

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI (LIKA)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGCB)



**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV PARA
DETERMINAÇÃO DO DERIVADO ACRIDÍNICO LPSF/AC-04 EM
LIPOSSOMAS**

ALUNA: RAFAELA DE SIQUEIRA FERRAZ

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

RECIFE, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI (LIKA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGCB)



**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV PARA
DETERMINAÇÃO DO DERIVADO ACRIDÍNICO LPSF/AC-04 EM
LIPOSSOMAS**

ALUNA: RAFAELA DE SIQUEIRA FERRAZ
ORIENTADORA: PROFA. DRA. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

RECIFE

2011

RAFAELA DE SIQUEIRA FERRAZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Data de Aprovação: _____/_____/_____

Nota: _____

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV
PARA DETERMINAÇÃO DO DERIVADO ACRIDÍNICO
LPSF/AC-04 EM LIPOSSOMAS**

BANCA EXAMINADORA:

Nereide Stela Santos Magalhães

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora) – PRESIDENTA

Mariane Cajubá de B. Lira

Profa. Dra. – Mariane Cajubá de B. Lira - 1º EXAMINADOR

Noemia Pereira da Silva Santos

Profa. Dra. – Noemia Pereira da Silva Santos - 2º EXAMINADOR

Ferraz, Rafaela de Siqueira

Validação de método espectrofotométrico UV para determinação do derivado acridínico LPSF/AC-04 em lipossomas / Rafaela de Siqueira Ferraz. – Recife: O Autor, 2010.

70 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos

1. Farmacologia 2. Farmacocinética I. Título.

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-099

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente. Obrigada senhor!

Ao meu filho Bernardo, por me ensinar uma forma sublime de amar, por fazer do meu dia uma linda aventura e por ser o verdadeiro motivo da minha vida.

Aos meus queridos pais Antônio e Fátima Ferraz por todo amor, dedicação e amizade que recebi ao longo desses anos. Por todas as vezes que pude escutar de vocês que no final tudo dá certo. Amo muito vocês!

À minha orientadora Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, por toda amizade, confiança e orientação e pelos sábios conselhos que pude receber da senhora quando minha vida parecia tão perdida. Serei sempre muito grata!

A Profa. Dra. Suely Galdino por nos fornecer gentilmente a Acridina para estudos em nanotecnologia farmacêutica.

Ao meu marido Oscar Carvalho, por toda paciência e compreensão durante o mestrado. Obrigado por todos os incentivos e palavras de conforto que recebi quando tudo parecia está dando errado.

A minha irmã Mirella e ao meu cunhado Leonardo, por toda força e amizade. A minha prima Monique Siqueira pelas horas de conversas e dedicação.

A minha família, pelo apoio e compreensão durante toda a minha vida e em especial durante a minha graduação e mestrado. Amo muito todos vocês.

A todos que constituem o grupo SLC, pela excelente convivência, amizade e momentos de risos que passamos juntos. Pelo carinho e pela ajuda que recebi de vocês durante a gravidez.

Agradeço em especial a Isabella Macário, Jéssica Avelino, Milena Ferraz e Islene Barbosa por TODA a ajuda que recebi para finalizar esse trabalho. Vocês foram anjos colocados por Deus em minha vida. Obrigada por tudo e desculpem os transtornos.

A todas as minhas amigas, Nara Carolina, Paula Mafra, Natália Valença, Natália Araújo, Rebeka Maranhão, Sabine Geiseler, Roberta Salgado, Bruna Dias, Gabriela Oliveira, Juliana Lira, Paloma Calábria e Caroline Cocentino por toda dedicação e por todas as vezes que sempre estiveram dispostas a me ouvir. Obrigada por toda amizade e por todos os lindos momentos que vivemos juntas e que para mim serão eternos. Amigas para sempre!

Aos meus sogros João Carlos Carvalho e a Suze Franco Carvalho por todo carinho e amizade dedicado a mim e a minha família. A vovó Dulcinha e a Rogéria por todo por toda dedicação e amor que sempre demonstraram ao longo da minha vida. Sou imensamente grata a vocês!

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na realização dessa pesquisa.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Antônio e Fátima Ferraz, a minha irmã Mirella Ferraz, ao meu marido Oscar Carvalho e ao meu amado filho Bernardo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>viii</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>ix</i>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<i>x</i>
RESUMO.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xii</i>
1.0. INTRODUÇÃO.....	13
2.0. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Acridina.....	15
2.1.1. Considerações Gerais.....	15
2.1.2. Atividade Biológica.....	17
2.1.3. Atividade Antitumoral.....	17
2.1.4. LPSF/AC-04.....	19
2.1.4.1. Síntese química e propriedades Físico-Químicas do LPSF/AC-04.....	20
2.2. Nanotecnologia e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.....	21
2.2.1. Lipossomas	23
2.2.2. Classificação dos Lipossomas.....	25
2.2.2.1. Quanto ao número de lamelas e tamanho de vesículas.....	25
2.2.2.2. Quanto à composição química.....	26
2.2.3. Método de preparação dos Lipossomas.....	28
2.2.4. Aplicações dos sistemas lipossomais.....	30
2.3. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico por Espectrofotometria- UV.....	30
3.0. REFERÊNCIAS.....	32
4.0. OBJETIVOS.....	41
4.1. Geral.....	41
4.2. Específicos.....	41
5.0. ARTIGO: Validation of a UV spectrophotometric method for the determinatic of the LPSF/AC-04 acridine derivate encapsulated into liposomes.....	42
6.0. CONCLUSÕES.....	56
ANEXO.....	57

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Estrutura química da Acridina.....	15
Figura 2 – Representação de um modelo fármaco – DNA.....	16
Figura 3 – Estrutura química da Amsacrina ou mAMSA.....	17
Figura 4 – Estrutura química da 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)- tiazolidina-2,4-diona – LPSF/AC-04.....	20
Figura 5 – Estrutura dos isômeros Z e E da 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil benzil)- tiazolidina-2,4-diona.....	21
Figura 6 – Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos.....	23
Figura 7 – Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípídio, da bicamada lipídica e do lipossoma.....	24
Figura 8 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas.....	25
Figura 9 – Características estruturais de lipossomas: convencionais, furtivos ou Stealth [®] , sítio-específicos e catiônicos.....	28

ARTIGO

Figure 1. Chemical structure of (5-(acridine-9-yl-methylene)-(4-methyl-benzyl)- thiazolidine-2,4-dione) – LPSF/AC-04.	45
Figure 2. Scanning UV spectra of LPSF/AC-04 at concentrations of 0.3, 0.5, 1, 1.5 and 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol.....	49
Figure 3. Scanning UV spectra of: (a) LPSF/AC-04 (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (b) unloaded liposome (c) LPSF/AC-04-loaded liposomes (12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) diluted in methanol.	50

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1

Optical characteristics of LPSF/AC-04, statistical data of the regression equations and validation parameters	51
---	----

Table 2

Recovery studies to assess the accuracy of the proposed method.....	52
---	----

Table 3

Precision of the analytical proposed method	53
---	----

Table 4

The robustness of the UV proposed method	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CHCl ₃	Clorofórmio
CHOL	Colesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármaco
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
Mamsa	Amsacrina
MeOH	Metanol
MLV	Vesículas Multilamelares Grandes
PEG	Polietilenoglicol
R.S.D.	Desvio Padrão Residual
SA	Estearilamina
S.D.	Desvio Padrão
SLC	Sistema de Liberação Controlada de Fármaco
SPC	Fosfatidilcolina de Soja
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
Topo II	Topoisomerase II
UV	Ultravioleta

RESUMO

Os derivados acridínicos têm despertado a atenção de vários pesquisadores por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antimalárica, antitripanossômica, leishmanicida, antiviral e mais recentemente por sua atividade antitumoral. O LPSF/AC-04 é um derivado tiazacridínico e caracteriza-se por ser um pó amorfo, amarelo-esverdeado, de peso molecular 410 g/mol, com ponto de fusão igual a 199°C e uma baixa solubilidade em água, característica essa que dificulta sua utilização terapêutica. Sendo assim, a incorporação deste fármaco em sistemas de liberação controlada, tais como, os lipossomas, torna-se uma alternativa viável para sua utilização. O controle de qualidade de fármacos puros e em formas farmacêuticas é realizado por métodos oficiais ou validado. A espectrofotometria é uma técnica analítica bastante conveniente, muito utilizada em laboratórios de controle de qualidade, devido à sua simplicidade, baixo custo e larga disponibilidade. Assim, o presente estudo visou o desenvolvimento de um método analítico, para a quantificação do LPSF/AC-04 por espectrofotometria-UV, aplicado ao fármaco e dele nanoencapsulado em lipossomas. Inicialmente, um método espectrofotométrico UV para o doseamento do LPSF/AC-04 em lipossomas foi desenvolvido avaliando os seguintes parâmetros preconizados pelo ICH: linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação. O LPSF/AC-04 foi determinado em metanol a 250 nm, onde o coeficiente de absorvidade (ϵ) encontrado foi $7,60 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. O método espectrofotométrico para determinação do LPSF/AC-04 em lipossomas foi linear na faixa de concentração de 0,3 a 2 $\mu\text{g/mL}$. $\text{Absorbância} = 0,18068 \times [\text{LPSF/AC-04}] (\mu\text{g/mL}) + 0,00348$ e o coeficiente de regressão encontrado foi ($r^2 = 0,9995$). O método proposto foi sensível para os limites de detecção e quantificação foram de 0,047 e 0,143 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O método se mostrou preciso, já que todas as amostras analisadas apresentaram coeficiente de variação menor que 5 % e estatisticamente não houve diferença entre as concentrações teóricas e práticas. O método se apresentou robusto, sem diferenças estatisticamente significativas frente à variação do fabricante do solvente e da temperatura. Na exatidão foi possível observar a recuperação do fármaco que variou entre $99,4 \pm 0,67 \%$ a $100,5 \pm 1,91\%$ estando dentro dos limites recomendados. O teor e a eficiência de encapsulação do LPSF/AC-04 em lipossomas foi de $104,44 \pm 1,56\%$ e de $99,68 \pm 0,24\%$, respectivamente. O método analítico proposto mostrou-se, portanto, simples, rápido, exato, preciso e de baixo custo podendo ser utilizado para análises de rotina do LPSF/AC-04 matéria prima e em formulações farmacêuticas, como por exemplo, os lipossomas.

Palavras-chaves: Derivado acridínico LPSF/AC-04, Lipossomas, Espectrofotometria UV e Validação.

