossomas (STORM & CROMMELIN, 1998; SHARMA & SHARMA, 1997). Na primeira, os lipossomas podem ser classificados como vesículas multilamelares grandes (MLV – *Multilamellar Large Vesicles*) que são aqueles lipossomas de tamanho em escala micrométrica que possuem vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados; vesículas unilamelares grandes (LUV – *Large Unilamellar Vesicles*) que são lipossomas de tamanhos em escala de micrômetros possuindo um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica); e os lipossomas em escala nanométrica que também possuem um compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica) que são classificados como vesículas unilamelares pequenas (SUV – *Small Unilamellar Vesicles*).



Fig. 8 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas.

Já de acordo com a composição química os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos, sítio-específicos e catiônicos.

Os lipossomas convencionais são definidos como os lipossomas formados basicamente por fosfolípídeos, podendo estes ser neutros ou com carga (positiva ou negativa) e ainda conter colesterol. Este tipo de lipossoma foi o primeiro a ser preparado

sendo então conhecido como lipossomas de primeira geração e caracterizam-se por apresentarem uma rápida circulação sanguínea. Quando são administrados *in vivo* (geralmente administração intravenosa), eles tendem a se acumular rapidamente nas células fagocitárias do sistema mononuclear, ou sistema retículo-endotelial, acumulando-se no fígado e baço (STORM, & CROMMELIN, 1998; TORCHILIN, 2005). Devido a essa alta captura pelo sistema retículo-endotelial, os lipossomas convencionais são potentes candidatos a carrear fármacos que vão agir nos macrófagos. Por outro lado, a rápida e eficiente eliminação dos lipossomas convencionais da circulação pelos macrófagos (especialmente do fígado e baço), compromete a aplicação desses lipossomas no tratamento de uma variedade de patologias que envolvem outros tecidos e órgãos além do fígado e baço. Os problemas existentes levaram ao desenvolvimento de sistemas lipídicos modificados (essencialmente pela inserção de certas moléculas na sua camada exterior), com o objetivo de evitar a sua rápida eliminação. Os sistemas deste tipo foram designados genericamente por lipossomas furtivos ou *stealth liposomes* (SANTOS & CASTANHO, 2002).

Os lipossomas furtivos, também conhecidos como de longa duração ou lipossomas PEG-lados, representam um marco na pesquisa relacionada com esse tipo de sistema de liberação controlada. Sua característica mais importante é a capacidade de não ser capturado pelo sistema retículo-endotelial permanecendo por mais tempo na circulação; além disso, eles têm a capacidade de extravasar partes do corpo onde a permeabilidade da parede vascular é aumentada, por exemplo, em áreas patológicas como tumor sólido, áreas de infecção e inflamação. Atualmente a forma mais comum de se preparar lipossomas de longa circulação é com a adição de polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), na superfície das vesículas lipossomais.

Um outro grande avanço relacionado às modificações estruturais dos lipossomas foi a obtenção de lipossomas sítio-específicos ou imunolipossomas. Neste tipo, moléculas como anticorpos, dextranas, lectinas, entre outras, são ligadas covalentemente à superfície dos lipossomas a fim de carregá-las para local específico de ação. Rolim-Santos e colaboradores (2006) descreveram a utilização da lectina Concanavalina A (ConA) como molécula sinalizadora para carrear lipossomas contendo doxorrubicina até as células alvo. Os autores obtiveram lipossomas estáveis com alta afinidade pelas células. Atualmente as pesquisas tendem para a preparação de lipossomas contendo PEG para uma maior circulação e ainda contendo moléculas na superfície proporcionando sítio-especificidade.

Por fim, os lipossomas catiônicos são utilizados para a terapia gênica. Os lipídios catiônicos interagem com o DNA, que possui carga negativa, neutralizando-o e condensando-o em uma estrutura mais compacta, com melhor ação quando comparado ao DNA encapsulado em lipossomas (STORM, & CROMMELIN, 1998).

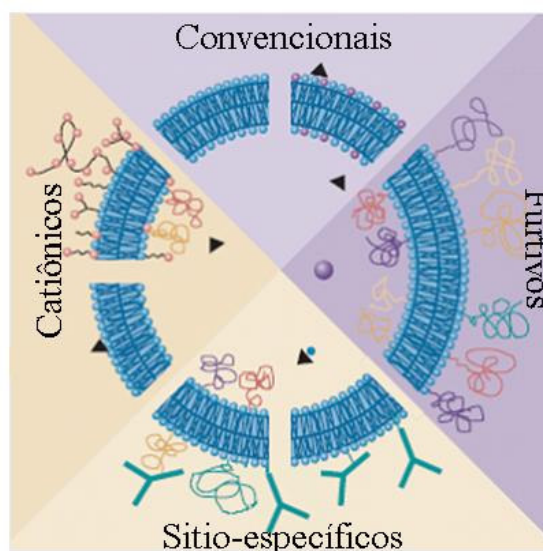


Fig. 9 – Classificação dos lipossomas quanto à constituição (STORM, G. & CROMMELIN, 1998 modificado).

2.3.2 – Métodos de preparação

– **Extrusão:** este método caracteriza-se pela utilização de uma Prensa de French ou membranas de Policarbonato. No primeiro caso, os lipossomas multilamelares são submetidos a altas pressões em um reservatório cilíndrico com um orifício localizado na parte final o qual promove a fragmentação das vesículas através de forças de cisalhamento; desta forma são obtidos lipossomas unilamelares de escala nanométrica após sucessivas passagens pela prensa. Quando se utilizam as membranas de policarbonato há uma uniformização no tamanho das vesículas, as quais passam através dos poros contidos na membrana que têm seus tamanhos diminuídos de forma gradativa (SANTOS & CASTANHO, 2002; DEOL & KHULLER, 1997; FATTAL *et al.*, 1993).

– **Hidratação do filme lipídico:** este método é bastante utilizado para obtenção dos lipossomas. Primeiramente os lipídeos e os fármacos lipofílicos são solubilizados em solventes orgânicos ou mistura de solventes; em seguida o solvente é retirado através de evaporação sob pressão havendo a formação de um filme lipídico aderido na parede do balão. O segundo passo é a hidratação do filme lipídico com o meio aquoso (tampão) havendo espontaneamente a formação das vesículas lipossomais; caso o fármaco seja hidrofílico, este será solubilizado com o meio aquoso (tampão ou água) (FATTAL *et al.*, 1993). Os lipossomas obtidos são de escala micrométrica e com várias lamelas (MLV). Para obtenção de lipossomas em escala nanométrica é necessário que as vesículas obtidas sejam submetidas a uma sonda de ultra-som para que as lamelas sejam quebradas e o tamanho das vesículas diminuído.

– **Evaporação em fase-reversa:** neste método primeiramente os fosfolipídios são solubilizados em solvente orgânico e em seguida adiciona-se a fase aquosa. A mistura é levada ao ultra-som para haver formação de uma emulsão hidrofílica/lipofílica. Finalmente,

o solvente orgânico é retirado por evaporação sob pressão reduzida formando assim os lipossomas com tamanho médio de 500 nm (FATTAL *et al.*, 1993).

– **Microfluidização:** neste método os lipossomas multilamelares já obtidos passam por um filtro de poros conhecido sob alta pressão, chegando em uma câmara de integração onde a preparação é separada por dois canais que se encontram ao fim em alta velocidade promovendo colisão entre as vesículas. Após 10 passagens, em média, o choque das colisões é suficiente para obtenção de lipossomas unilamelares com tamanho inferior a 100 nm (FATTAL *et al.*, 1993).

2.3.3 – Caracterização dos lipossomas

Os lipossomas podem ser caracterizados de diversas formas; parâmetros como diâmetro e distribuição do tamanho da vesícula, determinação do número de lamelas, constituição da membrana lipídica, determinação da concentração do princípio ativo encapsulado e eficiência de encapsulação geralmente são utilizados (Fig. 10). No laboratório além desses parâmetros são utilizados para caracterização dos lipossomas os estudos de estabilidade acelerado e a longo prazo compreendendo no primeiro estudo os testes de centrifugação, estresse mecânico e ciclos de congelamento e descongelamento; já no estudo de estabilidade a longo prazo é feito o acompanhamento do pH das preparações e os aspectos macro e microscópicos.

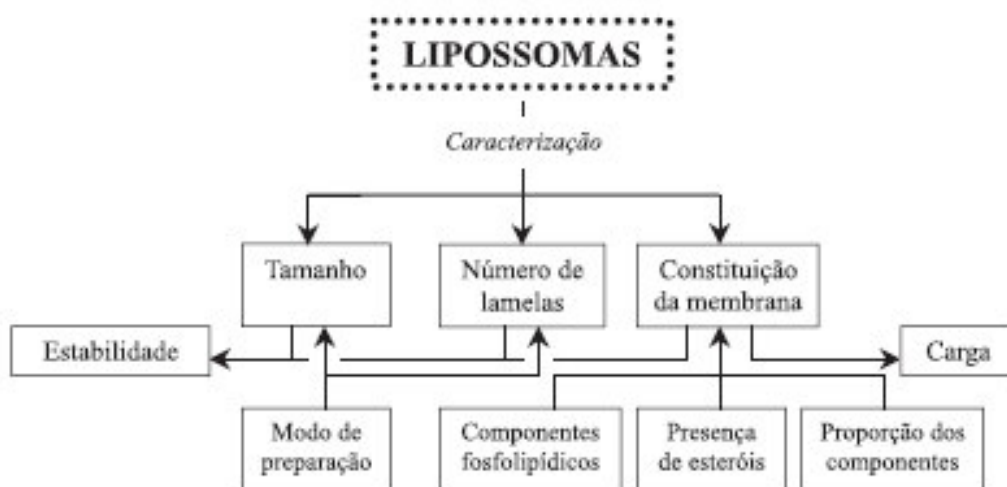


Fig. 10 – Esquema representativo dos diversos parâmetros que caracterizam os lipossomas. Adaptado de Santos & Castanho, 2002.

2.3.4 – Aplicações Farmacêuticas

O campo da pesquisa utilizando lipossomas tem expandido consideravelmente nos últimos 30 anos. Atualmente se desenvolvem lipossomas com diferentes características modificando-se o tamanho das vesículas, a composição lipídica e ainda as características da sua superfície para que eles possam ser utilizados em uma aplicação específica.

