



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE – PPGSHMA**

Camilla Vila Nova Soares Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS
CONTENDO COMPLEXOS DE INCLUSÃO ÁCIDO
DIFRACTÁICO: 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

Vitória de Santo Antão

2011

Camilla Vila Nova Soares Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS
CONTENDO COMPLEXOS DE INCLUSÃO ÁCIDO
DIFRACTÁICO:2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

Vitória de Santo Antão

2011

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

- S586d Silva, Camila Vila Nova Soares
Desenvolvimento de microesferas contendo complexos de inclusão ácido difractáico: 2 - Hidroxipropil - β - ciclodextrina e avaliação da atividade biológica. / Camila Vila Nova Soares Silva. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2011.
[xxxvii], 91 folhas: il; tab.; fig.
- Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV. Saúde Humana e Meio Ambiente, 2011.
- Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.
Co-orientador: Nereide Stela Santos Magalhães.
- Inclui bibliografia e anexos.
1. Ácido difractáico - Atividade biológica. 2. Biotecnologia - Fármacos. 3. Ácidos liquênicos. I. Título. II. Santos, Noemia Pereira da Silva. III. Magalhães, Nereide Stela Santos.

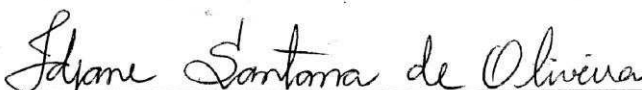
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – Mestrado Acadêmico

CAMILLA VILA NOVA SOARES SILVA

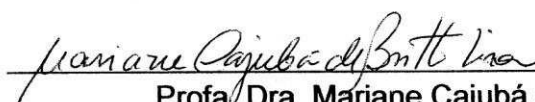
“DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS CONTENDO COMPLEXOS DE INCLUSÃO
ÁCIDO DIFRACTÁICO:2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA”

DISSERTAÇÃO APROVADA em 24 de fevereiro de 2011

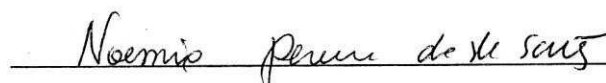
Banca Examinadora



Profa. Dra. Idjané Santana de Oliveira



Profa. Dra. Mariane Cajubá de Brito Lira



Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Dedico aos meus pais, pois exemplo maior de amor não há.

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da vida, aquele que zela por mim e me dá motivação para prosseguir. Sem Ele nada seria possível, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória.

Aos meus pais, Dorací e Luiz Carlos, responsáveis pela formação do meu caráter e de tudo que hoje sou, meu muito obrigada. Palavras não seriam suficientes para expressar minha gratidão.

A toda minha família, em especial aos meus tios Lúcio e Marta, pela torcida, preocupação e por estarem sempre dispostos a me ajudar na caminhada científica.

Ao meu amado noivo Leonardo, meu ombro amigo, e a sua família, por terem me recebido tão bem e por demonstrarem tanto amor e cuidado para comigo.

À Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos, pela oportunidade, confiança, paciência e por seu apoio incondicional durante a realização deste trabalho. És exemplo de profissional dedicada e orientadora em todas as dimensões da palavra.

À Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães, minha co-orientadora, pelos ensinamentos e pela oportunidade de participar do grupo de Sistemas de Liberação Controlada (SLC).

À Milena Ferraz, doutoranda do grupo SLC, pela dedicação, amizade, apoio e colaboração prestada a este trabalho.

À Jéssica Miranda, amiga de longa data, pelo apoio emocional e científico.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA), Débora, Daniel e Felipe, pelo companheirismo, atenção, boas conversas e risadas durante este período.

A todos os colegas de turma do PPGSHMA, pelos momentos de companheirismo dentro e fora da sala de aula.

À Adalva e Ana, responsáveis pela secretaria do PPGSHMA, pela paciência e disposição para ajudar no que fosse necessário.