ABSTRACT

Acridine derivatives have attracted the attention of many researchers for presenting a broad spectrum of pharmacological activities as antibacterial, antimalarial, antitrypanosomal, leishmanicidal, antiviral and more recently for its antitumor activity. The LPSF/AC-04 is an acridine-thiazolidin derivative, which is characterized as an amorphous yellow-green, powder with 410 g/mol molecular weight, melting point exceeding 199 °C and a low water solubility making it difficult to use in therapy. Thus, the incorporation of this compound in drug delivery systems such as liposomes becomes a viable strategy to utilization. The quality control of drugs and pharmaceutical dosage forms is performed by official or validated methods. The spectrophotometry is a very convenient analytical technique used in laboratories for quality control, due to its simplicity, low cost and wide availability. Thus, this study aimed to develop a simple analytical method for the quantification of LPSF/AC-04 by UV spectrophotometry and applied to the drug and pharmaceutical dosage forms, such as liposomes. A UV-spectrophotometric method for the determination of LPSF/AC-04 in liposomes was developed by evaluating the following parameters: linearity, precision, accuracy, robustness and limits of detection and quantification. The LPSF/AC-04 was determined in methanol at 250 nm and the coefficient of absorptivity (ϵ) was found to be 7.60×10^4 L.mol⁻¹.cm⁻¹. The spectrophotometric method for determining the LPSF/AC-04 in liposomes was linear at concentrations from 0.3 to 2 µg.mL⁻¹ Absorbance = $0.18068 \times [\text{LPSF/AC-04}] (\mu\text{g.mL}^{-1}) + 0.00348$ and the regression coefficient was found ($r^2 = 0.9995$). The proposed method was sensitive, because the limits of detection and quantification were 0.047 and 0.143 g.mL⁻¹, respectively. The method was accurate, since all the samples showed a coefficient of variation less than 5% and there was no statistically significant difference between the theoretical and practical concentrations. The method was robust, with no statistically significant differences to the variation of the manufacturer of solvent and temperature. In accuracy was possible to observe the recovery of the drug ranging between $99.4 \pm 0.67\%$ and $100.5 \pm 1.91\%$. The content and encapsulation efficiency of liposome LPSF/AC-04 was $104.44 \pm 1.56\%$ to $99.68 \pm 0.24\%$, respectively. The good recovery of the formulation suggested a non-interference of excipients. Thus, the proposed analytical method proved simple, rapid, accurate, precise, inexpensive and can be used for routine analysis of the pure LPSF/AC-04 and in pharmaceutical formulations, such as liposomes.

Keywords: LPSF/AC-04 acridine derivate, liposomes, UV spectrophotometry and validation

1. Introdução

Dentre todas as patologias, o câncer é uma das mais devastadoras. Apesar do avanço da medicina e a cura para determinados tipos de câncer detectados precocemente, outros tipos ainda não apresentam terapia, ou as células tumorais se tornaram resistentes aos fármacos disponíveis na clínica. Portanto, o tratamento para o câncer continua um desafio para gestores de saúde pública, médicos e pesquisadores do mundo inteiro. Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam que ocorrerão 489.270 casos novos de câncer.

Na tentativa de desenvolver fármacos anticancerígenos mais potentes e com menos toxicidade, as acridinas têm despertado a atenção de vários pesquisadores pelas suas propriedades químicas e biológicas.

Os compostos acridínicos são agentes terapêuticos bem conhecidos cuja propriedade anticâncer deve-se à sua habilidade para interagir com os ácidos nucléicos, intercalando-se os entre pares de bases. Além disso, a atividade farmacológica dessas moléculas intercalantes é devido ao seu poder de inibir a síntese de ácidos nucléicos pelo bloqueio da ação das enzimas que metabolizam o DNA (SOURDON et al., 2001).

O planejamento racional de fármacos é um dos métodos mais vantajosos que vem sendo bastante empregado pelos químicos medicinais e pesquisadores de áreas afins. Neste sentido, o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sintetizou novos protótipos com potencial atividade antitumoral, em especial, derivados acridínicos. Entre eles, destacou-se a molécula LPSF-AC-04 que será o fármaco utilizado no presente estudo (PITTA et al., 2006).

O derivado de acridina LPSF/AC04 se caracteriza por ser um pó amorfo, amarelo-esverdeado, com baixa solubilidade em água dificultando seu uso. Portanto, com a finalidade de minimizar este problema, a incorporação deste fármaco em sistemas de liberação controlada se fez necessária. Os sistemas de liberação controlada de fármacos melhoram a eficácia e biodisponibilidade de certos fármacos, bem como a segurança em relação à diminuição dos seus possíveis efeitos tóxicos de fármacos, principalmente anticancerígenos (LEE; ROBINSON, 2004).

Os lipossomas, descobertos em 1963, consistem de esferas de tamanhos variados

(em escalas nanométricas e micrométricas) com uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimento aquoso (TORCHILIN, 2005). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana lipídica. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa e aplicações terapêuticas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Estes sistemas podem, assim, contribuir para a terapêutica do câncer, já que estes sistemas apresentam características favoráveis que podem suprir as limitações dos tratamentos convencionais como, por exemplo, efeitos colaterais e repetidas administrações que podem ser diminuídas.

Neste contexto, o presente trabalho vislumbra o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas eficazes com efeitos colaterais menores. Sendo assim, a encapsulação do derivado acridínico (LPSF/AC-04) em lipossomas, torna-se uma inovação terapêutica para o tratamento do câncer.

2.0. Revisão da Literatura

2.1. Acridina

2.1.1. Considerações Gerais

A acridina (Figura 1) é um composto heterocíclico nitrogenado (BROHOLM et al., 1999) derivado do antraceno, o qual pode ser extraído do alcatrão da hulha. É um composto intermediário conhecido e largamente utilizado na fabricação de tintas e produtos farmacêuticos (ERNER, 1962). Embora apresente uma origem natural, diversos compostos derivados da acridina são sintetizados para a obtenção de fármacos com amplo espectro de ação (AUPARAKKITANON et al., 2003; GOODELL et al., 2006, 2008; NESMÈRAK et al., 2002).

Os compostos acridínicos são agentes terapêuticos bem conhecidos cujas propriedades mutagênicas dependem de sua habilidade para interagir com os ácidos nucleicos. Um mecanismo desta interação é a intercalação entre a acridina e os pares de bases da hélice do DNA. Além disso, a atividade farmacológica desses fármacos intercalantes é devida ao seu poder de inibir a síntese de ácidos nucleicos através do bloqueio da ação de enzimas que metabolizam o DNA (SOURDON et al, 2001).

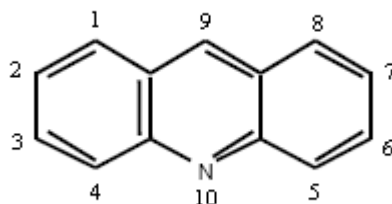


Figura 1 – Estrutura química da Acridina (adaptado de MOLONEY et al., 2001).

Em 1913, os compostos acridínicos foram primeiramente empregados na prática médica, quando Browning descobriu a ação bactericida dos derivados acridínicos, proflavina e acriflavina, embora o interesse medicinal nestes compostos date de 1888 (ALBERT, 1966).

Lerman, em 1961, foi um dos pesquisadores pioneiros a propor um modelo de intercalação fármaco - DNA, observando as interações entre derivados acridínicos e DNA. Observou ainda que acridinas ou compostos derivados intercalados ao DNA orientam-se de forma paralela aos pares de bases nucleotídicas e de forma perpendicular ao eixo da dupla hélice. No modelo, uma molécula aromática planar, possuindo 2 ou 3

anéis de 6 membros é inserida entre os pares de bases adjacentes na hélice do DNA. O complexo formado entre fármaco - DNA é estabilizado por forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A intercalação fármaco – DNA leva a alterações estruturais da dupla hélice do DNA, que consequentemente irá causar fortes perturbações no metabolismo celular (LERMAN, 1961, 1963). Na Figura 2, pode ser observado um modelo de um complexo fármaco – DNA obtido por um estudo preliminar de modelagem molecular (GOODELL et al., 2008).

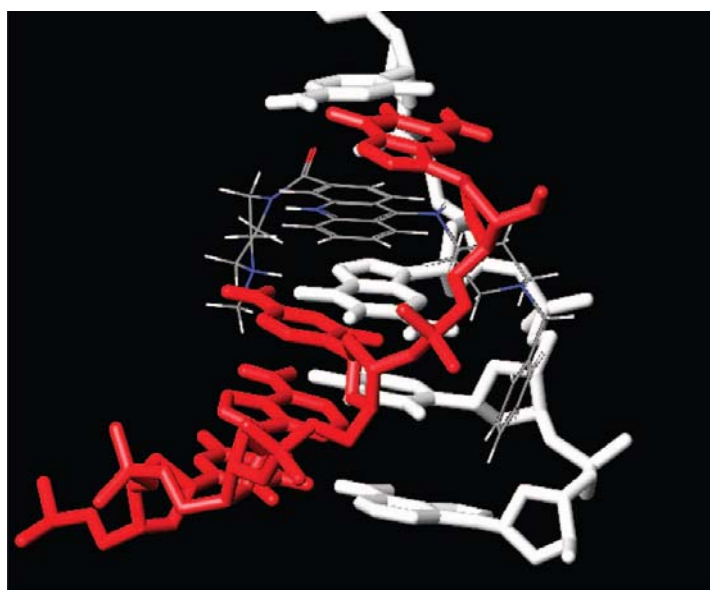


Figura 2 – Representação de um modelo fármaco – DNA, onde um derivado acridínico se intercala em um fragmento de DNA (GOODELL et al., 2008).

Alguns fármacos da classe das acridinas já se encontram em uso clínico, como é o caso da Amsacrina (Figura 3). A amsacrina ou (*N*-[4-(9-acridinilamino)-3-metoxifenil] metanosulfonamida; mAMSA) é uma anilinoacridina, que apresenta atividade anticancerígena devido a sua capacidade de interação com o DNA. Atua na intercalação e inibição da enzima topoisomerase II e é utilizada para o tratamento de leucemias agudas e linfomas (BLASIAK et al., 2003).

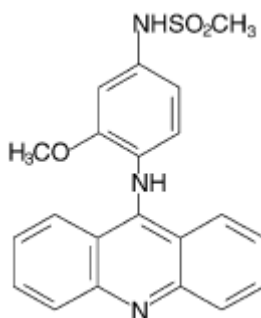


Figura 3 – Estrutura química da Amsacrina ou mAMSA (BLASIAK et al., 2003)

2.1.2. Atividades Biológicas

Os derivados acridínicos são conhecidos por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antimalárica, antitripanossômica (BONSE et al., 1999) leishmanicida (GIRAULT et al., 2000), antiviral (GOODELL et al., 2006) e mais recentemente por sua atividade antitumoral (GOODELL et al., 2008). Embora apresente um amplo espectro de ação farmacológica, sua atividade antineoplásica tem recebido maior ênfase especialmente contra células pancreáticas (GOODELL, 2008; OPPEGARD et al., 2009), pulmonares (YANG et al., 2006), prostáticas (INCLES et al., 2004), de cólon (WANG et al., 2007), de ovário (PLAXE et al., 2002), Sarcoma 180 (SILVA, 2003), leucemia mieloide aguda (KESSLER et al., 2008), linfomas (BLASIAK et al., 2003) e melanoma (GÁLVEZ-PERALTA, 2009).