Os lipossomas podem ser utilizados como carreadores para diagnósticos encapsulando-se agentes de contrastes para detecção de tumores por tomografia computadorizada (BANERJEE, 2001); podem ainda carrear fármacos com objetivo de reduzir os efeitos tóxicos e aumentar o tempo de circulação do fármaco no organismo com conseqüente melhoria na eficácia terapêutica. Atualmente há no mercado vários fármacos encapsulados em lipossomas como, por exemplo, os antineoplásicos Daunoxome®, Doxil®, que é a Daunorrubicina e a Doxorubicina encapsulados respectivamente; o antibiótico Anfotericina B comercializado com o nome de Ambisome® (TORCHILIN, 2005); o DepoCyt® que é a Citarabina encapsulada em lipossomas indicada

para o tratamento de meningite linfomatosa, entre outros. Além disso, muitas indústrias de cosméticos estão investindo nos sistemas de liberação controlada, mais especificamente nos lipossomas, com objetivo de melhorar a penetração de diversos compostos como, por exemplo: Aloe-Vera e vitaminas A, C e E através da pele.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Geral: obter complexos de inclusão ácido úsnico e β -ciclodextrina e nanoencapsular os complexos em lipossomas para obter sistemas de liberação controlada.

3.2 – Específicos:

- Obter os complexos de inclusão ácido úsnico: β -ciclodextrina (AU: β CD) e caracterizar, utilizando métodos físico-químicos;
- Avaliar se a complexação interferiu na atividade antibacteriana do ácido úsnico;
- Nanoencapsular os complexos AU: β CD em lipossomas;
- Realizar estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo dos lipossomas contendo os complexos;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* do complexo (AU: β CD) encapsulado em lipossomas e fazer um comparativo com os lipossomas contendo ácido úsnico e os complexos não encapsulados.

4 – A R T I G O

(A ser submetido ao International Journal of Pharmaceutics)

Inclusion complex of usnic acid/ β -cyclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into liposomes

Mariane C.B. Lira^{a,b}, Maria E. Cortes^c; Karina I. Teixeira^c; Ruben D. Sinisterra^d; Gilles Ponchel^e; Nereide S. Santos-Magalhães^{a,b,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ^bLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, UFPE, Recife, PE, Brasil; ^cFaculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; ^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; ^eUniversité Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

Keywords: Usnic acid, β -cyclodextrin, inclusion drug complex, liposomes

*Corresponding author:

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Grupo de Sistema de Liberação Controlada de Medicamentos
Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária.
50670-901, Recife-PE, Brasil.
Tel: +55-81-2126 8484
Fax: +55-81-2126 8485
E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

In this study β -cyclodextrin was used to improve usnic acid (UA) solubility and the inclusion complex (UA: β CD) was incorporated into liposomes. UA: β CD complexes were prepared using the freeze-drying technique and characterized through infrared and ^1H NMR spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis. Phase-solubility assay The phase-solubility diagram of UA: β CD showed an A_L curve with an apparent stability constant $K_{1:1}=745 \text{ M}^{-1}$, suggesting the formation of a complex. In presence of 11.5 mmole of β CD the solubility of UA was increased more than 10-fold. UA: β CD inclusion complex presented IR and ^1H NMR spectral modifications in comparison with UA or β CD spectra. A change in UA from its crystalline to amorphous form was observed on X-ray, suggesting the formation of a drug inclusion complex. DSC analysis showed the disappearance of the UA fusion peak. No difference between the antimicrobial activity of free UA and UA: β CD was observed, supporting the hypothesis that the complexation with cyclodextrin did not interfere with the drug activity. Liposomes were prepared using hydration of a thin lipid film method with subsequent sonication. Liposomes containing UA: β CD were evaluated using standard stability tests. Formulations of liposomes containing UA: β CD exhibited a drug encapsulation efficiency of 99.5%, and remained stable for four months in a suspension form. Interestingly, the encapsulation of UA: β CD into the liposomes resulted in a modulation of in vitro kinetic release of UA. Indeed, liposomes containing UA: β CD presented a more prolonged release profile of free usnic acid compared to usnic acid-loaded liposomes.

1. Introduction

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligomers formed by the action of certain enzymes on starch. They are oligomers of α -D-glucose, which are linked by glycosidic bonds between α -(1,4) carbon atoms (Del Valle, 2004). The glucose chains form a cone-linked cavity into which hydrophobic compounds, or part of them, may enter and form a water-soluble complex changing the physicochemical properties of the included drug (Connors, 1997). The number of glucose units determines the name and size of the cone-linked cavity: α -cyclodextrin, β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin, having six, seven and eight glucose units and an inner diameter cavity of 5.2, 6.6 and 8.4 Å, respectively. The most common pharmaceutical application of cyclodextrins is as enhancers of solubility of hydrophobic drugs, but they could also increase the stability and bioavailability of drug molecules. In fact, it has been extensively described in the literature that cyclodextrins can form inclusion complexes with a variety of hydrophobic compounds changing their physicochemical characteristics (Manolikas & Sawant, 2003; Teixeira *et al.*, 2003). Since the complex drug:cyclodextrin generally dissociates rapidly in biological fluids, depending on the route of delivery, the pharmacokinetics of drugs is expected to be the same as that of the free drugs. Moreover, entrapping these drug complexes into drug delivery systems, such as liposomes (Hagiwara *et al.*, 2006; Maestrelli *et al.*, 2005; McCormack & Gregoriadis, 1998; Salem & Düzgünes, 2003; Piel *et al.*, 2006) or nanoparticles (Boudad *et al.*, 2001), restrains their dissociation and contributes to altering the pharmacokinetics of drugs.

Usnic acid, a yellowish pigment, is a product of the secondary metabolism of lichens and exists in two enantiomeric forms (+)-usnic acid and (-)-usnic acid, which differ in orientation from the methyl group located in chiral carbon at the 9b position (Fig. 1)

(Cochietto et al., 2002). This dibenzofuran derivative is widely distributed in species of *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia* and *Parmotrema* (Ingólfssdóttir, 2002).

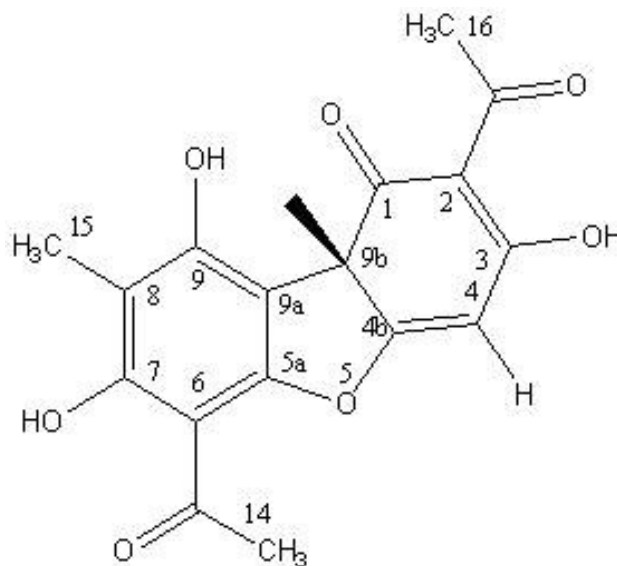


Figure. 1. Chemical structure of usnic acid ($C_{18}H_{16}O_7$).

Usnic acid is one of the most extensively studied lichen derivatives because it exhibits among others antimicrobial (Vartia, 1973) and antimycobacterial activities (Ingólfssdóttir et al., 1998). However, the therapeutic usefulness of usnic acid's potential benefits is limited by its unfavorable physicochemical properties, especially because its very poor water solubility (Kristmundsdóttir et al., 2002) and hepatotoxicity (Han et al., 2004; Ribeiro-Costa et al., 2004; Santos et al., 2006). As a result, its use in a safe and efficient manner requires a suitable solubilizer agent and/or carrier system for improving the therapeutic index of this drug.

Within this framework, the goal of this research was firstly to investigate the possibility of forming an inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin and to prepare and characterize usnic acid: β -cyclodextrin complex, and secondly to encapsulate this complex into liposomes in order to produce a targeted drug delivery system for

exploiting antimycobacterial activity of usnic acid. The liposomal formulation containing the usnic acid: β -cyclodextrin complex was characterized and the *in vitro* kinetic release was evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

(+)-usnic acid (98 %), cholesterol (CH), octadecylamine (SA) and β -cyclodextrin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); soya phosphatidylcholine (SPC) (98 % Epikuron 200[®]) was obtained from Lucas Meyer (Hamburg, Germany); solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 Methodology

2.2.1. Phase-solubility study of usnic acid in β -cyclodextrin

The phase solubility assay of usnic acid in β -cyclodextrin aqueous solutions was performed according to Higuchi and Connors (1965). An excess amount of usnic acid (3 mg) was added to 1.5 mL of water or β -cyclodextrin aqueous solutions (from 0 to 14 mg/mL) and shaken vigorously at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ until equilibrium (about 48 h). An aliquot of the mixture was withdrawn and centrifuged, and the supernatant was analyzed for usnic acid content using spectrophotometry (Ultrospec[®] 300, Amsham Pharmaceutical) at 280 nm (Siqueira-Moura et al., 2007). Assuming the formation of a complex with a 1:1 stoichiometric ratio, the apparent stability constant ($K_{1:1}$) was calculated from the linear relationship between the molar concentration of usnic acid in the solution medium versus β -cyclodextrin molar

concentration according to the equation: $K_{1:1} = \text{slope} / [S_0(1 - \text{slope})]$, where S_0 is the solubility of usnic acid in the absence of β -cyclodextrin.

2.2.2. Preparation of UA: β CD inclusion complex

The UA: β CD solid inclusion complex was prepared using the freeze-drying technique in a 1:1 molar ratio (1.45×10^{-4} mol). Freeze-dried product was obtained by dissolving the β -cyclodextrin in water and slowly adding powder usnic acid. The mixture was stirred for 24 hours, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. Furthermore, a physical mixture of UA and β CD to be used as a control was prepared by mixing the powder of both components in a 1:1 molar ratio.

2.2.2. Characterization of UA: β CD inclusion complex

UA: β CD inclusion complex was characterized using infrared and ^1H NMR spectroscopy, X-ray powder diffraction pattern, and thermal analysis. The kinetics assays were also performed. The antimicrobial activity against three different microorganisms was evaluated to investigate the effect of complexation with β -cyclodextrin on usnic acid activity. All assays performed were compared with other in which pure compounds were used.