À Jéssica, aluna de iniciação científica, pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos os colegas do grupo SLC, pela amizade e auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do LIKA/UFPE, pela saudável convivência em laboratório.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), sempre dispostos a ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Neli Kika Honda, por fornecer o ácido difractáico e pela contribuição na interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

À Prof^a. Dr^a. Idjane Santana de Oliveira, pelos valiosos ensinamentos na área de Microbiologia realizados no laboratório de Microbiologia e Imunologia do CAV/UFPE.

Aos técnicos da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE.

À FACEPE, pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

A todos os outros colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Líquens	4
1.3.2 Ácido difractáico	6
1.3.2.1 Generalidades	6
1.3.2.2 Atividades biológicas	6
1.3.3 Ciclodextrinas	8
1.3.3.1 Complexos de inclusão com ciclodextrinas	12
1.3.3.2 Preparação e caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas	14
1.3.3.3 Utilização de ciclodextrinas	16
1.3.4 Tecnologia farmacêutica - Sistemas de liberação controlada	17
1.3.4.1 Sistemas particulados poliméricos	18
1.3.4.2 Micropartículas	20
1.3.4.3 Métodos de preparação de micropartículas	21
1.3.4.4 Caracterização de micropartículas	23
1.3.5 Poli-ϵ-caprolactona (PCL)	25
1.3.5.1 Generalidades	25
1.3.5.2 Microesferas de PCL	26

CAPÍTULO 2	28
Validação de método espectrofotométrico UV para determinação do ácido difractáico de <i>Usnea sp.</i> em microesferas de Poli-ϵ-caprolactona	
2.1 Resumo	29
2.2 Abstract	30
2.3 Introdução	31
2.4 Material e Métodos	32
2.5 Resultados e Discussão	36
2.6 Conclusões	42
2.7 Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO 3	46
Microesferas de Poli-ϵ-caprolactona contendo ácido difractáico e complexos de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina: caracterização e avaliação da citotoxicidade	
3.1 Resumo	47
3.2 Abstract	48
3.3 Introdução	49
3.4 Material e Métodos	51
3.5 Resultados e Discussão	55
3.6 Conclusões	68
3.7 Referências Bibliográficas	69
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	xvii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química do ácido difractáico ($C_{20}H_{22}O_7$) (SANTOS et al., 2004).	6
Figura 1.2	Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007).	9
Figura 1.3	Estruturas moleculares das ciclodextrinas naturais (adaptado de SONG et al., 2009).	9
Figura 1.4	Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (extraído de http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd488/biofarma/biofarm_a1.html).	11
Figura 1.5	Esquema da associação entre ciclodextrina e molécula hóspede: (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2 (adaptado de DEVARAKONDA et al., 2005).	13
Figura 1.6	Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A (A_L , A_P e A_N) e B (B_S e B_I) (adaptado de DEVARAKONDA et al., 2005).	15
Figura 1.7	Comparação do perfil farmacocinético de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada (LIRA, 2007).	18
Figura 1.8	Representação esquemática da classificação das micropartículas: (A) microesfera (sistema matricial) e (B) microcápsula (sistema reservatório) (extraído de http://www.nanoparticles.org/links/Nanosphere.jpg)	20
Figura 1.9	Método de preparação de micropartículas por emulsificação (O/A) e evaporação do solvente: (1) solubilização dos componentes na fase oleosa orgânica, (2) mistura da fase orgânica com a fase contínua contendo emulsificante sob agitação (3) evaporação do solvente (4) separação das micropartículas (adaptado de LI et al., 2008).	22
Figura 1.10	Estrutura molecular da poli- ϵ -caprolactona (PCL) (extraído de http://www.mech.northwestern.edu/medx/web/publications/papers/42.pdf).	25