2.1.3. Atividade antitumoral

Uma ampla classe de moléculas aromática policíclica planar tem a capacidade de intercalar com o DNA no espaço existente entre dois pares de bases adjacentes. A ação de intercalação induz mudanças estruturais locais no DNA, incluindo o desenrolamento da dupla hélice e o alongamento da fita de DNA. Estas modificações estruturais podem conduzir a uma retardação ou uma inibição da transcrição e replicação, além de causar mutagenicidade no DNA (FERGUSON et al., 2007).

Segundo Lê Pecq e colaboradores (1975) a acridina e seus derivados atuam como agentes intercalantes do DNA, o que explica a maioria dos efeitos biológicos dos derivados acridínicos. Vários compostos de importância clínica como os agentes antitumorais: Actinomicina D e a Daunomicina e as drogas usadas em doenças parasitárias como a Quinacrina e a Cloroquina agem como a acridina, intercalando com

o DNA. Esses fármacos exercem seus efeitos clínicos primários pela capacidade de interferir na função do DNA, seja bloqueando a transcrição do gene ou inibindo a replicação.

Derivados da acridina, representam uma classe conhecida de agentes anti-câncer que tem a capacidade de interferir na síntese do DNA inibindo tanto a topoisomerase I como a II (VISPÉ et al., 2007). Uma grande parte dos derivados acridínicos age através da inibição da enzima topoisomerase II. As topoisomerases são responsáveis pelo controle da topologia do DNA e por ter um papel crítico em seu metabolismo. A função essencial dessa enzima é especialmente durante a replicação do DNA e na segregação dos cromossomos. Diante disso, as topoisomerase representam um caminho para muitos fármacos anticancerígenos, incluindo, por exemplo, a amsacrina e a doxorrubicina (OPPEGARD et al., 2009; GOODELL et al., 2008).

Alguns derivados acridínicos, como o DACA e análogos, têm a capacidade de atuar inibindo tanto a enzima topoisomerase I quanto a enzima topoisomerase II, embora não se conheça o mecanismo de interação do fármaco com estas enzimas. Bridewell e colaboradores (2001) compararam os efeitos dos análogos do DACA em ensaios isolados com as enzimas topoisomerasas I e II, basendo-se no relaxamento do DNA mediado por cada uma das enzimas. Os pesquisadores sugeriram que os análogos do DACA atuam, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inibindo simultaneamente a topoisomerase II e a topoisomerase I. E esta combinação contribui para uma elevada atividade antitumoral dos análogos do DACA.

Oppegard e colaboradores (2009) avaliaram a atividade de derivados 9-aminoacridina tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra linhagens celulares humanas de câncer de pâncreas. Neste caso, os derivados 9-aminoacridina, que atuaram como inibidores catalíticos exibiram efeitos inibitórios na atividade da enzima topoisomerase II e induziram superdobramentos negativos na fita dupla do DNA que levaram à inibição da proliferação celular, comprovando, assim, a atividade antineoplásica de derivados 9-aminoacridina tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra as linhagens celulares utilizadas. Os derivados 9-aminoacridina utilizados apresentaram ainda maior eficiência antineoplásica contra as células pancreáticas quando comparados com a Amsacrina.

Outra forma de interação dos derivados acridínicos ocorre através da ligação destes fármacos com a enzima telomerase, através de uma série de interações, que

promovem à inibição da enzima (HEALD et al., 2002). A telomerase é uma enzima essencial na estabilidade dos telômeros, estruturas presentes na parte final dos cromossomos eucarióticos, que os protegem impedindo a perda de material genético. Esta proteção ocorre através da adição de sequências repetidas de pares de bases na porção final dos cromossomos (ZAKIAN et al., 1995; MORIN et al., 1989). Encurtamentos progressivos dos telômeros, após divisões celulares sucessivas, levam à senescência das células (HARLEY et al., 1990) e um escape neste processo promoveria a um maior encurtamento dos telômeros e causaria crise e morte celular (SHAY et al., 2004). Embora esteja presente de forma inativa em células normais, a enzima apresenta-se de forma ativa em grande parte das células humanas cancerígenas (GELLERT et al., 2005). Pesquisas descrevem que uma inibição da atividade da telomerase em células cancerígenas causa um encurtamento do telômero com consequente apoptose celular (HAHN et al., 1999; ZHANG et al., 1999).

Incles e colaboradores (2004) trataram células cancerígenas de próstata, DU145, com o derivado acridínico BRACO-19. O fármaco utilizado tem como função a inibição catalítica da telomerase humana em células humanas cancerígenas levando à senescência celular. O efeito citotóxico do BRACO-19 foi comprovado através da presença do marcador β -galactosidase associado à senescência em células DU145 tratadas. Após 7 dias de tratamento aproximadamente metade da população celular estavam mortas. As células tratadas apresentaram-se grandes, lisas e densas, morfologia típica da senescência. Os cromossomos das células tratadas apresentaram-se mais densos e condensados quando comparado às células controle, além de um maior número de fusões cromossomais, que levaram à morte das células.

2.1.4. LPSF/AC-04

O planejamento racional de fármacos é um dos métodos mais vantajosos que vem sendo bastante empregado pelos químicos medicinais e pesquisadores de áreas afins. Neste sentido, o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sintetizou novos protótipos com potencial atividade antitumoral, em especial, derivados acridínicos (PITTA et al., 2006). Entre eles, destaca-se a molécula LPSF-AC-04 (Figura 4) que será o fármaco utilizado no presente estudo.

2.1.4.1. Síntese química e Propriedades Físico-Químicas da LPSF/AC-4

O LPSF/AC-4 (Figura 4) ou 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona ($C_{25}H_{18}N_2O_2S$, peso molecular 410 g/mol) é um derivado acridino-tiazolidínico quimicamente sintetizado. A síntese dos derivados acridino-tiazolidínicos, desenvolvida por Silva (2003), iniciou-se com a obtenção da tiazolidina-2,4-diona, pela reação da tiouréia com ácido cloroacético; posteriormente, em uma segunda etapa reagiu com o cloreto de benzila substituído formando assim a 3-benzil-tiazolidina-2,4-diona substituída. Paralelamente, o composto éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila foi produzido após algumas etapas, que teve como ponto de partida uma reação da difenilamina com o ácido acético glacial. Por fim, a 3-benzil-tiazolidina-2,4-diona substituída sofreu uma reação de adição pelo éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila e observou-se a precipitação dos produtos finais, os quais foram filtrados e purificados após lavagens com água destilada. Estas reações formaram diversos derivados acridínico-tiazolidínicos, dentre eles o LPSF/AC-4, que foi obtida por meio da reação da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona com o 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila, em presença de piperidina e aquecimento da mistura, onde observou-se a precipitação da 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona.

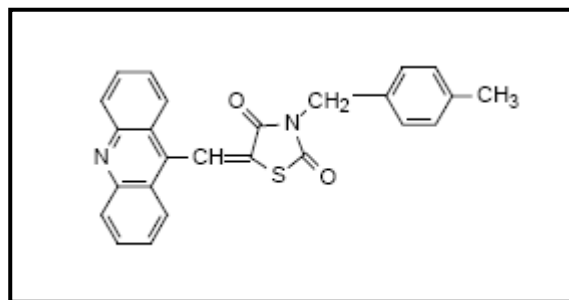


Figura 4 – Estrutura química da 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona – LPSF/AC-04 (SILVA, 2003).

O composto 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona pode apresentar, teoricamente, isomeria geométrica nas configurações Z e E (Figura 5). Quando o grupo acridina e enxofre estiverem do mesmo lado, tem-se a configuração Z e quando o grupo acridina e enxofre estiverem do lado oposto, tem-se a configuração E (SILVA, 2001). Além disso, foi possível observar a partir dos valores de calor de formação que o isômero Z ($\Delta H=66,83$ Kcal/mol e $PI=8,77$ EV) é termodinamicamente

mais estável que o E ($\Delta H=71,42$ Kcal/mol e $PI=8,67$ EV). Assim, como o potencial de ionização indicou que o isômero Z possui maior capacidade de doar seus elétrons, apresentando portando, maior estabilidade. (SILVA, 2003).

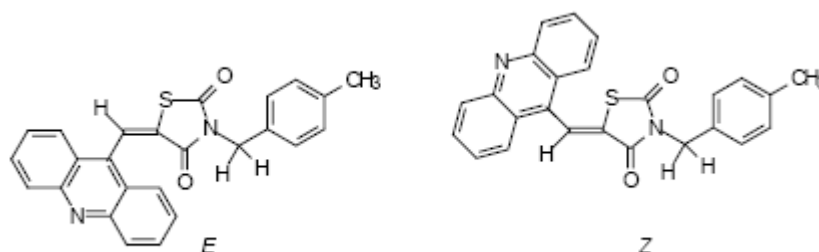


Figura 5 – Estrutura dos isômeros Z e E da 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil benzil)-tiazolidina-2,4-diona (SILVA, 2003).

O LPSF/AC-04 é um análogo estrutural monoacridínico da amsacrina que se caracteriza por ser um pó amorfo, amarelo-esverdeado, de peso molecular 410, ponto de fusão igual a 199°C , porém possui baixa solubilidade em água. Portanto, com a finalidade de minimizar esta limitação, a incorporação deste fármaco em sistemas de liberação controlada torna-se uma alternativa para a terapia do câncer.

2.2. Nanotecnologia e Sistema de Liberação Controlada (SLC)

O amplo desenvolvimento de tecnologias em nanoescala está mudando o meio científico em termos de diagnóstico de doenças, tratamento e prevenção. Esta inovação tecnológica tem sido referida como nanomedicina pelo Instituto Nacional de Saúde, e tem o potencial para transformar as descobertas moleculares decorrentes da genômica e proteômica em benefício para pacientes (SINGH, 2009).

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA et al., 2007).

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou de outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um avanço notório

nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada (DAS; DAS, 2003). Uma ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica (PIMENTEL et al., 2007).