Infrared spectra (IR) were recorded on an IR-TF Galaxy 3000 Mattson spectrometer in the $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ range using the KBr disc method. In this procedure the pellets were prepared by grinding each sample (usnic acid, β -cyclodextrin and inclusion complex) with KBr using a pestle on an agate mortar and compacted with a hydraulic press. Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) analysis was carried out using a Bruker DPX-200 Avance

(200 MHz) equipment with samples diluted in deuterium dimethyl sulfoxide (d⁶-DMSO). X-ray powder diffraction patterns (XRD) were recorded on a Rigaku Geiger-flex 2073 apparatus using a copper tube with CuKα radiation ($\lambda = 1.50405$ nm).

Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of UA:βCD inclusion complexes and pure compounds were obtained with a DSC-50 thermal analyser (Shimadzu, Japan), with temperatures ranging from 50 to 400 °C with a heating rate of 10 °C/min. The analysis was carried out in a sealed aluminum pan.

The content of usnic acid in the inclusion complex was assessed by dissolving weighed amounts in a mixture of chloroform and methanol (1:1), sonicated for 5 min and the volume completed to 5 mL with methanol. The suspension was then centrifuged at 8.776 g, and the usnic acid solubilized in the supernatant was quantified at 280 nm (Siqueira-Moura et al., 2007). A standard curve of usnic acid was prepared in methanol at concentrations ranging from 2 to 15 µg/mL ($[UA] = Abs - a/b$; $a = 0.0176$; $b = 0.0703$; $r = 0.999$).

2.2.3. Antimicrobial Activity of UA:βCD complex

The antimicrobial activity of usnic acid was tested on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14 508) and *Actinobacillus actinomycetecomitans* (Y4-FDC, from the collection of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) using the disc-diffusion method. A sample of UA:βCD was dissolved in water to obtain 25, 50 and 75 µg/mL of drug concentrations. Usnic acid dissolved in DMSO (75 µg/mL) was used as a positive control. DMSO and βCD solutions were used as negative controls. Samples were tested on microorganism cultures 24 h previously seeded in their specific growing medium

as follows: *E. faecalis* on agar medium, *S. mutans* on mitis salivarius agar and *A. actinomycetemcomitans* on blood agar. The inhibitory zone diameters were determined after 24 h incubation. Finally, the data from assays carried out in triplicate were statistically analyzed using non-parametric Kruskal-Wallis test with a significance level of $p < 0.01$.

2.2.4. UA: β CD-loaded liposomes

2.2.4.1. Entrapment of UA: β CD complex into liposomes

Liposomes containing UA: β CD complex (UA: β CD-Lipo) were prepared using the thin lipid film method (Andrade et al., 2004). Briefly, soya phosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine (7:2:1) were dissolved in a mixture of CHCl_3 :MeOH (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed in a vacuum for 60 min ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, 80 rpm), producing a thin lipid film. This film was then hydrated with 10 mL of an aqueous phase composed of UA: β CD complex dissolved in pH 7.4 phosphate buffer solution, resulting in the formation of multilamellar liposomes. The liposomal suspension was kept under magnetic stirring for 5 min and was then sonicated (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s to form small unilamellar liposomes. Finally, liposomes were frozen at -80°C and lyophilized (EZ-DRY, FTSS System, New York, USA) at 200 bars for approximately 16 hours. Liposomes containing usnic acid (UA-Lipo) were also prepared in the conditions described above by dissolving the drug into the organic phase.

2.2.4.2. Characterization of UA: β CD-loaded liposomes

The stability of usnic acid inclusion complex-loaded liposomes was evaluated using standard accelerated and long-term stability testing. After preparation, samples of liposomal suspension were submitted to centrifugation (1.300 g for 1 h at 25°C), horizontal

mechanical stirring (180 strokes/min for 48 h at 37°C) and freeze-thaw cycles (-18°C for 16 h and 25°C for 8 h) (Andrade et al., 2004). For long-term stability evaluation, macroscopic appearance and pH variation were monitored after preparation and at predetermined time intervals. Lyophilized liposomal samples (stored at 4°C) were hydrated at predetermined time intervals and analyzed for determining the usnic acid content. Liposomes were diluted with a mixture of chloroform/methanol (1:1) for a theoretical concentration of 9.6 μ g/mL, and then sonicated for 5 min. Next, the volume was completed with methanol to 5 mL and the content of usnic acid was determined at 280 nm as previously described.

Drug encapsulation efficiency was determined by the ultrafiltration /ultracentrifugation technique using Ultrafree[®] units (Millipore, USA). After centrifugation of the samples (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) at 8.776 g for 1 h at 4°C, the usnic acid concentration in the supernatant was measured and the usnic acid encapsulation ratio was calculated in relation to its initial content in the liposome formulation.

2.2.4.3. *In vitro* kinetic release of UA: β CD-loaded liposomes

The *in vitro* kinetic release profile of UA: β CD-loaded liposomes (UA: β CD-Lipo) was assessed using the dialysis technique in comparison with usnic acid-loaded liposomes (UA-Lipo) and the usnic acid inclusion complex (UA: β CD). An aliquot of 1 mL of each formulation was placed inside a dialysis bag (cellulose membrane, cut-off =12,400 MW, Sartorius, Germany), which was sealed and immersed in a vessel containing 100 mL pH 7.4 phosphate buffer solution. The release system was maintained under magnetic stirring at 100 rpm and 37 $\pm$ 1°C and at predetermined time intervals 1 mL aliquot of dissolution

medium was withdrawn and the usnic acid content measured. After collection of the samples, the kinetic medium was refilled with a suitable amount of phosphate buffer solution.

3. Results and discussion

3.1 Phase solubility of usnic acid in β -cyclodextrin

Fig. 2 shows phase-solubility profiles of usnic acid in β -cyclodextrin solutions at different concentrations. A Type A_L diagram is displayed (Higuchi and Connors, 1965), where a linear relationship between the apparent drug solubility and β -cyclodextrin concentration was observed, indicating the formation of soluble complexes. The fact that the solubility of usnic acid was increased by the presence of β -cyclodextrin is a sign that one or more molecular interactions between them occurred to form distinct chemical species, which may be termed complexes. However, there is no guarantee that the complexes are first-order in the host. Since the slope of the A_L diagram was close to unity, the stoichiometric 1:1 ratio was assumed for calculating the equilibrium constant. In this manner, the value of the binding equilibrium constant ($K_{1:1}$) of the usnic acid and β -cyclodextrin complex was 745 M^{-1} (slope=0.47857 $\mu\text{g/ml}$; $S_0=1.23142$; $r=0.98743$). The high associate constant of usnic acid with β -cyclodextrin is compared with values found with other hydrophobic molecules such β -lapachona, which presents a $K_{1:1}$ equal to 700 M^{-1} (Nasongkla et al., 2003).

In presence of 11.5 mmol (1.5%) of β CD the solubility of usnic acid was increased more than 10-fold at 37°C. Similar results were obtained by Kristmundsdóttir et al. (2005)

with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. A 70-fold solubility increase of usnic acid in 10% hydroxypropyl- β -cyclodextrin (350 μ g/ml) at 25°C in comparison with its water solubility (5 μ g/ml) was found. This solubility increase is remarkable compared to the one obtained with various other solublizing agents (Kristmundsdóttir, 2002).

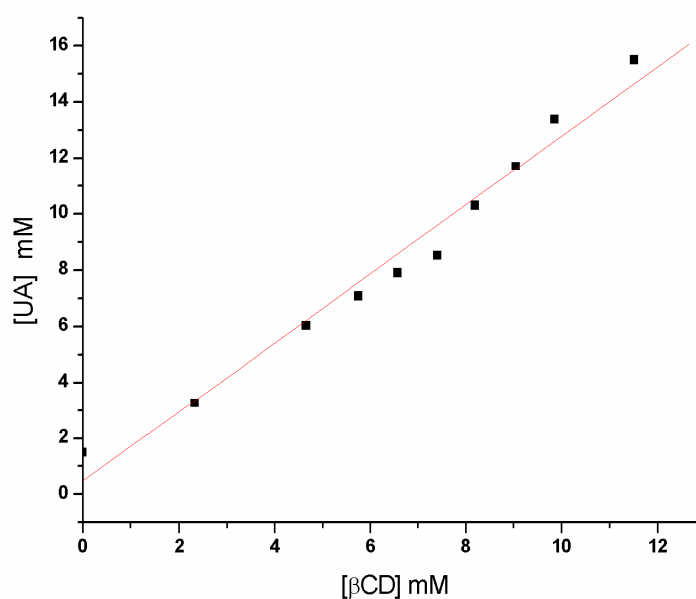


Figure 2. Phase-solubility diagrams of usnic acid and β -cyclodextrin in water at 37°C.

3.2 Characterization of UA: β CD inclusion complex

There is still no general rule or universal method for preparing inclusion complexes, probably because each drug to be complexed is a special case and the optimal conditions depend on the characteristics of both host and guest molecules (Mura et al., 1999). In the case of usnic acid the freeze-drying method led to the formation of a stable complex, showing a significant interaction between the drug and β -cyclodextrin as described below.

3.2.1. Spectroscopy analyses

IR spectra of usnic acid, β -cyclodextrin, physical mixture and UA: β CD inclusion complex are reported in Fig. 3. The spectrum of the inclusion complex showed a bandwidth at 3400 cm^{-1} corresponding to stretching $\nu(\text{O-H})$ of the β -cyclodextrin (Córtes et al., 2001). The formation of the inclusion complex entails the release of water molecules inside the β -cyclodextrin cavity. This signifies that new interactions between usnic acid and the β -cyclodextrin have appeared. Furthermore, when the inclusion complex spectrum was compared with the usnic acid one, the disappearance of bands around 1191 , 1144 and 1118 cm^{-1} was observed, corresponding to vibrational $\nu(\text{O-H})$, suggesting that an interaction between both molecules may have occurred. The IR spectrum of usnic acid is in agreement with data previously reported (Edwards et al., 2003; Marcano et al., 1999). Key vibrational assignments, such as the conjugated cyclic ketone group to the 1694 cm^{-1} band can be evidenced. It is also possible to verify weak bands at 1716 and 1676 cm^{-1} assigned to the $\nu(\text{C=O})$ non-conjugated cyclic ketone and the non-aromatic methyl ketone, respectively. Furthermore, the antisymmetric and symmetric $\nu(\text{COC})$ aryl alkyl ether bands at approximately 1288 and 1070 cm^{-1} , respectively, are also presented.