Figura 2.1	Estrutura química do ácido difractáico ($C_{20}H_{22}O_7$) (Santos et al., 2004).	31
Figura 2.2	Espectro de varredura do ácido difractáico nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em acetonitrila ($\lambda_{\text{máx}}$ 213 nm).	36
Figura 2.3	Curva padrão de ácido difractáico (1 - 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a 213 nm.	37
Figura 2.4	Espectro de varredura de: (a) microesferas de PCL, (b) microesferas de PCL contendo ácido difractáico (3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e (c) ácido difractáico (3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em acetonitrila.	41
Figura 3.1	Estrutura química do ácido difractáico ($C_{20}H_{22}O_7$) (Santos et al., 2004).	50
Figura 3.2	Diagrama de solubilidade de fases do ácido difractáico (AD) e HP β CD a 25°C.	55
Figura 3.3	Espectros de infravermelho para o ácido difractáico (AD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), complexo de inclusão (AD:HP β CD) e mistura física (MF).	57
Figura 3.4	Padrões de difração de raios-X para o complexo de inclusão (AD:HP β CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), mistura física (MF) e o ácido difractáico (AD).	60
Figura 3.5	Cinética de liberação <i>in vitro</i> do AD (■) e do complexo de inclusão AD:HP β CD (●) a partir das microesferas de PCL, em tampão pH 7,4 a 37 °C. Cada ponto representa a média de três diferentes experimentos $\pm$ D.P. As linhas representam o ajuste ao modelo de difusão não linear Fickiano.	64
Figura 3.6	Estudo da ação citotóxica do ácido difractáico (AD), do complexo de inclusão (AD:HP β CD), das microesferas contendo ácido difractáico (MICRO-AD) e das microesferas contendo o complexo de inclusão (MICRO-AD:HP β CD) em diferentes concentrações (6,5; 13; 26 e 52 $\mu\text{g/mL}$) frente a células Vero. *Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao ácido difractáico ($p < 0,05$).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (adaptado de CONNORS, 1997).	10
Tabela 2.1	Dados do teste de linearidade por espectrofotometria para ácido difractáico.	38
Tabela 2.2	Exatidão do ácido difractáico em diferentes níveis de concentrações.	38
Tabela 2.3	Precisão intermediária do método espectrofotométrico para o doseamento do ácido difractáico.	39
Tabela 2.4	Teste <i>t</i> de <i>Student</i> aplicado aos parâmetros analisados para robustez do método de dosagem do ácido difractáico em espectroscopia UV.	40
Tabela 3.1	Sinais de RMN ^1H para o ácido difractáico e complexo de inclusão AD:HP β CD (mudanças observadas nos sinais do AD).	59
Tabela 3.2	Sinais de RMN ^1H para a HP β CD e complexo de inclusão AD:HP β CD (mudanças observadas nos sinais da HP β CD).	59
Tabela 3.3	Eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v) e polidispersão (<i>span</i>) de microesferas de PCL (225 mg) contendo AD em diferentes razões fármaco:polímero.	61
Tabela 3.4	Eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v), polidispersão (<i>span</i>) e potencial zeta (ζ) de microesferas de PCL (225 mg) na razão fármaco:polímero 1:11.	62
Tabela 3.5	Efeito <i>burst</i> (1h) e parâmetros cinéticos de liberação (k_1 e k_2) para microesferas de PCL contendo AD e contendo complexo de inclusão AD:HP β CD.	64

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/menos
°C	Graus Celsius
δ	Letra grega Delta
ε	Letra grega Épsilon
ζ	Letra grega Zeta
<	Menor que