Sistemas de liberação controlada de fármacos são concebidos para se obter uma concentração plasmática ou níveis de concentração tecidual de fármacos dentro da faixa terapêutica com liberação controlada (velocidade controlada), atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto. Estes sistemas podem retardar a liberação do princípio ativo, sustentar a sua liberação e/ou direcioná-lo a sítios específicos de ação (células, órgãos, microorganismos). Na terapia medicamentosa utilizando formas farmacêuticas convencionais como comprimidos não-revestidos, soluções, suspensões, emulsões, cápsulas, etc.; torna-se difícil manter as concentrações plasmáticas de muitos fármacos em nível terapêutico por longo período de tempo, isto porque, essas apresentações liberam todo seu conteúdo de imediato gerando inicialmente um pico máximo de concentração plasmática que pode atingir níveis tóxicos, e logo após, uma concentração insuficiente de ação, ou seja, uma dose subterapêutica, o que proporciona flutuações aleatórias da biodisponibilidade do princípio ativo (Figura 6) (LEE et al., 2004).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos (SLC) e outras substâncias bioativas têm sido amplamente estudados nas últimas décadas e têm direcionado ao desenvolvimento de áreas inovadoras na área da nanotecnologia. Para a indústria farmacêutica, novas tecnologias de sistemas de liberação controlada representam uma ferramenta estratégica com a finalidade de condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, além de carrear fármacos pouco solúveis em água ou instáveis em meio biológico (SAHOO; LABHASETWAR, 2003).

Atualmente as principais formas farmacêuticas de liberação controlada são bombas osmóticas, adesivos transdérmicos, implantes, micropartículas (microesferas e microcápsulas), nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) e lipossomas (VERMA; GARG, 2001).

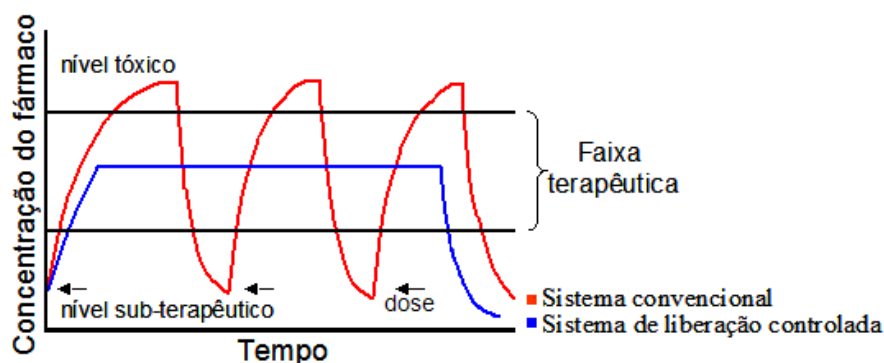


Figura 6 – Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos (LIRA, 2007).

2.2.1. Lipossomas

Alec Bangham, em 1965, demonstrou a capacidade que vesículas artificiais oferecem de formar barreiras para a difusão de solutos. A partir dos estudos pioneiros de Bangham, os lipossomas passaram de simples objetos de pesquisa na área biofísica em carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas (TORCHILIN, 2005; FRÉZARD et al., 2005). Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área (SANTOS; CASTANHO, 2002).

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de fosfolipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. Eles são capazes de incorporar substâncias farmacologicamente ativas no compartimento aquoso interno (substâncias hidrossolúveis), assim como na membrana dos lipossomas (substâncias lipofílicas ou anfífilas) (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; FRÉZARD et al., 2005) (Figura 7).

Os lipossomas 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 hidrofóbico (VOINEA; SIMIONESCU, 2002). Eles 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). Por serem

biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

A composição da bicamada lipídica é um fator preponderante na preparação dos lipossomas e na obtenção de formulações estáveis. Os lipossomas podem ser obtidos a partir de substância anfifílica formadora de fase lamelar (FRÉZARD et al, 2005). Basicamente eles são constituídos por fosfolípídios e esteróis (VEMURI; RHODES, 1995). Os fosfolípídeos são substâncias graxas de origem natural ou sintética; sendo os principais componentes das membranas celulares apresentando a capacidade de auto-organização quando em soluções. Portanto, os lipossomas são compostos por uma porção hidrofílica (cavidade interna aquosa) e outra hidrofóbica (bicamada lipídica) (FATTAL et al., 1993; VEMURI; RHODES, 1995; TORCHILIN, 2006). Os fosfolípídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam forma cilíndrica como a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélna, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas nas preparações lipossomais, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA et al., 2007).

O colesterol é um componente lipídico importante utilizado na composição dos lipossomas. Ele atua aumentando a rigidez das membranas no estado “cristal-líquido” e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado “gel” (FRÉZARD et al., 2005).

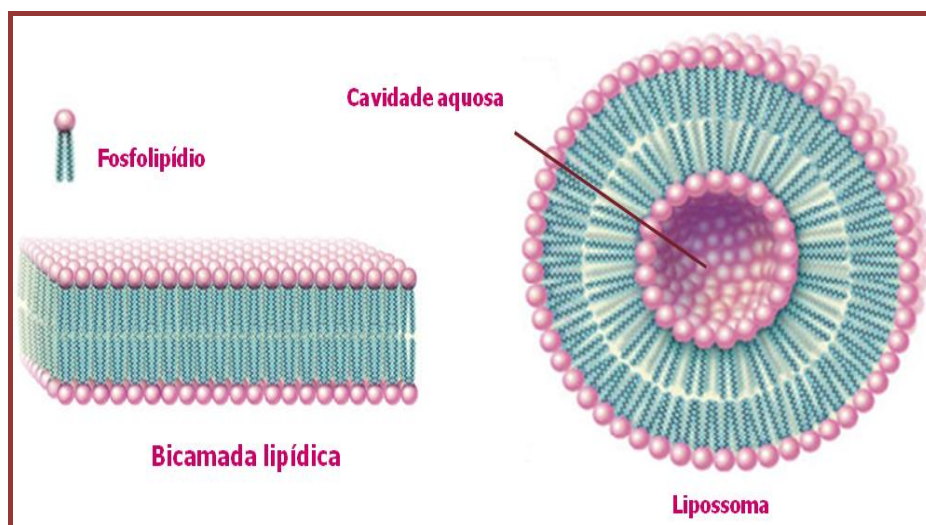


Figura 7 - Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolipídio, da bicamada lipídica e do lipossoma (Adaptado de: NELSON; COX, 2006).

2.2.2. Classificação dos lipossomas

Os lipossomas são sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, número de lamelas, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (FRÉZARD et al, 2005).

Sendo assim os lipossomas podem ser classificados baseando-se no número de lamelas e no tamanho das vesículas como também na sua composição química.

2.2.2.1. Quanto ao número de lamelas e tamanho das vesículas

Os lipossomas podem ser classificados como vesículas multilamelares grandes (MLV - multilamellar large vesicles) que são aqueles lipossomas de tamanho em escala micrométrica que apresentam vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados; vesículas unilamelares grande (LUV - large unilamellar vesicles) que são lipossomas de tamanho em escala de micrômetros possuindo um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica); e os lipossomas em escala nanométrica que possuem um compartimento interno aquoso e um lipofílico que são classificados como vesículas unilamelares pequenas (SUV - small unilamellar vesicles) (Figura 8) (BATISTA et al., 2007).

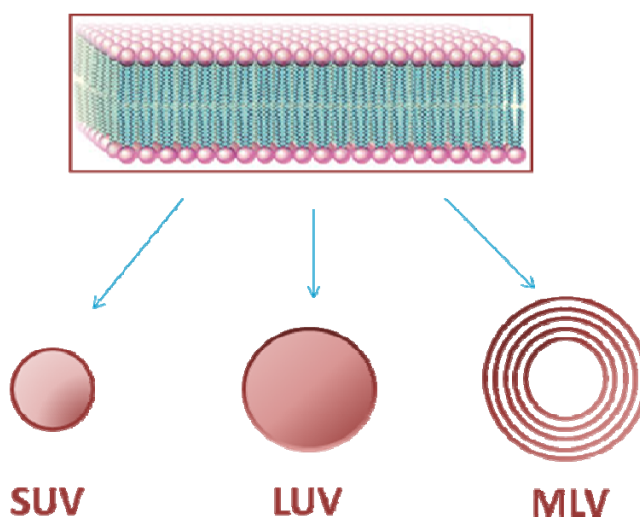


Figura 8 - Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas (Adaptado de: DANIELS, 2009).

2.2.2.2. Quanto à composição química

Na evolução de seu emprego como carreadores de fármacos, algumas alterações foram realizadas na estrutura básica dos lipossomas possibilitando maior aplicação terapêutica, podendo assim ser classificados como Convencionais, Furtivos, Sítio-específicos e Catiônico (Figura 9) (TORCHILIN, 2005).

Lipossomas convencionais são compostos de fosfolipídeos e colesterol, além de um lipídeo com carga negativa ou positiva para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade em suspensão. *In vivo* os lipossomas convencionais são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, e conseqüentemente removidos da circulação; essa captura está diretamente relacionada ao tamanho das vesículas e sua superfície hidrofóbica, o que resulta em uma curta permanência desses lipossomas na corrente sanguínea após o contato com componentes do sangue (VEMURI; RHODES, 1995; PINTO-ALPHANDARY et al., 2000; BATISTA et al., 2007). 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 eliminação dos lipossomas convencionais da circulação pelos macrófagos, compromete a aplicação desses lipossomas no tratamento de várias patologias. 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 possuem como característica mais importante a capacidade de não serem capturados pelo sistema retículo-endotelial permanecendo por mais tempo na circulação. A forma mais frequente para conferir longevidade *in vivo* a carreadores de fármacos é através da modificação de sua superfície, pela adição de certos polímeros sintéticos, tais como poli (etileno glicol) (PEG). Quando o PEG reveste a superfície dos nanocarreadores ele cria uma barreira estérica, evitando assim que ocorra interação destes carreadores com as proteínas do plasma (opsoninas e células do sistema mononuclear fagocitário) (TORCHILIN, 2009).

Embora o PEG seja o polímero mais comumente utilizado nas preparações de sistemas de liberação de fármacos de longa circulação, outros polímeros biocompatível, solúvel e hidrofílicos também têm sido sugeridos como protetores estérico, tais como poli (acrilo amida) e poli (vinil pirrolidona), álcool polivinílico, poli (acrilo morfolino),

fosfolípidios modificados e fosfatidilinositol. Por fim, a consequência biológica mais significativa pela modificação da superfície dos nanocarreadores com polímeros PEG e similares é o aumento acentuado no tempo de circulação e diminuição da acumulação destes sistemas pelo sistema mononuclear fagocitário (TORCHILIN, 2009).