Infrared spectroscopy would be the most appropriate technique for gaining an insight into the interactions at a molecular level, through the detection of changes in bands that may be related to the complexation process of drugs and β -cyclodextrins. Nevertheless, in most cases, the host/guest ratio is too high and, consequently, the characteristic IR bands of the cyclodextrin do not undergo much change, due to their interaction with the guest, since only a small fraction of them are disrupted. In addition, some of the bands of guest molecule, which might be affected by the interaction with the host at the molecular level,

are masked by the high relative absorbance of the β -cyclodextrin bands (García-Zubiri *et al.*, 2003).

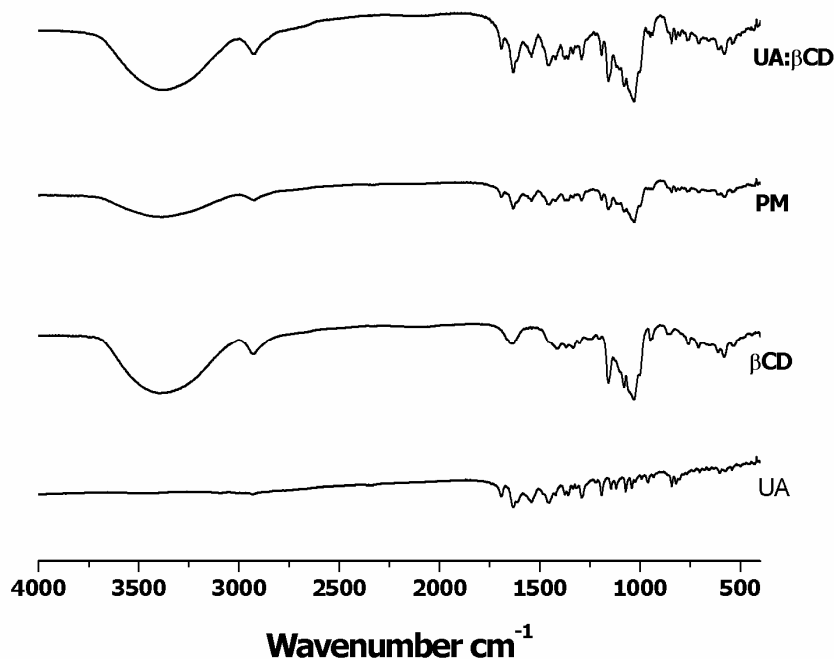


Figure 3. IR Spectra of usnic acid (UA), β -cyclodextrin (β CD), physical mixture (PM) and inclusion complex (UA: β CD). Curves were fitted using Origin 6.0 software.

In order to further substantiate complex formations between usnic acid and β -cyclodextrin, the effect of the presence of β -cyclodextrin on the proton NMR spectra of phenyl protons of usnic acid was investigated. Table 1 and 2 report the ^1H NMR signals of usnic acid and of β -cyclodextrin inclusion complexes as well as the variation in chemical shifts ($\Delta\delta$). The signals in the spectra of usnic acid and β -cyclodextrin were in agreement with data reported in the literature (Rashid *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1998). A significant upfield shift for the resonance of the H-4 proton of usnic acid ($\Delta\delta=0.177$ ppm) was observed for the UA- β CD complex (Table 1). Changes in the signals of the H-4

proton located outside the cavity of β -cyclodextrin ($\Delta\delta=0.127$ ppm) and the H-5 proton located inside the cavity of β -cyclodextrin ($\Delta\delta=0.115$ ppm) were observed (Table 2). Additionally a downfield shift in OH (6) ($\Delta\delta= -0.113$ ppm) was detected. From these findings it is therefore difficult to conclude that usnic acid complexation occurs only within the β -cyclodextrin cavity. Generally, very low shifts in signals of β CD protons are recordable for inclusion complexes, which means that the possibility of formation of an external associative complex between the drug and β CD (Manolikar & Sawant, 2003; Schneider et al., 1998).

Table 1. Proton NMR signals of usnic acid and β -CD complex (shifts observed in signals of usnic acid).

UA protons	δ_{UA}	$\delta_{UA:\beta CD}$	$\Delta\delta$ (ppm)
2 - OCCH ₃ (16)	2.506	2.511	0.005
3 - OH	--	--	--
4 - H	6.258	6.435	0.177
6 - OCCH ₃ (14)	2.616	2.669	0.053
7 - OH	13.406	13.362	- 0.044
8 - CH ₃ (15)	2.046	2.002	- 0.044
9 - OH	11.396	11.359	-0.037
9b - CH ₃	1.728	1.730	0.002

Table 2. Proton NMR signals of usnic acid and β -CD complexes (shifts observed in signals of β -ciclodextrin).

β CD	$\delta_{\beta\text{CD}}$	$\delta_{\text{UA}:\beta\text{CD}}$	$\Delta\delta$ (ppm)
protons			
H1	4.82	4.833	0.013
H2	3.31	3.341	0.031
H3	3.61	3.566	-0.044
H4	3.28	3.407	0.127
H5	3.55	3.435	0.115
H6	3.66	3.637	0.023
OH (2)	5.71	5.699	- 0.011
OH (3)	5.66	--	--
OH (6)	4.57	4.457	- 0.113

3.2.2. X-ray pattern diffraction analysis

The X-ray diffraction pattern analysis provided further evidence for the formation of supramolecular species between usnic acid and β -cyclodextrin (Fig. 4). XRD patterns of usnic acid and β -cyclodextrin exhibited sharp peaks characteristic of crystalline compounds, and the physical mixture showed peaks characteristic of usnic acid and β -cyclodextrin. On the other hand, the X-ray diffraction spectrum of the inclusion complex differed considerably from that of the drug or the cyclodextrin alone. This difference represents a loss of crystallinity with the formation of a less organized system, indicating that an interaction between usnic acid and β -cyclodextrin occurred.

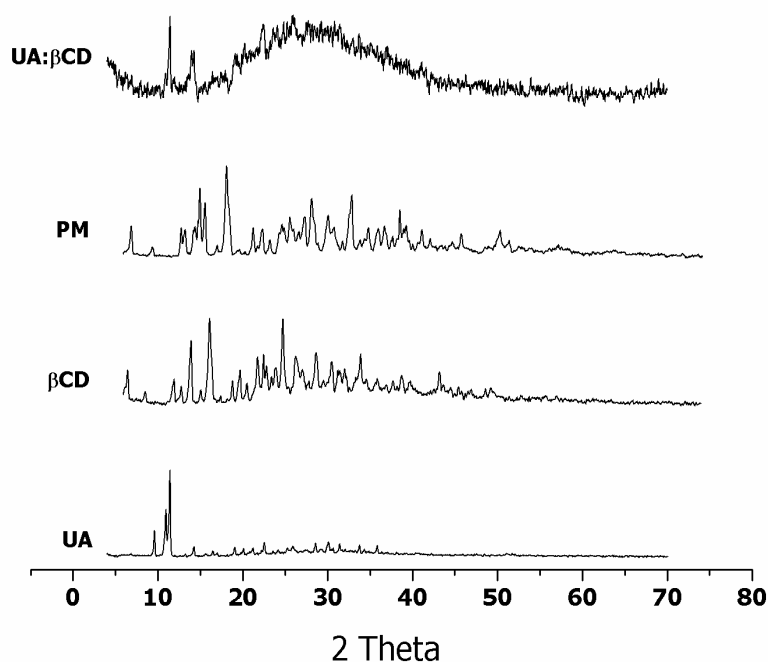


Figure 4. X-ray powder diffraction patterns of usnic acid (UA), β -cyclodextrin (β CD), physical mixture (PM) and inclusion complex (UA: β CD).

3.2.3. Differential scanning calorimetry

The DSC curves for usnic acid, β -cyclodextrin and inclusion complexes are plotted in Fig. 5. The usnic acid curve shows an endothermic peak at 200°C, corresponding to the fusion peak of usnic acid, and an exothermic peak at 275°C. These results are in accordance with the literature where usnic acid has a fusion peak of around 204°C and another around 273°C, corresponding to its degradation (Ingólfssdóttir, 2002).

The cyclodextrin exhibited a characteristic broad peak associated with water loss at around 60°C (Kamphorst et al., 2004), followed by a degradation peak at 325°C. As regards the analysis of the UA: β CD complex the peaks of usnic acid and the peak of β -cyclodextrin at 325°C almost disappeared from the thermogram, clearly indicating an

interaction between both usnic acid and β -cyclodextrin molecules. On the contrary, the disappearance of those peaks has not been observed in the physical mixture.

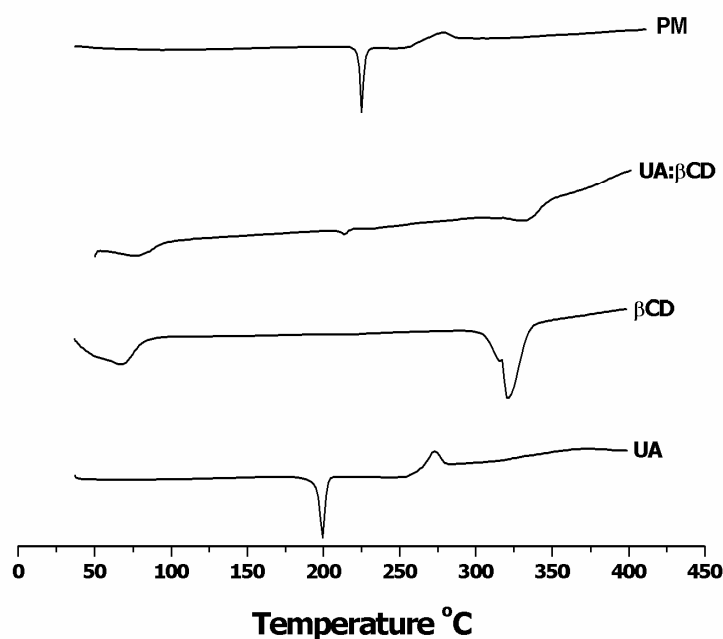


Figure 5. DSC thermograms of usnic acid (UA), β -cyclodextrin (β CD), physical mixture (PM) and inclusion complex (UA: β CD).

3.3. Antimicrobial activity of UA: β CD inclusion complexes

The inhibitory zone diameters for the binary complex and free usnic acid (75 μ g/mL) were, respectively, 11 ± 1.0 and 11.33 ± 0.5 for *S. mutans*; 13.33 ± 1.1 and 12.66 ± 2.3 for *E. faecalis* and 11.33 ± 0.5 and 12.33 ± 2.5 for *A. actinomycetemcomitans*. These results showed that no significant differences in antimicrobial activity between free usnic acid and UA: β CD were observed, indicating that usnic acid activity was preserved after inclusion complex formation. The inclusion process therefore does not interfere with the antimicrobial activity of the drug.