Outro avanço relacionado às modificações estruturais dos lipossomas trata-se de uma combinação de longevidade e capacidade de direcionamento específico. Esses lipossomas são conhecidos como direcionados ou sítio-específicos. Eles são obtidos através do acoplamento de ligantes específicos a superfície das vesículas conferindo seletividade para distribuir o fármaco encapsulado no sítio de ação desejado. Alguns exemplos de ligantes de reconhecimento são anticorpos, proteínas, peptídeo, polissacarídeos e outras moléculas, tais como, folato e transferrina (SAPRA; ALLEN, 2003; TORCHILIN, 2009).

Por fim, os lipossomas catiônicos, como o nome sugere, são lipossomas que apresentam carga positiva na superfície e são utilizados para terapia gênica (BATISTA et al., 2007). A utilização de lipossomas para aplicações de entrega de gene é uma área que se encontra em expansão. Entretanto, muito das características e mecanismo desses sistemas permanecem insuficientemente entendido. Alguns estudos recentes visam combinar a longevidade das preparações lipossomais com uma eficiente entrega do DNA, nestes estudos o DNA pré-condensado foi encapsulado em lipossomas peglados catiônicos (TORCHILIN, 2005).

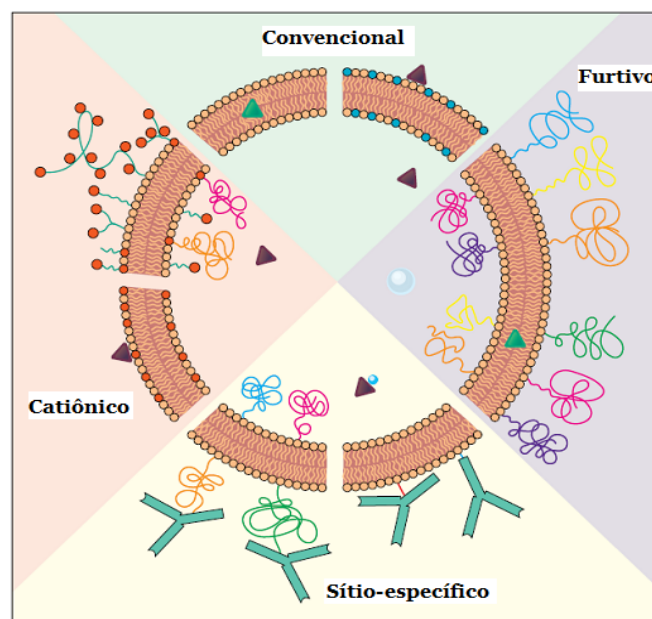


Figura 9 – Características estruturais de lipossomas: Convencionais, Furtivos ou Stealth®, Sítio-específicos e Catiônicos (Adaptado de LASIC, 1996).

2.2.3. Método de preparação dos lipossomas

A larga aceitação da utilização de lipossomas para os mais diversos fins criou a necessidade de desenvolver métodos de preparação eficientes, reproduzíveis e com a simplicidade possível, à escala laboratorial e industrial (SANTOS; CASTANHO, 2002). Sendo assim, é importante ressaltar que o tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. Assim, visto a composição química, número de camadas, distribuição de tamanhos e o número de lamelas influenciarem consideravelmente qualquer aplicação dos lipossomas, o seu método de preparação deverá ser sempre escolhido criteriosamente (SANTOS; CASTANHO, 2002; BATISTA et al., 2007).

Vários métodos de preparação de lipossomas foram propostos, como por exemplo, extrusão, evaporação em fase-reversa, microfluidização e hidratação do filme lipídico.

- **Extrusão:** este método caracteriza-se pela utilização de Prensa de French ou membranas de polycarbonato. 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 polycarbonato há uma uniformização no tamanho das vesículas, as quais passam através dos poros contidos na membrana que têm seus tamanhos reduzidos de forma gradativa (SANTOS; CASTANHO, 2002; FATTAL et al., 1993).

- **Evaporação em fase-reversa:** esse método consiste na solubilização dos fosfolipídios em solvente orgânico seguida da adição da 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 100nm (FATTAL et al., 1993).

- **Hidratação do filme lipídico:** nesta técnica primeiramente os lipídeos são dissolvidos em solvente orgânico, adicionados a um balão de fundo redondo, seguido da evaporação do solvente com consequente formação do filme lipídico. A hidratação do filme pode ser efetuada com água ou solução tampão, promovendo a formação de lipossomas multilamelares. Por esse método o fármaco pode ser incorporado na fase aquosa (hidrofílico) ou dissolvido na mistura lipídica (lipofílico) (BATISTA et al., 2007; SANTOS; CASTANHO, 2002; FRÉZARD et al., 2005). Os lipossomas obtidos pelo método da hidratação do filme lipídico podem ser submetidos à ação de ultrassom com ajuda de uma sonda. A energia liberada promove a diminuição do raio dos MLVs tornando-os SUVs (FATTAL et al., 1993; WATWE; BELLARE, 1995; ANDRADE et al., 2004).

A taxa de encapsulação de um composto em lipossomas e a relação composto/lipídeo são dois parâmetros importantes a serem considerados na escolha do método de preparação; teoricamente taxa de encapsulação em torno de 100% pode ser obtida com fármacos lipofílicos (GULATI et al., 1998; FRÉZARD et al., 2005).

2.2.4. Aplicações dos sistemas lipossomais

Desde as observações pioneiras de Alec Bangham há aproximadamente 40 anos, os lipossomas têm percorrido um longo caminho desde ser apenas mais um objeto exótico de pesquisa biofísica, para se tornar um transportador farmacêutico de escolha para numerosas aplicações práticas. O avanço real no desenvolvimento da área durante os últimos 15 anos resultaram na aprovação de vários fármacos lipossomais, e no aparecimento de muitas tecnologias e produtos biomédicos envolvendo lipossomas (TORCHILIN, 2005).

Atualmente há no mercado vários fármacos antineoplásicos encapsulados em lipossomas como o Doxil[®] (lipossomas de doxorubicina), DaunoXome[®] (lipossomas de daunorubicina) que já são amplamente utilizados clinicamente e o antibiótico Anfotericina B comercializado com o nome de Ambisome (TORCHILIN, 2005).

Nanocarreadores farmacêuticos podem ser utilizados para fins de diagnóstico e imagem, pois permitem a biodistribuição do agente de contraste em tempo real. Entre os nanocarreadores, os lipossomas merecem uma atenção especial devido ao fácil controle de suas propriedades e de suas características farmacológicas. Os lipossomas podem incorporar agentes de contrastes tanto no compartimento aquoso como na membrana. Agentes de contraste encapsulado em lipossomas têm sido utilizados para diagnóstico por imagem experimental de fígado, baço, cérebro, sistema cardiovascular, tumores, inflamações e infecções. Entretanto para fins de diagnóstico as formulações lipossomais devem satisfazer alguns requisitos tais como: preparação simples e eficiente, fácil de manusear e possuir estabilidade in vivo e de armazenamento dentro dos limites aceitáveis (TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2006).

Nos últimos anos, lipossomas de aplicação tópica têm sido sugeridos em diferentes modelos de doenças. Os esforços atuais nesta área se concentram em torno dos procedimentos de otimização e de novas composições. Novos lipossomas altamente flexíveis chamados transferossomas, que segue o gradiente de atividade trans-epidérmica da água na pele, têm sido proposto (TORCHILIN, 2005).

2.3. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico por Espectrofotometria-UV

O controle de qualidade de fármacos puros e formas farmacêuticas é realizado por métodos oficiais e validado. Segundo, a resolução 899 da ANVISA o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Além disso, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise.

Apesar das vantagens indiscutíveis na utilização da técnica cromatográfica CLAE, esta apresenta algumas limitações como o alto custo da instrumentação e da operação, tempo relativamente longo de análise e ainda a necessidade de experiência no manuseio do equipamento e tratamento de amostras (SIQUEIRA-MOURA et al., 2008).

A espectrofotometria é uma técnica analítica bastante conveniente, muito utilizada em laboratórios de controle de qualidade, devido à sua simplicidade, baixo custo e larga disponibilidade (DARWISH et al., 2009). Como não foi descrito na literatura nenhum método analítico validado para determinação da LPSF/AC-04, fez-se necessário, neste trabalho, o desenvolvimento e validação de um método analítico econômico considerado simples, preciso e exato, para a quantificação da LPSF/AC-04 por espectrofotometria-UV.

3.0 Referências

ALBERT, A. The Acridines. 2nd Ed., **Edward Arnold Publishers**, London, 1966.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-445, 2004.

AUPARAKKITANON, S.; NOONPAKDEE, W.; RALPH, R.K.; DENNY, W.A.; WILAIRAT, P. Antimalarial 9-anilinoacridine compounds directed at hematin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3708-3712, 2003.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 167-179, 2007.

BLASIAK, J.; GLOC, E.; DRZEWOSKI, J.; WOZNIAK, K.; ZADROZNY, M.; SKÓRSKI, T.; PERTYNSKI, T. Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. **Mutation Research**, v. 535, p. 25-34, 2003.

BONSE, S.; SANTELLI-ROUVIER, C.; BARBE, J.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase by Acridines: Kinetic Studies and Structure-Activity Relationship. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 5448–5454, 1999.

BRIDEWELL, D. J.; FINLAY, G. J.; BAGULEY, B. C. Topoisomerase I/II selectivity among derivatives of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA). **Anticancer Drug Design**, v. 16, p. 317–324, 2001.

BROHOLM, M. M.; BROHOLM, K.; ARVIN, E. Sorption of heterocyclic compounds on natural clayey till. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 39, p. 183–200, 1999.

CAIN, B. F.; ATWELL, G. J. The experimental antitumour properties of three congeners of the acridylmethanesulphonanilide (AMSA) series. **European Journal of Cancer**, v. 10, n. 8, p. 539-549, 1974.

DANIELS, R. **Liposomes - Classification, Processing Technologies, Industry Applications and Risk Assessment**. 2005. Disponível em: <<http://www.azonano.com>>. Acesso em: 01 de Dezembro de 2009.

DARWISH, I. A.; ABDINE, H. H.; AMER, S. M.; AL-RAYES, L. I. Spectrophotometric study for the reaction between fluvoxamine and 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate: Kinetic, mechanism and use for determination of fluvoxamine in its dosage forms. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, p. 897–902, 2009.

DAS, N. G.; DAS, S. K. Controlled-release of oral dosage forms. **Formulation, Fill & Finish**, v. 27, p. 10-16, 2003.

DENNY, W. A. Chemotherapeutic effects of acridine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry ReV.sOnline**, v.1, p. 257–266, 2004.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v. 68, p. 1432-1441, 2006.

EL-DEIRY, W. S. Acridine activation of p53 and uses thereof. – PI 010984 A2. 2008.

ERNER, W. E. Alkyl acridines – PI 3019227. 1962.

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

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.623, p. 14-23, 2007.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; SCHETINI, D. A.; ROCHA, O. G. F. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.

GÁLVEZ-PERALTA, M.; HACKBARTH, J. S.; FLATTEN, K. S.; KAUFMANN, S. H.; HIASA, H.; XING, C.; FERGUSON, D. M. On the role of topoisomerase I in mediating the cytotoxicity of 9-aminoacridine-based anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 4459–4462, 2009.

GELLERT, G. C.; JACKSON, S. R.; DIKMEN, Z. G.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Telomerase as a therapeutic target in cancer. **Drug Discovery Today**, v. 2, p. 159–64, 2005.

GIRAULT, S.; GRELLIER, P.; BERECIBAR, A.; MAES, L.; MOURAY, E.; LEMIERE, P.; DEBREU, M. A.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C. Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of *bis*(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): influence of the linker. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2646-2654, 2000.

GOODELL, J. R.; MADHOK, A. A.; HIASA, H.; FERGUSON, D. M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 5467–5480, 2006.

GOODELL, J. R.; OUGOLKOV, A. V.; HIASA, H.; KAUR, H.; REMMEL, R.; BILLADEAU, D. D.; FERGUSON, D. M. Acridine based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 179-182, 2008.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 165, p. 129-168, 1998.

HAHN, W. C.; STEWART, S. A.; BROOKS, M. W.; YORK, S. G.; EATON, E.; KURACHI, A.; et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. **Nature Med**, v. 5, p. 1164-70, 1999.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, p. 458-60, 1990.

HEALD, R. A.; MODI, C.; COOKSON, J. C.; HUTSCHINSON, I.; LAUGHTON, C. A.; GOWAN, S. M.; et al. Antitumor polycyclic acridines. 8. Synthesis and telomerase-inhibitory activity of methylated pentacyclic acridinium salts. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 590-7, 2002.

INCLES, C. M.; SCHULTES, C. M.; KEMPSKI, H.; KOEHLER, H.; KELLAND, L, R.; NEIDLE, S. A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 1201-1206, 2004.

KESSLER, T.; MOHR, M.; MÜLLER-TIDOW, C.; KRUG, U.; BRUNNBERG, U.; MOHR, B.; SCHLIEMANN, C.; SAUERLAND, C.; SERVE, H.; BÜCHNER, T.; BERDEL, W. E.; MESTERS, R. M. Amsacrine containing induction therapy in elderly AML patients: Comparison to standard induction regimens in a matched-pair analysis. **Leukemia Research**, v. 32, p. 491–494, 2008.

LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics** , v99, p. 167–181, 2003.

LASIC, D. D. Liposomes. **Science & Medicine**, v. 1, p. 35-43, 1996.

LEE, T. W. Y. and ROBINSON, J. T. Controlled-Release Drug-Delivery Systems. In: **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**, p.933-960, 2004.

LE PECQ, J. B. ; LE BRET, M. ; BARBET, J. ; ROQUES, B. DNA polyintercalating drugs: DNA binding of diacridine derivatives. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 2915-2919, 1975.

LERMAN, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 18-30, 1961.

LERMAN, L. S. The structure of the DNA-acridine complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 49, p. 94-102, 1963.

LI, T-K and LIU, L. F. Tumor cell death induced by Topoisomerase-targeting drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.41, p.53-77, 2001.

LIRA, M. C. B. **Complexo de inclusão ácido úsnico:β-ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> >. Acessado em: 16 de Agosto de 2010.

MOLONEY, G. P.; KELLY, D. P.; MACK, P. Synthesis of Acridine-based DNA Bis-intercalating Agents. **Molecules**, v. 6, p. 230-243, 2001.

MORIN, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. **Cell**, v. 59(3), p. 521-529, 1989.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Membranas biológicas e transporte. In: Lehninger: Princípios da Bioquímica. 4ªed. São Paulo: Savier, v. 1, p. 372, 2006.

NESMÈRAK, K.; POSPÍSEK, M.; ZIKANOVÁ, B.; NEMEC I., BARBE, J.; GABRIEL, J. Effect of Structure on Antibiotic Action of New 9-(Ethylthio)acridines. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 8-120, 2002.

OPPEGARD, L. M.; OUGOLKOV, A. V.; LUCHINI, D. N.; SCHOON, R. A.; GOODELL, J. R.; KAUR, H.; BILLADEAU, D. D.; FERGUSON, D. M.; HIASA, H. Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, p. 223–229, 2009.

PIMENTEL, L. F.; JACOME-JUNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 503-514, 2007.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155-168, 2000.

PITTA I. R., GALDINO, S. L., LIMA, M. C. A. Moléculas com atividade antitumoral – PI 06018270. 2006.

PLAXE, S. C.; BLESSING, J. A.; MORGAN, M. A.; CARLSON, J. Phase II trial of pyrazoloacridine in recurrent platinum-resistant ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 45-47, 2002.

SAHOO, S.K. AND LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v.8, p.1112–1120, 2006.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, p.733-737, 2007.

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

SHAY, J. W.; RONINSON, I. B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. **Oncogene**, v. 23, p. 2919-33, 2004.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligant-target liposomal anticancer drugs. **Progress in lipid Research**, v. 42, p. 439-462, 2003.

SILVA, F. S. V. C. B. **Síntese e avaliação biológica de novos derivados acridino-tiazolidínicos e benzilideno-imidazolidínicos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos – Departamento de Antibióticos) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2001.

SILVA, T. G. **Síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados acridino-tiazolidínicos e acridino-imidazolidínicos**. 2003. 228f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

SINGH, R.; LILLARD-JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v.86, p. 215-223, 2009.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 621-628, 2008.

SOURDON, V.; MAZOYER, S.; PIQUE, V.; GALY, J-P. Synthesis of new Bis- and Tetra- acridines. **Molecules**, v. 6, p. 673-682, 2001.

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

TORCHILIN, V.P. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 71, p. 431-444, 2009.

TORCHILIN, V.P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1532-1555, 2006.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 145-160, 2005.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology On-line**, v. 25, p. 1-14, 2001.

VISPÉ, S., VANDENBERGHE, M. R., ANNÉREAU, J. P., CRÉANCIER, L., PIQUE, V., GALY, J. P., KRUCZYNSKI, A., BARRET, J. M., BAILLY, C. Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1863-1872, 2007.

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.

WANG, S. S.; LEE, Y. J.; HSU, S. C.; CHANG, H. O.; YIN, W. K.; CHANG, L. S.; CHOU, S. Y. Linker-modified triamine-linked acridine dimers: synthesis and cytotoxicity properties in vitro and in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 735-748, 2007.

WATWE, R.M.; BELLARE, J.R. Manufacture of liposomes: A review. **Current Science**, v. 68, p. 715-724, 1995.

YANG, P.; YANG, Q.; QIAN, X.; TONG, L.; LI, X. Isoquino[4,5-bc]acridines: design, synthesis and evaluation of DNA binding, anti-tumor and DNA photo-damaging ability. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 84, p. 221-226, 2006.

ZAKIAN, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science**, v. 270, p. 1601-7, 1995.

ZHANG, X.; MAR, V.; ZHOU, W.; HARRINGTON, L.; ROBINSON, M. O. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. **Genes & Development**, v. 13, p. 2388-99, 1999.

4.0. Objetivos

4.1. Geral

Desenvolver e validar um método analítico UV por espectrofotometria para a quantificação do LPSF/AC-04 nanoencapsulado em lipossomas.

4.2. Específicos

- Obter lipossomas contendo o derivado acridínico LPSF/AC-04
- Desenvolver e validar um método analítico UV por espectrofotometria para a quantificação do LPSF/AC-04 em lipossomas;
- Determinar o teor e a taxa de encapsulação do LPSF/AC-04 nos lipossomas.

5 – ARTIGO

**Validation of a UV spectrophotometric method for the determination of the
LPSF/AC-04 acridine derivate encapsulated into liposomes**

**Validation of a UV spectrophotometric method for the determination of the
LPSF/AC-04 acridine derivative encapsulated into liposomes**

Ferraz, R.S.¹, Mendonça, E.A.M.¹, Cavalcanti, I.M.F.¹, Silva, J.P.A.¹, Galdino, S.L.²,
Pitta, I.R.², Alves, M.C.², Santos-Magalhães, N.S.^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Departamento de Antibióticos (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235

Cidade Universitária, 50679-901, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author

Dr. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária.

50670-901, Recife-PE, Brazil.

Phone: + 55 81 21268587; fax: +55 81 21268485

E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

A spectrophotometric method was developed and validated for determining the content of the acridine derivative (LPSF/AC-04) encapsulated into liposome. The liposomes were prepared using the lipid film hydration technique. LPSF/AC-04 was determined in methanol at 250 nm and the molar absorptive coefficient (ϵ) was found to be $7.60 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. The UV spectrophotometric method for determining LPSF/AC-04 was linear ($\text{Absorbance} = 0.18068 \times [\text{LPSF/AC-04 } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0.00348$), at concentrations ranging from 0.3 to 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9995$). This method was tested and validated according to ICH guidelines. The detection and quantification limits were 0.047 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.143 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The results demonstrated that the procedure was accurate, precise, specific and reproducible, while being simple and less-time consuming; it can therefore be suitably applied for the content estimation of the LPSF/AC-04 in liposome. The content and encapsulation efficiency of LPSF/AC-04 in liposome were $104.44 \pm 1.56\%$ and $99.68 \pm 0.24\%$, respectively. The proposed analytical method is rapid, simple, low cost and sensitive. It can thus be used for routine analysis of pharmaceutical formulations.

Keywords: Acridine derivative (LPSF/AC-04); Liposome; UV spectrophotometry

1. Introduction

Acridine derivatives are known to present a wide spectrum of biological activities, such as antibacterial, antimalarial, antitrypanosomal [1], antileishmanial [2] and antiviral [3] ones, in particular, their antitumor activity [4]. This broad spectrum of pharmacological activities of acridine compounds is a consequence of their ability to intercalate into the DNA molecule, thereby inhibiting the enzymatic activity of the topoisomerase II [5].

The rational design of drugs is one of the most advantageous approaches to the introduction of new drugs in therapy that has been widely used by researchers in the medicinal chemistry field. In this connection, acridine derivatives with potential antitumor activity have been synthesized [6] at the Laboratory of Rational Design and Synthesis of Drugs (LPSF) of the Federal University of Pernambuco, Brazil. Of these, the molecule LPSF/AC-04 [5-(acridine-9-yl-methylene)-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione] (Fig. 1) presents a molecular weight of 410 and a melting point of 199°C, being characterized as a yellow-green amorphous powder. The disadvantage of this molecule is its very low solubility in water ($1.46 \pm 0.004 \mu\text{g.mL}^{-1}$ at 25°C). Therefore, in order to overcome this drawback, the incorporation of LPSF/AC-04 in drug delivery systems, such as liposomes [7, 8], can improve its bioavailability and permit its use in cancer therapy.