3.3 Characterization and stability of UA: β CD-loaded liposomes

Small unilamellar vesicles (SUV) with positively charged surface were prepared with 4.2 μmol lipids/mL of phosphate buffer encapsulating the equivalent of 1.2 mg/mL of usnic acid from inclusion complexes. A 1:12 drug/lipid molar ratio was thus achieved. After formulation, the macroscopic appearance of the liposomal suspension was observed. It exhibited a milky appearance with a typical bluish reflect (characteristic of small unilamellar vesicles). The liposomal formulations preserved their stability after accelerated stability testing with no significant changes to their initial characteristics after being submitted to centrifugation. However, after mechanical stress a redispersible creaming was observed after 48 hours. The formulation remained stable after 27 freeze-thaw cycles and for approximately four months in suspension form stored at 4°C. The pH of formulations after manufacturing was 7.4 and two months later it pH progressively decreased to 6.4, probably because of phospholipid degradation. To overcome this problem, the formulations were lyophilized after fabrication. The content of usnic acid (3.49 UA μmol) corresponding to 1.2 mg/ml of liposomal suspension and encapsulation efficiency after liposomes preparation were $100 \pm 6 \%$ and $99.5 \pm 0.2 \%$, respectively, showing that not only usnic acid stability was maintained during the manufacturing process but also the high efficiency of the encapsulation process. After five months the lyophilized liposomal formulations were hydrated and the content of usnic acid was determined, which remained at around 100 %.

3.4. Kinetic release of UA from UA: β CD-loaded

Meanwhile, the potential use of inclusion complexes encapsulated into liposomes is quest of an improvement in the pharmacokinetics and therapeutic efficacy of drugs has been reported in the literature (McCormack & Gregoriadis, 1998). Fig. 6 shows the in vitro

kinetic profile of usnic acid released from three different formulations: inclusion complex (UA: β CD), usnic acid-loaded liposomes (Lipo-UA) and UA: β CD complex-incorporated into liposomes (Lipo-UA: β CD). UA: β CD released practically 40 % of usnic acid at 2 hours, corresponding to the initial burst release, followed by a linear release with 80 % at 10 h, achieving 100% in 30 h. The release of usnic acid from UA: β CD-loaded liposomes was slightly slower than that from usnic acid-loaded liposomes. These results are in agreement with a previous study (Hagiwara et al., 2006), in which it was demonstrated that the drug inclusion complex incorporated into liposomes presented a slower release in comparison with drug-loaded liposomes. The authors claimed that this behavior was due to the complexation of drug with cyclodextrin in liposomes and/or the stabilization of the liposomal membrane by cyclodextrin.

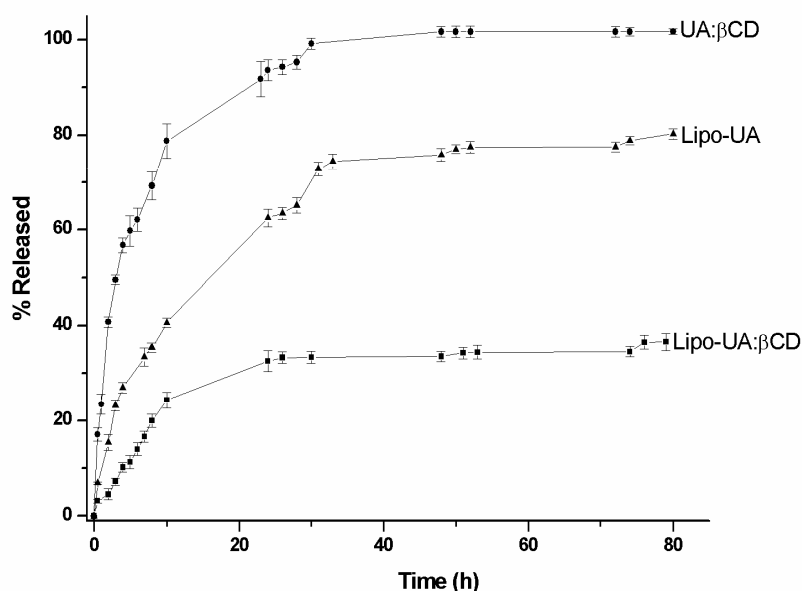


Figure 6. *In vitro* release profiles of usnic acid from complex-loaded liposomes (UA: β CD-Lipo), usnic acid-loaded liposomes (UA-Lipo) and inclusion complex (UA: β CD).

4. Conclusions

Interactions between usnic acid and cyclodextrin were detected by spectroscopic analyses indicating the formation of an inclusion complex with both molecules. A change of usnic acid from its crystalline to amorphous form was observed on X-ray analysis, confirming the formation of the drug inclusion complex. The complexation of usnic acid with cyclodextrin increased its solubility in water and did not affect its antimicrobial activity. Liposomes encapsulating the equivalent of 1.2 mg/mL of usnic acid inclusion complex were obtained and this formulation maintained its stability for four months in a suspension form. This novel formulation released usnic acid slower than that of usnic acid-loaded liposomes. The encapsulation of usnic acid inclusion complex with β -cyclodextrin into liposomes could be an alternative strategy of overcoming usnic acid's low solubility and toxicity and may even improve its antimicrobial activity.

The complexation of usnic acid with β -cyclodextrin offers a way to improve its solubility and bioavailability. The incorporation of usnic acid inclusion complex in the aqueous cavity of liposomes encourage us to undergo further studies in the design of stealth and targeted nanocarrier systems intended for the treatment of tuberculosis.

5. Acknowledgments

Lira, M.C.B. is grateful for an MSc scholarship from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Pernambuco State Foundation for the Advancement of Science (FACEPE). This research was supported in part by the Brazilian Network Research on Nanobiotechnology-Nanobiotec CNPq/MCT and CAPES-COFECUB Program (Grant # 735/2006).

6. References

- Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S. 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. Int. J. Pharm. 278, 435-445.
- Boudad, H., Legrand, P., Lebas, G., Cheron M., Duchêne D., Ponchel G. 2001. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. Int. J. Pharm. 218, 113-124.
- Cochietto, M.S.N., Nimis, P.L., Sava, G. 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften 89, 137-146.
- Connors, K.A. 1997. The stability of cyclodextrin complexes in solution. Chem. Rev. 97, 1325-1357.
- Del Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. Proc. Biochem. 39, 1033-1046.
- Edwards, H.G.M., Newton, E.M., Wynn-Williams, D.D. 2003. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. J. Mol. Struc. 651-653, 27-37.
- García-Zubiri, I.X., González-Gaitano, G., Sánchez, M., Isasi, J.R. 2003. FITIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin. Vibrat. Spectrosc. 33, 205-213.
- Hagiwara, Y., Arima, H., Hirayama, F., Uekama, K. 2006. Prolonged retention of doxorubicin in tumor cells by encapsulation of γ -cyclodextrin complex in pegylated liposomes. J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem. 56, 65-68.

- Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N. 2004. Usnic acid-induced necrosis of culture mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 67, 439-451.
- Higuchi, T., & Connors, K.A. 1965. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117-212.
- Ingólfssdóttir, K. 2002. Molecules of interest: usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729-736.
- Ingólfssdóttir, K., Chung, G.A.C., Skúlason, V.G., Gissurarson, S.R., Vilhelmsdóttir, M. 1998. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 141-144.
- Kamphorst, A.O., Mendes de Sá, I., Faria, A.M.C., Sinisterra, R.D. (2004). Association complex between ovoalbumin and cyclodextrins have no effect on the immunological properties of ovoalbumin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 199-205.
- Kristmundsdóttir, T., Aradóttir, H.A., Ingólfssdóttir, K., Ögmundsdóttir, H.M. 2002. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1447-1452.
- Kristmundsdóttir, T., Jónsdóttir, E., Ögmundsdóttir, H.M., Ingólfssdóttir, K. 2005. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 539-543.
- Maestrelli, F., González-Rodríguez, M. L., Rabasco, A. M., Mura, P. 2005. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 298, 55-67.
- Maestrelli, F., González-Rodríguez, M. L., Rabasco, A. M., Mura, P. 2006. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal delivery. *Int. J. Pharm.* 312, 53-60.

- Manolikar, M.K. & Sawant, M.R. 2003. Study of solubility of isoproturon by its complexation with β -cyclodextrin. *Chemosphere*, 51, 811-816.
- Marcano, V., Rodriguez-Alcocer, V., Méndez, A.M. 1999. Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis* Nylander (lichenized ascomycetes) from the Venezuelan Andes. *J. Ethnopharmacol.* 66, 343–346.
- McCormack, B. & Gregoriadis, G. 1998. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. *Int. J. Pharm.* 162, 59-69.
- Mura, P.; Faucci, M.T.; Manderioli, A.; Bramanti, G. 1999. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of binary systems of econazole with cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 193, 85-95.
- Nasongkla, N., Wiedmann, A.F., Bruening, A., Beman, M., Ray, D., Bornmann, W.G., Boothman, D.A., Gao, J. 2003. Enhancement of stability and bioavailability of β -lapachone usnic cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.* 20, 1626-1633.
- Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., Delattre, L. 2006. Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. *Int. J. Pharm.* 312, 75-82.
- Rashid, M.A., Majid, M.A., Quader, M.A. 1999. Phytochemical communication complete NMR assignments of (+) - usnic acid. *Fitoterapia*, 70, 113-115.
- Ribeiro-Costa, R.M., Alves, A.J., Santos, N.P., Nascimento, S.C., Gonçalves, E.C., 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 microencapsul.* 21, 371-384.
- Salem I.I., Düzgünes, N. 2003. Efficacies of cyclodextrin-complexed and liposome-encapsulated clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infection in human macrophages, *Int. J. Pharm.* 250, 403-414.

- Santos, N.P.S., Nascimento, S.C., Wanderley, M.S.O., Pontes-Filho, N.T., Silva, J.F., Castro, C.M.M.B., Pereira, E.C., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S. 2006. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 154-160.
- Schneider, H.J.; Hacket, F.; Rüdiger, V. 1998. NMR Studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem. Rev.* 98, 1755-1785.
- Siqueira-Moura, M.P., Lira, M.C.B., Santos-Magalhães, N.S. 2007. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Braz. J. Pharm. Sci.* *in press*.
- Teixeira, L.R., Sinisterra, R.D., Vieira, R.P., Doretto, M.C., Beraldo, H. 2003. Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into β -cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation. *J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem.* 47, 77-82.
- Vartia, K.O. 1973. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjan, V., Hale, M.E. (Eds.). *The Lichens*. Academic Press, New York, pp.547-561.