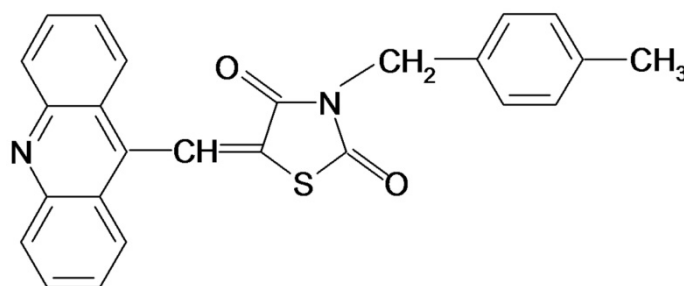


Figure 1. Chemical structure of (5-(acridine-9-yl-methylene)-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione) – LPSF/AC-04.

The quality control of drugs in pharmaceutical dosage forms is performed by official or validated methods. Spectrophotometry is the simplest and most cost-effective, accurate and reproducible analytical technique extensively used in the drug standardization laboratories, as recognized in different pharmacopoeias for the routine analysis of different drugs in pharmaceutical dosage forms [9, 10, 11].

Up to now, no UV-spectrometric validated method to quantify the LPSF/AC-04 has been reported in the literature. Thus, the goal of the present study was to develop and validate a UV spectrometric analytical method for determining LPSF/AC-04 in pharmaceutical formulations. The UV validated method was applied to determine the content of LPSF/AC-04 in liposomes.

2. Experiments

2.1. Materials and reagents

Acridine derivate (LPSF/AC-04) was synthesized as previously reported [6]. Cholesterol (CHOL), trehalose and stearylamine (SA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); soybean phosphatidylcholine (SPC) (98%, Epikuron 200[®]) was obtained from Lipoid GMBH (Germany). Methanol and chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) were of analytical grade.

2.2. Instruments

A UV spectrophotometer (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) equipped with 10 mm quartz cells was used for all the absorption measurements.

2.3. LPSF/AC-04 standard solutions

The standard solutions of LPSF/AC-04 with concentrations ranging from 0.3 to 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were prepared in methanol from a stock solution (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Standard solutions were prepared in triplicate to validate the analytical method.

2.4. Analytical method validation

The validation of the UV spectrophotometric analytical method was carried out based on parameters such as linearity, limits of detection and quantification, specificity, precision, accuracy and robustness [11]. All assays were performed at 25°C except for the robustness assay, when samples were also stored at 4°C and 37°C before analysis.

Initially, UV spectra of LPSF/AC-04 at different concentrations (0.3, 0.5, 1, 1.5 and 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) were obtained to determine the wavelength of its greatest absorptivity.

2.4.1. Specificity

The method specificity was evaluated by comparing the UV spectra solutions of LPSF/AC-04, unloaded liposomes and LPSF/AC-04-loaded liposomes. The scans were performed from 210 to 340 nm and checked for changes in the absorbance at the respective wavelengths [12].

2.4.2. Linearity

The linearity of the proposed method was verified by preparing three different standard solutions (0.3, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), analyzed in triplicate, to plot nine derived standard curves. The linearity of the standard curve was evaluated by linear regression analysis through the least square method, and analysis of variance (ANOVA).

2.4.3. Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of the LPSF/AC-04 were determined using data from standard curves. LOD and LOQ were calculated as $3.3 \sigma/S$ and $10 \sigma/S$, respectively, where S is the slope of the average standard curve and σ is the standard deviation of y -intercept of the regression equation ($n=9$).

2.4.4. Accuracy

The accuracy of the method was determined by the recovery of a known amount of the LPSF/AC-04 added to samples of unloaded liposomes. Briefly, to determine the accuracy of the proposed method, different levels of drug concentrations were used: lower concentration (0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), intermediate concentration (1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and higher concentration (1.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A known aliquot of LPSF/AC-04 stock solution (500, 1000 and 1500 μL) was transferred to a volumetric flask of 10 mL containing unloaded liposomes (150 μL) and the volume filled with methanol. Next, a 1:10 dilution in methanol of the sample was performed. The samples were prepared in triplicate and analyzed by the proposed method. The relative standard deviation and the LPSF/AC-04 recovery percentage were employed to evaluate the accuracy of the method by the equation 1 [12]. The paired t -test at a 95% level of significance was performed to compare the mean absorbance of the samples.

$$\text{Recovery (\%)} = 100 \times [\text{found/added drug concentration}]$$

Eq. 1

2.4.5. Precision

Inter-day, intra-day and inter-analyst variations were studied to determine repeatability and intermediate precision of the proposed analytical method. The intermediate precision was determined by analyzing three different levels of LPSF/AC-04 concentrations at 0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Different stock solutions were prepared in triplicate by two different analysts at two different times in a day and analyzed for intra-day variations. The same procedure was followed for two different days to study inter-day and inter-analyst variations. The percentage relative standard deviation (% R.S.D.) of the predicted concentrations from the regression equation was taken as precision. The paired *t*-test at a 95% level of significance was performed to compare the mean absorbance of the samples.

2.4.6. Robustness

Robustness of the proposed method was determined by varying the temperature of sample storage (4°C, 25°C and 37°C) for 24 hours before analysis, and by using solvents from different manufacturers to prepare the sample solutions. Three different solutions of LPSF/AC-04 (0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) were prepared in methanol and mean recovery was determined [12].

2.5. Method application to LPSF/AC-04-loaded liposomes

2.5.1. LPSF/AC-04 content determination

LPSF/AC-04-loaded liposomes were prepared using the thin lipid film method (Andrade et al., 2004). An aliquot of liposomal sample (75 μL) was diluted with methanol (10 mL), sonicated for 5 min and then diluted (500 μL) with methanol to 5 mL. The samples were analyzed at 250 nm for determining the LPSF/AC-04 content using a LPSF/AC-04 standard curve with concentrations varying from 0.3 to 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.5.2. Drug entrapment efficiency

Drug entrapment efficiency was determined using the ultrafiltration by ultracentrifugation technique (Ultrafree[®] units, Millipore, USA). Samples of LPSF/AC-04-loaded liposomes (400 μL) were inserted into the filtration unit and submitted to ultracentrifugation at 8,792 *g* for 1 h. The drug content was quantified in the supernatant

as described above. Data are presented as the percentage of the total content of LPSF/AC-04 that was entrapped in liposomes.

3. Results and discussion

3.1. Analytical method validation

The absorption spectra of the LPSF/AC-04 in methanol were recorded at concentrations ranging from 0.3 to 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 2). It was found that LPSF/AC-04 exhibits a maximum absorption peak (λ_{max}) at 250 nm with a molar absorptivity (ϵ) of $7.60 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. In addition, no interference of the solvent in LPSF/AC-04 shoulder peaks near λ_{max} was verified. Methanol can thus be considered a suitable solvent for validating the proposed method, since it showed no interference in the analysis, thus supporting the reproducibility of the results.

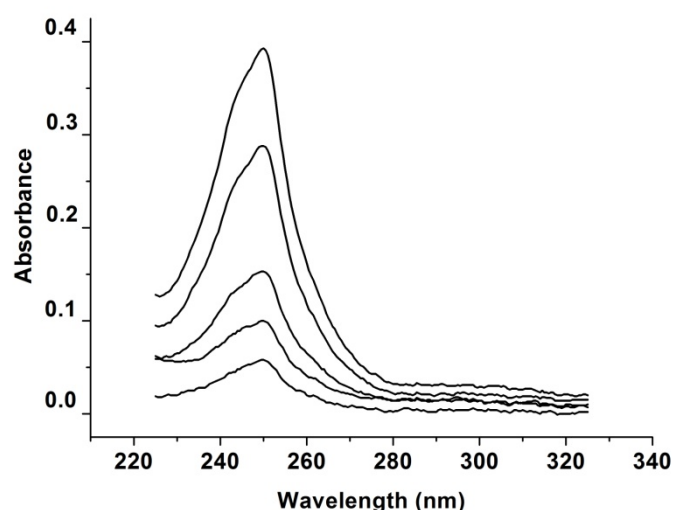


Figure 2. Scanning UV spectra of LPSF/AC-04 at concentrations of 0.3, 0.5, 1, 1.5 and 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol.

3.2. Specificity

A well-defined peak of LPSF/AC-04 was observed at 250 nm (Fig. 3a). In addition, the absorption spectrum of unloaded liposomes presented no peak at 250 nm (Fig. 3b). The absorption peak of LPSF/AC-04 at 250 nm was unchanged in the presence of the constituents of the liposomal formulation (Fig 3c), which demonstrates the specificity of the method.

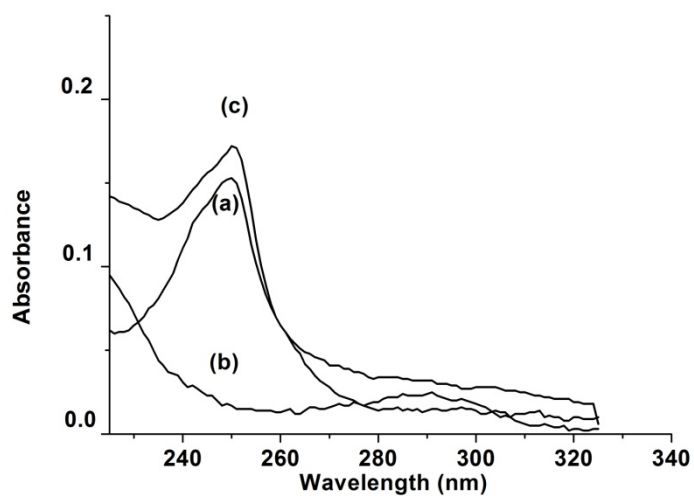


Figure 3. Scanning UV spectra of: (a) LPSF/AC-04 ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (b) unloaded liposomes and (c) LPSF/AC-04-loaded liposomes ($1.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diluted in methanol.

3.3. Linearity

The absorbance at $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$ and the concentrations of the LPSF/AC-04 ranging from 0.3 to $2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ presented a linear relationship, and the regression analysis data are summarized in Table 1. The standard curves were fitted by least square treatment to obtain the following mean regression equation: $\text{Absorbance} = 0.18068 \times [\text{LPSF/AC-04, } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0.00348$ ($r^2 = 0.9995$, $n=9$).