5 – CONCLUSÕES

- ✓ Foram obtidos complexos de inclusão ácido úsnico:β-ciclodextrina pelo método de *freeze-drying*;
- ✓ A molécula do ácido úsnico foi caracterizada por técnicas espectroscópicas e os resultados estão de acordo com a literatura;
- ✓ A formação dos complexos foi sugerida fortemente pelos testes físico-químicos nos quais foram observadas variações nos espectros (raios X, análise térmica, infravermelho, ressonância magnética) quando comparados aos espectros do ácido úsnico e da β-ciclodextrina sozinhos;
- ✓ Os complexos ácido úsnico:β-ciclodextrina apresentaram curva de solubilidade tipo A_L e com constante de estabilidade de $K_{1:1} 745,32M^{-1}$, mostrando que houve uma relação linear entre as concentrações do ácido úsnico e da ciclodextrina;
- ✓ O teste de dissolução mostrou um aumento aproximado de 100% na solubilidade do ácido úsnico na forma complexada; a obtenção do aumento da solubilidade pode ser uma alternativa para a utilização do ácido;
- ✓ A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que a complexação não promoveu alterações na sua atividade biológica em cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14 508) e *Actinobacillus actinomycetecomitans* (Y4-FDC);
- ✓ Lipossomas de 42 μmol/10 μl (fosfolipídio/tampão) contendo o equivalente a 1,2 mg/ml de ácido úsnico no complexo de inclusão foram obtidos com sucesso, sendo estáveis aos testes de estabilidade acelerado e estáveis na forma de suspensão por aproximadamente 4 meses; a estabilidade foi aumentada na forma liofilizada;

- ✓ O doseamento e a taxa de encapsulação do ácido úsnico foram de $100,85 \pm 5,97\%$ e $99,5\%$ respectivamente; após ressuspensão do líófilo a taxa de encapsulação permaneceu constante;
- ✓ A liberação do ácido úsnico nos complexos com β -ciclodextrina (AU: β CD) encapsulados em lipossomas foi mais lenta quando comparada à liberação do ácido úsnico encapsulado nos lipossomas;
- ✓ A encapsulação de complexos de inclusão entre o ácido úsnico e a β -ciclodextrina em lipossomas pode ser uma alternativa para superar tanto a baixa solubilidade em água do ácido como sua hepatotoxicidade.

6 – PERSPECTIVAS

A complexação do ácido úsnico em ciclodextrinas constitui uma possibilidade tecnológica útil para aumentar a solubilidade do ácido; após obtenção dos complexos e a encapsulação em lipossomas, novas perspectivas surgem no intuito de utilizar este sistema, acrescido de moléculas sinalizadoras (sítio-específicas) e furtivas, no tratamento de doenças como a tuberculose.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T.M.; HANSEN, C.B.; LOPES DE MENEZES, D.E. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 267-284, 1995.

BANERJEE, R. Liposomes: applications in medicine. **Journal of Biomaterials Applications**. v.16, p.3-21, 2001.

BARBATO, F.; CAPPELLO, B.; ROTONDA, M.I.; MIRO, A.; QUAGLIA, F. Diclofenac/ β -Cyclodextrin Binary Systems: A Study in Solution and in the Solid State. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic**. v. 46, p. 179-185, 2003.

BILENSOY, E.; ROUF, M.A.; VURAL, I.; ŞEN, M.; A. HINCAL, A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal clotrimazole: β -cyclodextrin complex. **AAPS PharmSciTech.**, v.7, p. E1 – E7, 2006.

BOUDAD, H.; LEGRAND, P.; LEBAS, G.; CHERON, M.; DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 218, p. 113-124, 2001.

CALABRÒ, M.L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R.; COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C.; GAMBEERINI, G. Effects of α and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 365-377, 2004.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISUELO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferations of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, v. 84, p. 329-334, 2002.

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCO NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 667-672, 1997.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, **AAPS PharmSciTech.**, v. 2, p. E329- E357, 2005.

COCHIETTO, M.S.N.; NIMIS, P.L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137-146, 2002.

CONNORS, K.A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. **Chemical Review**, v. 97, p. 1325-1357, 1997.

CUCOLO, G.R.; ALVES-PRADO, H.F.; SILVA, E.G.R. Otimização da Produção de CGTase de *Bacillus* sp Subgrupo alcalophilus E16 em Polvilho Doce em Fermentação Submersa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p. 201-208, 2006.

DAVIS, M.E. & BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews | Drug Discovery**, v. 3, p. 1023-1035, 2004.

DE CARVALHO, E.A.B.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v. 36, p. 155-161, 2005.

DEOL, P. & KHULLER, G.K. Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1334, p. 161-172, 1997.

DEVARAKONDA, B.; HILL, A.R.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M.; VILLIERS, M.M. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, p. 193-209, 2005.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEW, D.; PONCHEL, G. Cyclodextrins and carrier systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, p. 263-268, 1999.

EDWARDS, H.G.M.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, D.D. Molecular structural studies of lichen substances II: antranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, p. 27-37, 2003.

FATOUROS, D.G.; HATZIDIMITRIOU, K.; ANTIMISIARIS, S.G. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 287-296, 2002.

FATTAL, E.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Méthodes de préparation des liposomes. **Les Liposomes Aspect Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques**, 1.ed. Paris: INSERM, 1993, p. 43-62.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.H.; ARIAS, A.R.; ORTIZ, S.T.; INCHAUSTIA, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M.H. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 116C, n. 1, p. 51-54, 1997.

GHIONE, M.; PARRELLO, D.; GRASSO, L. Usnic acid revisited, its activity oral flora. **Chemioterapia**, v. 7, p. 302-305, 1998.

GOULD, S. & SCOTT, R.C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1451-1459, 2005.

HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of culture mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 439-451, 2004.

HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HIGUCHI, T. & CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, cap. 4, p. 117-212, 1965.

HIRAYAMA, F. & UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 125-141, 1999.

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A. Química dos Líquens. **Divulgação – Química Nova**, v. 21(6), p. 110-125, 1998.

INDEX MERCK. Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals, New Jersey: Merck 12 ed., p. 1557 (9806), 1995.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of Interest Usnic Acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729-736, 2002.

KRISHNA, D.R.; VENKATARAMANA, D. Pharmacokinetics of d(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 20, n. 6, p. 909-911, 1992.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; ARADÓTTIR, H. A.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1447-1452, 2002.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; JÓNSDÓTTIR, E.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H.M.; INGÓLFSDÓTTIR, K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 24, p. 539-543, 2005.

KOBETIC, R.; JURŠIĆ, B.S.; BONNETTE, S.; TSAI, J.S.C.; SALVATORE, S.J. Study of the lorazepam: cyclodextrin inclusion complexes using electrospray ionization mass spectrometry. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 6077-6082, 2001.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. *In vitro* activity of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+) -usnic acid, and (-) - usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2541-2543, 1995.

MANOLIKAR, M.K. & SAWANT, M.R. Study of solubility of isoproterenol by its complexation with β -cyclodextrin. **Chemosphere**, v. 51, p. 811-816, 2003.

MARTIN DEL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033–1046, 2004.

McCORMACK, B. & GREGORIADIS, G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, p. 59-69, 1998.

MURA, P.; FAUCCI, M.T.; MANDERIOLI, A.; BRAMANTI, G. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of binary systems of econazole with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 85-95, 1999.

MURA, P.; FUCCI, M.T.; PARRINI, P.L.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 117-128, 1999.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A.F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BORNAMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A.; JINMING, G. Enhancement of Solubility and Bioavailability of β -Lapachone Using Cyclodextrin Inclusion Complex. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 10, p. 1626-1633, 2003.

NEFF, G. W.; REDDY, K. R.; DURAZO, F. A.; MEYER, D.; MARRERO, R.; KAPLOWITZ, N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid. **Letters to the Editor / Journal of Hepatology**, v. 41, p. 1061–1067, 2004.

PERRY, N.B.; BENN, M.H.; BRENNAN, N.J.; BURGESS, E.J.; ELLIS, S.; GALLOWAY, D.J.; LORIMER, S.D.; TANGNEY, R.S. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. **Lichenologist**, v. 31, p. 627-637, 1999.

PIEL, G.; PIETTE, M.; BARILLARO, V.; CASTAGNE, D.; EVRARD, B.; DELATTRE, L. Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 75–82, 2006.

RASHID, M.A.; MAJID, M.A.; QUADER M.A. Phytochemical Communication Complete NMR assignments of (+) - usnic acid. **Fitoterapia**, v. 70, p.113-115, 1999.

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.

ROLIM-SANTOS, H.M.L.; QUEIROZ, F.B.; SOUTO-MAIOR, R.M.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes. **Drug Development Research**, v. 67, p. 430-437, 2006.

SALEM, I.I.; DÜZGÜNES, N. Efficacies of cyclodextrin-complexed and liposome-encapsulated clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infection in human macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 403-414, 2003.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Unsic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science Technology**, v. 15, n. 5, p. 355-361, 2005.

SCHNEIDER, H.-J.; HACKET, F.; RÜDIGER, V. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1755-1785, 1998.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341-359, 2002.

SIGURDSSON, H.H.; STEFÁNSSON, E.; GUDMUNDSDÓTTIR, E.; EYSTEINSSON, T.; THORSTEINSDÓTTIR, M.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin formulation of dorzolamide and its distribution in the eye after topical administration. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 255-262, 2005.

STORM, G. & CROMMELIN, D.J.A. Liposomes: quo vadis?. **PSTT**, v. 1, n. 1, p.19-31, 1998.

SUIHKO, E.; KORHONEN, O.; JÄRVINEN, T.; KETOLAINEN, J.; JARHO, P.; LAINE, E.; PARONEN, E. Complexation with tolbutamide modifies the physicochemical and tableting properties of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p.137-145, 2001.

TEIXEIRA, L.R.; SINISTERRA, R.D.; VIEIRA, R.P.; DORETTO, M.C.; BERALDO, H. Inclusion of Benzaldehyde Semicarbazone into β -Cyclodextrin Produces a Very Effective Anticonvulsant Formulation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 47, p. 77-82, 2003.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews – Drug Discovery**, v. 4, p. 145-159, 2005.

VILLAVERDE, J.; MORILLO, E.; PEREZ-MARTINEZ, J.; GINÉS, J.M.; MAQUEDA, C. Preparation and characterization of inclusion complex of norflurazon and α -cyclodextrin to improve herbicide formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 864-869, 2004.

VOINEA, M. & SIMIONESCU, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 6, n. 4, p. 456-474, 2002.

ZINGONE, G. & RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, p. 3-10, 2005.

ARTIGOS

1 – Marigilson Pontes de Siqueira-Moura, Mariane Cajubá de Britto Lira, Nereide Stela Santos Magalhães. Validação de Método Analítico Espectrofotométrico UV para Determinação de Ácido Úsnico em Lipossomas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. (Artigo aceito em janeiro/2007).

2 – Mariane, C.B. Lira; Dáfila, G.V.C. da Silva; Maria, E. Cortes; Karina, I. Teixeira; Ruben D. Sinisterra; Nereide, S. Santos-Magalhães. Inclusion complex of usnic acid/ β -cyclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into liposomes (Artigo a ser submetido).

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

PALESTRAS MINISTRADAS

Trabalhos Resumidos em Congressos Internacionais, Nacionais e Regionais.

1 – Lira, M.C.B.; Cortes, M.E.; Teixeira, K.I.R.; Rubén D. Sinisterra; Santos-Magalhães, N.S. Inclusion complex between usnic acid and β -cyclodextrin: Characterization and antimicrobial activity. In: XXXV Annual Meeting Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006, Águas de Lindóia – SP p. 68

2 – Siqueira, M.P.; Lira, M.C.B.; Almeida, F.J.F.; Galetti, F.C.S.; Simioni, A.R.; Tedesco, A.C.; Silva, C.L. Santos-Magalhães, N.S. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of usnic acid-loaded liposomes. In: XXXV Annual Meeting Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006, Águas de Lindóia – SP p. 68.

3 – Lira, M.C.B.; Cortes, M.E.; Sinisterra, R.D.; Santos-Magalhães, N.S. Inclusion complex of usnic acid: β -cyclodextrin. Preparation, characterization and nanoencapsulation into liposomes. XXXVI Annual Meeting Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2007, Salvador-BA (a ser apresentado em maio).

4 – Lira, M.C.B.; da Silva, D.G.V.C.; Sinisterra, R.D.; Santos-Magalhães, N.S. Characterization of the Dibenzofuran Derivative Usnic Acid. XXXVI Annual Meeting Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2007, Salvador-BA (a ser apresentado em maio).

5 – Mariane Cajubá de Britto Lira, Ma. Esperanza Cortés Segura, Karina Imaculada Rosa Teixeira, Rubén Dario Sinisterra Millán, Nereide Stela Santos Magalhães. Caracterização e Atividade Antimicrobiana do Ácido Úsnico Complexado em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, I Workshop Sul-Americano de Ciências e Tecnologias Farmacêuticas, I Jornada Pré-Congresso Ensino Básico: Universidade para todos. Recife-PE, 2006 (meio digital).

6 – Marigilson Pontes de Siqueira Moura; Mariane Cajubá de Britto Lira, Marcela Silvestre Outtes Wanderley, Nereide Stela Santos Magalhães. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico Espectrofotométrico UV para Determinação de ácido úsnico em lipossomas. II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, I Workshop Sul-Americano de Ciências e Tecnologias Farmacêuticas, I Jornada Pré-Congresso Ensino Básico: Universidade para todos. Recife-PE, 2006 (meio digital).

7 – Marigilson Pontes de Siqueira Moura; Marcela Silvestre Outtes Wanderley; Mariane Cajubá Brito Lira; Noemia Pereira Santos; Fábio Cícero de Sá Galetti; Célio Lopes Silva; Andreza Simioni, Antônio Cláudio Tedesco, Nereide Stela Santos Magalhães. Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicobacteriana e Interação com Macrófagos J744 de Lipossomas e nanocápsulas contendo ácido úsnico II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, I Workshop Sul-Americano de Ciências e Tecnologias Farmacêuticas, I Jornada Pré-Congresso Ensino Básico: Universidade para todos. Recife-PE, 2006 (meio digital).

8 – Mariane Cajubá de Britto Lira, Dáfila Gabriela Varjão Correia da Silva, M^a Esperanza Cortés Segura, Rubén Dário Sinisterra Millán, Nereide Stela Santos Magalhães. Preparação, caracterização e atividade antimicrobiana de complexos de inclusão ácido úsnico:ciclodextrinas. XIV CONIC – UFPE, Recife – PE, 2006.

9 – Islene Araújo Barbosa, Marigilson Pontes de Siqueira Moura, Mariane Cajubá de Britto Lira, Nereide Stela Santos Magalhães. Validação de Método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico nanoencapsulado em lipossomas. XIV CONIC – UFPE, Recife – PE, 2006.

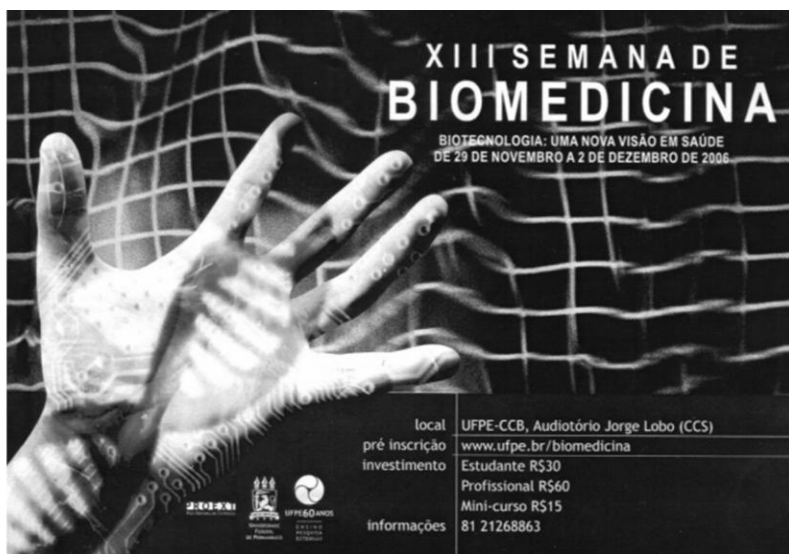
10 – Fábio José Fidelis Almeida, Mariane Cajubá de Britto Lira, Marigilson Pontes de Siqueira Moura, Marcela Outtes Wanderley, Nereide Stela Santos Magalhães. Estudo *in vitro* da interação com macrófagos J744 e da atividade antimicobacteriana de ácido úsnico nanoencapsulado em lipossomas. XIV CONIC – UFPE, Recife – PE, 2006.

11 – Lira, M.C.B; da Silva, D. G.V.C; Cortes, M.E.; Sinisterra R. D.; Teixeira, K.I.R.; Santos-Magalhães, N.S. Preparation, characterization and antimicrobial activity of usnic acid:cyclodextrin inclusion complexes. VIII Reunião Regional Nordeste da SBBq; 3rd International Symposium in Biochemistry and Biotechnology. Natal – RN, 2006.

Palestras Ministradas

Evento: XIII SEMANA DE BIOMEDICINA – Biotecnologia: uma nova visão em saúde
29 de novembro a 2 de dezembro de 2006-12-09
Centro de Ciências da Saúde – UFPE, Recife-PE

Palestra: Nanotecnologia Aplicada à Saúde – Mariane Cajubá de Britto Lira



XIII SEMANA DE BIOMEDICINA
BIOTECNOLOGIA: UMA NOVA VISÃO EM SAÚDE
DE 29 DE NOVEMBRO A 2 DE DEZEMBRO DE 2006

local UFPE-CCB, Auditório Jorge Lobo (CCS)
pré inscrição www.ufpe.br/biomedicina
investimento Estudante R\$30
Profissional R\$60
Mini-curso R\$15
informações 81 21268863

29.11 QUINTA-FEIRA

8:00 - 8:30	Solenidade de inauguração das obras do laboratório escola	
8:30 - 9:00	Abertura	
9:10 - 10:10	Conferência: Memória da Biomedicina no Norte e no Nordeste	Dr. Hilton Alves da Silva: UFPE
10:20 - 11:20	O uso da Acupuntura na saúde pública	Dr. Artlindo Cladimir de Souza Rossi: Hospital Geral do Exército -PE
11:30 - 12:30	Papel do biomédico na vigilância sanitária	Dr. Otaniel Freire Barros Neto: Vigilância Sanitária -Recife
14:00 - 15:00	Hemoderivados e sua auto-suficiência no Brasil	Dr. Aderson da Silva Araújo: HEMOPE
15:10 - 16:10	Visão da Biotecnologia no Brasil	Profa. Patricia Farias: UFPE
16:20 - 18:00	Mesa Redonda: Biotecnologia	Prof. Benício Ferreira da Silva Filho: CESMAC-AL Prof. Paulo Andrade: UFPE Prof. Jacinto da Costa Silva Neto: CESMAC-AL

01.12 SEXTA-FEIRA

8:00 - 9:00	Micoses Emergentes	Prof. Armando Marsden Lacerda Filho: UFPE
9:10 - 10:10	Marcadores tumorais no diagnóstico laboratorial	Dra. Janielle Kelly Guimarães Medeiros: UFPE
10:20 - 11:20	PET/CT: O estado da arte na Imagenologia	Dr. Ricardo Aguiar: UFPE
11:30 - 12:30	Risco químico em laboratórios de biotecnologia	Profa. Márcia Silva do Nascimento: UFPE
14:00 - 15:00	Genética Humana e aplicada	Prof. Antonio Carlos Freitas: UFPE
15:10 - 16:10	Física Médica em Biomedicina	Dr. Homero Cavalcante Melo: Real Hospital Português
16:20 - 17:20	Nanotecnologia aplicada à saúde	Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira: UFPE
17:30 - 18:30	A tomografia e o biomédico	Dra. Vânia Lyra Pimentel

02.12 SÁBADO

8:00 - 10:00	Mesa Redonda: Aids, do diagnóstico à vacina	Prof. Paulo Miranda: UFPE Dra. Valéria Ferreira: LACEN-PE
10:10 - 11:10	Papel do biomédico na perícia criminal	Prof. Lutz Arraes: UFPE / IMIP
11:20 - 12:20	Qualidade de Vida	Prof. Cláudio Galvão de Souza Júnior: UFRPE Profa. Lenie Campos Maia: UFPE

29.11 MINI-CURSOS

Prof. Armando Marsden Lacerda Filho	Micologia médica
Prof. Paulo Antonio Padovan	Preparações histológicas
Prof. João Inácio	Parasitologia clínica
Profa. Késia Xisto	Bactérias de maior ocorrência em urocultura

NORMAS DA REVISTA



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>INTERNATIONAL JOURNAL OF
PHARMACEUTICS**Guide for Authors****Scope of the journal**

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: In 2004, a new section was started on pharmaceutical nanotechnology. For more details, see Editorials in 279/1-2, 281/1, and 288/1.