Table 1

Optical characteristics of LPSF/AC-04, statistical data of the regression equations and validation parameters

LPSF/AC-04	Parameters
Optical characteristics	
Molar absorptivity, ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	7.60×10^4
Regression analysis	
Slope (S.E. ^a)	0.18068 (2.09 x 10 ⁻³)
Intercept (S.E. ^a)	0.00348 (2.58 x 10 ⁻³)
Regression coefficient (r^2)	0.99946
Validation parameters	
Measurement wavelength (nm)	250
Linear range ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.3-2.0
Limit of detection, LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.047
Limit of quantification, LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.143

3.4. Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of LPSF/AC-04 were 0.047 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.143 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. These results showed that even at small concentrations of LPSF/AC-04 the method was sensitive.

3.5. Accuracy

The accuracy of the procedure was determined by recovery tests of known quantities of LPSF/AC-04 (0.5, 1.0 and 1.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) spiked in unloaded liposomes. LPSF/AC-04 recoveries ranging from 99.36 to 101.51% were found (Table 2). The mean LPSF/AC-04 recovery values are close to 100%, and their low standard deviation values (0.67 – 1.91) represent the great accuracy of the analytical method. These results reveal that any small change in the drug concentration in the solutions can be accurately determined by the proposed analytical method.

Table 2

Recovery studies to assess the accuracy of the proposed method.

LPSF/AC-04 in liposomes ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				t values	
Added	Found ($\pm\text{S.D.}$) ^a	R.S.D (%)	Mean % recovery ($\pm\text{S.D.}$) ^a	t_{cal} ^b	t_{crit} ^b
0.5	0.502 $\pm$ 0.006	1.02	100.56 $\pm$ 1.33	0.53	4.30
1.0	1.015 $\pm$ 0.022	0.76	101.51 $\pm$ 1.91	0.40	4.30
1.5	1.490 $\pm$ 0.010	0.49	99.36 $\pm$ 0.67	0.24	4.30

^aValues are the average of nine measurements.^b t_{cal} is the calculated value and t_{crit} is the theoretical value based on the paired *t*-test at the *p* = 0.05 level of significance.

3.6. Precision

The repeatability (R.S.D. %) ranged from 4.20 to 4.34 (%) for three levels of LPSF/AC-04 concentrations (Table 3). The results of repeatability (intra-day precision) of the method indicated the precision under the same operating conditions over a short period of time. Inter-day precision expresses within-laboratory variations on different days by different analysts [10]. In the precision study, % R.S.D. values were less than 5% in all cases and were well within the acceptable range, indicating that the method has a good repeatability and inter-day precision.

Table 3

Precision of the analytical proposed method.

Precision	[LPSF/AC-04] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[LPSF/AC-04] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R.S.D. (%)	t value	
	Added	Found $\pm$ S.D.			
Inter-day				$t_{\text{cal}}^{\text{a}}$	$t_{\text{tab}}^{\text{b}}$
Same analyst					
(days 1 and 2)	0.5	0.494 $\pm$ 0.02	4.36	0.57	2.57
	1.0	1.011 $\pm$ 0.02	2.50	0.31	2.57
	1.5	1.496 $\pm$ 0.02	1.52	0.73	2.57
Inter-day					
Analysts 1 and 2					
(days 1 and 2)	0.5	0.498 $\pm$ 0.02	4.01	0.83	2.57
	1.0	1.008 $\pm$ 0.05	4.78	0.68	2.57
	1.5	1.529 $\pm$ 0.07	4.46	0.33	2.57
Intra-day					
Different tests					
(same analyst;	0.5	0.494 $\pm$ 0.02	4.20	0.57	2.57
day 1)					
	1.0	1.019 $\pm$ 0.04	4.34	0.32	2.57
	1.5	1.534 $\pm$ 0.06	4.20	0.25	2.57

^a t_{cal} is the calculated value;^b t_{crit} is the theoretical value based on the paired t -test at the $p = 0.05$ level of significance ($n=6$).

3.7. Robustness

The analytical method proved to be robust (Table 4), since no statistically significant differences (Student t test) were found when samples were subjected to temperature variations and diluted in solvents from different manufacturers. The satisfactory recovery of LPSF/AC-04 from liposomes ($> 99\%$) stored at different temperatures confirms that the molar absorptivity of LPSF/AC-04 is not dependent on the temperature.

Table 4

The robustness of the UV proposed method

Parameters	LPSF/AC-04 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			t values	
	Added	Found $\pm$ S.D.	R.S.D. (%)	$t_{\text{cal}}^{\text{a}}$	$t_{\text{crit}}^{\text{b}}$
Solvents 1 and 2	0.5	0.512 ± 0.02	3.55	0.16	2.57
	1.0	1.032 ± 0.01	1.26	0.001	2.57
	1.5	1.535 ± 0.05	3.03	0.11	2.57
	Added	Found $\pm$ S.D.		$t_{\text{cal}}^{\text{a}}$	$t_{\text{crit}}^{\text{b}}$
Temperatures (4°C, 25°C and 37°C)	0.5	0.511 ± 0.01	2.78	0.04	2.30
	1.0	1.167 ± 0.04	3.55	0.00	2.30
	1.5	1.523 ± 0.03	2.33	0.38	2.30

^a t_{cal} is the calculated value;^b t_{crit} is the theoretical value based on the paired t -test at the $p = 0.05$ level of significance ($n=9$).

3.8. Method application to LPSF/AC-04-loaded liposomes

The content ($104.44 \pm 1.56\%$) and encapsulation efficiency ($99.68 \pm 0.24\%$) of LPSF/AC-04 in liposomes were determined using the standard curve of the validated UV spectroscopic method. The high recovery and encapsulation efficiency of LPSF/AC-04 from liposomes indicated the effectiveness of the proposed method in the quantification of LPSF/AC-04.

4. Conclusion

The proposed UV spectrometric analytical method is simple, rapid, accurate, precise and low-cost, and can therefore be used for the routine analysis of the LPSF/AC-04 in pharmaceutical formulations.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for grant # 474071/2007-3. The first author is also grateful to the Brazilian Education Ministry (CAPES) for a scholarship grant.

References

- [1] S. Bonse, C. Santelli-Rouvier, J. Barbe, R.L. Krauth-Siegel, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 5448-5454.
- [2] S. Girault, P. Grellier, A. Berecibar, L. Maes, E. Mouray, P. Lemiere, M.A. Debreu, E. Davioud-Charvet, C. Sergheraert, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2646-2654.
- [3] J.R. Goodell, A.A. Madhok, H. Hiasa, D.M. Ferguson, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 5467-5480.
- [4] J.R. Goodell, A.V. Ougolkov, H. Hiasa, H. Kaur, R. Remmel, D.D. Billadeau, D.M. Ferguson, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 179-182.
- [5] W.A. Denny, *J. Med. Chem.* 1 (2004) 257-266.
- [6] I.R. Pitta, S.L. Galdino, M.C.A. Lima, Moléculas com atividade antitumoral – PI 06018270. 2006.
- [7] K.A. Edwards, A.J. Baeumner, *Talanta* 68 (2006) 1432-1441.
- [8] V.P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery* 4 (2005) 145-160.
- [9] S. Ashour, M. Bahbouh, M. Khateeb, *Spectrochim. Acta A* 78 (2011) 913-917.
- [10] S.K. Motwani, S. Chopra, F.J. Ahmad, K.K. Roop, *Spectrochim. Acta A* 68 (2007) 250-256.
- [11] S.T. Ulu, F.T. Elmali, *Spectrochim. Acta A* 77 (2010) 324-329.
- [12] ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1996. Q2B: Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology. London.

6.0. CONCLUSÕES

- ✓ O método analítico por espectrofotometria UV proposto para a determinação de LPSF/AC-04 em lipossomas demonstrou-se simples, rápido, sensível, robusto, preciso e exato.
- ✓ O teor e a taxa de encapsulação da LPSF/AC-04 contida nas formulações lipossomais apresentaram-se próximos a 100%.
- ✓ Esses resultados demonstram a viabilidade do método analítico proposto, o qual poderá ser utilizado para análises de rotina de formulações farmacêuticas contendo o LPSF/AC-04.

ANEXO

NORMAS DA REVISTA

(Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy)



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Guide for Authors

Introduction

Manuscripts dealing with novel experimental and/or theoretical aspects of molecular spectroscopy and novel applications to chemical problems will be considered for publication in *Spectrochimica Acta, Part A*. Papers describing minor extensions of previously published methodologies are not appropriate for the journal, nor are papers that describe routine use of standard techniques, and such papers shall therefore not be considered.

In addition to fundamental papers on molecular structure and interactions (including abinitio theory), papers dealing with novel applications in areas such as qualitative and quantitative analysis, instrumentation, surface spectroscopy, non-linear optics, laser photochemistry, and fundamental aspects of atmospheric, environmental and biomedical measurements are also encouraged.

The range of spectroscopic techniques covered by the journal includes infrared, visible and ultraviolet, linear and circular dichroism, fluorescence, Raman, microwave; all continuous wave and time-resolved spectroscopies; magnetic resonance spectroscopy, magnetic circular dichroism, neutron and light-scattering; and Mossbauer and X-ray absorption.

Cover Letter

The cover letter of each paper submitted for publication should clearly present:

- (a) scientific motivation (i.e., why this study is of interest);
- (b) relevance to the stated scope of *Spectrochimica Acta, Part A*;
- (c) general significance of the obtained results (i.e., how this study contributes to the advancement of knowledge in the general area of the study). Note that novelty of a study does not necessarily imply general significance of the results.

Ethics in Publishing

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

Conflict of interest

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

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in

these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

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

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

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

Language and language services

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

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process.

Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

For submission of your article to this journal please go to: <http://ees.elsevier.com/saa>.

Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user

documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article Structure

Subdivision – numbered sections

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

Introduction

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

Materials and methods

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

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Appendices

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

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

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

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

Acknowledgements

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

Nomenclature and units

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). All nomenclature and notation should conform as closely as possible to the rules established by IUPAC and IUPAP, as summarized in the following publications: N. Sheppard, H.A. Willis and J.C. Rigg, *Spectrochim. Acta Part A*, 43 (1987) 1; E.R. Cohen and P. Giacomo, *Physica*, 146A (1987) 1-68; I. Mills et al., *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*, Blackwell, Oxford (1988). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

✉ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".
TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.
DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

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

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

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference management software

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

Reference style

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] L. Burgio, P.J. Gibbs, *Spectrochim. Acta A* 57 (2001) 1491-1521.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 10 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more

detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

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

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers. All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

After acceptance

Use of the Digital Object Identifier

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 (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071. When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.