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.

Submission of Manuscripts

Authors are strongly encouraged to submit their manuscript electronically by using the Elsevier submission site at <http://authors.elsevier.com/journal/ijpharm>

After registration, authors will be asked to upload their manuscript and associated artwork. Full instructions on how to use the online submission tool are available at the web address listed above.

If an author cannot submit their manuscript electronically, then for the initial submission of manuscripts for consideration, hardcopies are sufficient. The original plus two copies, complete with two sets of figures (including originals or duplicates of sufficient quality for clarity of reproduction) and tables, must be submitted in English. All data that would help referees to evaluate the paper should also be supplied. Manuscripts should be typewritten with double spacing and adequate margins on one side of the sheet only (not more than 26 lines per page). All pages should be numbered sequentially. Manuscripts should be sent to one of the following Editors-in-Chief according to the geographical origin of the author. Please include full contact information - corresponding author name, e-mail address, telephone and fax numbers, and full postal address.

After **final acceptance for publication**, your revised manuscript on disk together with two printed hard copies, should be submitted to the accepting editor. **It is important that the file on disk and the printout are identical.** Both will then be forwarded by the editor to Elsevier. In-depth guidelines for submitting artwork/illustrations can be found at: <http://authors.elsevier.com/artwork>

When the paper is to be published as a Rapid Communication, this should be clearly indicated to the Editor-in-Chief.

Europe, Africa, Near East

Prof A.T. Florence, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, U.K., Fax: +44 20 7837 5092; E-mail: ijp@pharmacy.ac.uk

The Americas, Australia and New Zealand

Prof J.H. Rytting, Pharmaceutical Chemistry Dept, University of Kansas, 2095 Constant Avenue, Lawrence, KS 66047, U.S.A., Fax: +1 785 864 5736; E-mail: ijp@ku.edu

Japan and Far East

Prof. T. Sonobe, Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka-shi 422-8526, Japan. Fax: +81-54-264-5614; E-mail: sonobe@gakushikai.jp

Manuscript Types

(1) Full Length Manuscripts

The arrangement of full length papers should accord with the following:

(a) Title

The full title should not exceed 85 characters including spaces between words.

(b) List of Authors

Initial(s) (one given name may be used) followed by the surname of author(s) together with their affiliations. When the work has been carried out at more than one address, the affiliation of each author should be clearly indicated using superscript, lower-case letters. The author to whom correspondence should be directed must be indicated with an asterisk.

(c) *Affiliation(s)* Name(s) and address(es) of the establishment(s) where the work was done, designated by superscript, lower-case letters where appropriate.

(d) *Abstract*

An Abstract not exceeding 200 words (a single paragraph) should be provided typed on a separate sheet.

(e) *Keywords*

A maximum of 6 keywords or short phrases suitable for indexing should be supplied. If possible keywords should be selected from Index Medicus or Excerpta Medica Index. Authors may also wish to refer to the Subject Index published in *International Journal of Pharmaceutics*, for example, Vol. 287/1-2, pp. 205-219.

(f) *Corresponding Author*

The author to whom correspondence should be directed should be designated with an asterisk (do not include the address unless different from that indicated by the author's affiliation). Telephone, fax and e-mail address of the corresponding author must be provided.

(g) *Text*

The text should be divided into main sections, such as the following: 1. Introduction. 2. Materials and methods. 3. Results. 4. Discussion. Acknowledgements. References, figure legends, tables and figures. These sections must be numbered consecutively as indicated. Subdivisions of a section should also be numbered within that section, for example, 2.1. Materials, 2.2. Relative humidity measurement, 2.3. Sample preparation, etc.

(h) *Nomenclature*

Standard nomenclature should be used throughout; unfamiliar or new terms and arbitrary abbreviations should be defined when first used. Unnecessary or ambiguous abbreviations and symbols are to be avoided. Data should be expressed in SI units.

(i) *Figure Legends, Table Legends, Footnotes*

Figure legends, tables and footnotes should be typed on separate sheets, lines double spaced. Footnotes, to be numbered consecutively in superscript throughout the text, should be used as little as possible.

(j) *References*

See below for full details.

(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.
- (d) No proofs will be sent to the author(s).

(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 Editors-in-Chief. "Mini-reviews" of a topic are especially welcome.

References

(a) Text citation

The Harvard system of citation must be used. References should be cited in the text within parentheses: where several citations are given within a single set of parentheses, they should be arranged in ascending order of year of publication; where more than one reference with the same year of publication is cited, they should be arranged in alphabetical order of the first authors' names. When referring to a work of more than two authors, the name of the first author should be given, followed by et al.

Examples of text citations:

(Gesztos et al., 1988; Chestnut et al., 1989; Legros et al., 1990; Mhando and Li Wan Po, 1990; Korsten et al., 1991; Langerman et al., 1991, 1992a,b; Masters et al., 1991; Bonhomme et al., 1992; Kolli et al., 1992).

(Shaw et al., 1978; Nakano and Arita 1990b; Nakano et al., 1990a,b; Bone et al., 1992)

(b) Reference list

All references cited in the text should be listed at the end of the paper (typed with double spacing) and assembled alphabetically. More than one paper 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.

References must consist of names and initials of all authors, year, title of paper, abbreviated title of periodical, and volume and first and last page numbers. 'Personal communication' and 'unpublished data' should be cited in the text only. Papers referred to as 'submitted for publication' must include the name of the journal to which submission has been made. Journal titles should be abbreviated according to the '*List of Serial Title Word Abbreviations*' (available from International Serials Data System, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904939-02-8).

Example of arrangement in the reference list:

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D., 1984a. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch Biochem. Biophys.*, 232, 400-407.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Hoekstra, F.A., 1989. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21, 77-92.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Aurell Wistrom, C., 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, 242, 1-10.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Rudolph, A.S., Wistrom, C.A., Spargo, B.J., Anchordoguy, T.J., 1988. Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 367-384.

Crowe, L.M., Crowe, J.H., Womersley, C., Reid, D., Appel, L., Rudolph, A., 1986. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 861, 131-140.

Crowe, L.M., Mouradian, R., Crowe, J.H., Jackson, S.A., Womersley, C., 1984b. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 769, 141-150.

Examples of presentation for various types of publication:

Langerman, L., Chaimsky, G., Golomb, E., Tverskoy, M., Kook, A.I., Benita, S., 1990. A rabbit model for evaluation of spinal anesthesia: chronic cannulation of the subarachnoid space. *Anesth. Analg.*, 71, 529-535.

Timsina, M.P., Martin, G.P., Marriott, C., Ganderton, D., Yianneskis, M., 1994. Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers. *Int. J. Pharm.*, 101, 1-13.

Gibaldi, M. and Perrier, D., 1982. *Pharmacokinetics*, 2nd Ed., Dekker, New York.

Deppeler, H.P., 1981. Hydrochlorothiazide. In: Florey, K. (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol. 10, Academic Press, New York, pp. 405-441.

US Pharmacopeia XXII, 1990. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 1434-1435.

Mueller, L.G., 1988. Novel anti-inflammatory esters, pharmaceutical compositions and methods for reducing inflammation. UK Patent GB 2 204 869 A, 23 Nov.

Du Plessis, J., 1992. Topical liposomal delivery of biologically active peptides. Ph.D Thesis, Potchefstroom University for CHE, South Africa.

(c) Use of Digital Object Identifier (DOI)

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document particularly "Articles in press" because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows:
doi:10.1016/j.ijpharm.2005.01.041

Figures and Tables

Figures

Line drawings (including graphs) should be drawn in black ink on white paper or on tracing paper with blue or faint grey rulings; graduation will not be reproduced. Lettering should be large enough to permit photographic reduction. If figures are not to be reduced, their format should not exceed 16 x 20 cm. Photographs (or half-tone illustrations) must be of good quality, submitted as black and white prints on glossy paper, and have as much contrast as possible. The magnification of micrographs should be indicated by a scale bar in the figure. Figures should be clearly marked on the reverse side with the number, orientation (top) and author's name; a soft pencil or a felt-tipped pen should be used for marking photographs. The illustrations should be numbered with Arabic numerals. The legends should be typed separately with double spacing.

Colour illustrations should be submitted as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are *not* suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, **at no additional charge**, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. The 2006 price for color figures is EUR 285 for the first page and EUR 191 for subsequent pages. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>

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

Tables

All tables must be numbered consecutively (with Arabic numerals) and be cited in the text. Titles should be short but descriptive. Tables should be compiled on separate sheets, together with a legend and/or footnotes identified by superscripts a.b.c, etc. Do not use vertical lines and keep horizontal rules to a minimum.

GenBank accession numbers

Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further

information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should reference this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined** text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Copyright guidelines for authors

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. The transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microform, or any other reproductions of similar nature and translations. and includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction of publication in machine-readable form and incorporation into retrieval systems. Transfer of copyright agreement forms will be sent to the corresponding author following acceptance of the manuscript.

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. Contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>)

Retained authors' rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Proofs, Offprints and Page Charges

Proofs

Elsevier will send PDF proofs to authors by e-mail for correction. If an author is unable to handle this process, regular print proofs will be sent. Elsevier will do everything possible to get the article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all corrections are sent back in ONE communication. Subsequent corrections will not be possible. Only typesetting errors may be corrected; *no changes in, or additions to, the accepted manuscript will be allowed*. Proofs should be returned to Elsevier within 48 hours.

Offprints

Upon acceptance, an offprint order form will be sent to the author(s) together with proofs. Offprints may be ordered by filling in and returning to the Publisher the order form sent to the authors with the proofs of their paper. Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at prices shown on the offprint order form that accompanies the copyright form. Offprints ordered after the journal has been printed will cost considerably more than those ordered immediately.

Page Charges

There are no page charges.

Language Polishing

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit  <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our [Terms & Conditions](#).

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see  <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Author enquiries

All questions arising after acceptance of the manuscript by the editors, especially those relating to proofs, publications and reprints should be directed to the Publisher: Elsevier Ireland Ltd. Brookvale Plaza East Park Shannon, Co. Clare Ireland Tel: +353 61 709600 Fax: + 353 61 709100 E-mail: authorsupport@elsevier.com

Please visit the Elsevier Author Gateway at <http://authors.elsevier.com> to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when the article status has changed. Information on artwork guidelines, copyright information, and frequently asked questions is also available.

No responsibility is assumed by the Publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of the rapid advances made in the medical sciences, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.