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
A/O	Água/óleo
A/O/A ou W/O/W	Água/óleo/água
AD ou DA	Ácido difractáico
AD:HP β CD ou DA:HP β CD	Ácido difractáico complexado a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
BSA	Albumina de soro bovino
CDs	Ciclodextrinas
CGTase	Ciclodextrina-glicosil-transferase
D.P.	Desvio padrão
DL ₅₀	Dose letal que pode causar a morte de 50% de uma dada população de organismos
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSC	Calorimetria térmica diferencial
d_v	Diâmetro volumétrico médio
g	Grama
h	Hora
HP β CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
i.p.	Intraperitonal
i.v.	Intravenoso
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
IV ou IR	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
kg	Quilograma
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física

mg	Miligrama
MIC	Concentração inibitória mínima
Micro-AD	Microesferas contendo ácido difractáico
Micro-AD: HP β CD	Microesferas contendo complexo de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mV	Milivolt
m/v	Massa/volume
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PGA	Poliácido glicólico
PLA	Poliácido láctico
PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico
RMN ^1H ou ^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de prótons
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
α CD	α -ciclodextrina
β CD	β -ciclodextrina
γ CD	γ -ciclodextrina

RESUMO

O ácido difractáico (AD) é uma substância liquênica isolada de *Usnea sp.* que apresenta diversas atividades biológicas, tais como: analgésica e antipirética, antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antiproliferativa e antimicobacteriana. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar complexos de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e incorporá-los em microesferas de poli- ϵ -caprolactona (PCL), avaliando sua atividade biológica. Os parâmetros de validação linearidade, precisão, exatidão, robustez, especificidade, limites de detecção e quantificação do ácido difractáico foram determinados. Os complexos de inclusão foram preparados por liofilização e caracterizados físico-quimicamente. As microesferas de PCL contendo o ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD foram preparadas através da técnica de emulsão múltipla a/o/a com evaporação do solvente e sua citotoxicidade frente a células Vero foi avaliada. No desenvolvimento do método espectrofotométrico, a faixa de linearidade foi de 1 a 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, a equação de regressão: Absorbância = $0,1541 \times [\text{AD}] (\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}) + 0,0053$ e $r = 0,99998$. Não foi evidenciada diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$). A exatidão revelou média percentual de recuperação do ácido difractáico nas microesferas de 98,31%, o método mostrou-se robusto. Limites de detecção e quantificação foram de 0,03 e 0,08 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O diagrama de solubilidade de fases de AD:HP β CD apresentou uma curva do tipo A_L , com $K_{1:1} = 821 \text{ M}^{-1}$. Na presença de 50 mM de HP β CD, a solubilidade do AD aumentou mais de 35 vezes. O complexo de inclusão AD:HP β CD apresentou modificações no IV, RMN ^1H e difração de raios-X, em comparação com os espectros do AD e de HP β CD. As microesferas de PCL apresentaram diâmetro de $5,89 \pm 1,33 \mu\text{m}$ e potencial zeta de $-12,68 \pm 0,56 \text{ mV}$, microesferas contendo ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD apresentaram diâmetro de $5,23 \pm 1,65 \mu\text{m}$ e $4,11 \pm 1,39 \mu\text{m}$, com potencial zeta de $-7,85 \pm 0,32 \text{ mV}$ e $-6,93 \pm 0,46 \text{ mV}$, respectivamente. Microesferas contendo complexos AD:HP β CD apresentaram um perfil de liberação mais prolongada de ácido difractáico durante a cinética de liberação *in vitro* quando comparadas às microesferas com o fármaco livre. Microesferas contendo o ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD reduziram a citotoxicidade do composto frente a células Vero. A complexação do ácido difractáico a ciclodextrina, e sua incorporação em sistemas de liberação controlada, como microesferas, proporcionou uma melhoria na estabilidade e hidrossolubilidade do composto, reduzindo os efeitos tóxicos.

Palavras-chave: ácido difractáico; método espectrofotométrico UV; 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; microesferas; PCL.

ABSTRACT

DiffRACTAIC acid (DA) is a lichen compound from *Usnea sp.* that presents important biological activities such as analgesic and antipyretic, antitumor, antiviral, antibacterial, antifungal, antiproliferative and antimycobacterial. The aim of this study was to develop and characterize diffRACTAIC acid:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes (DA:HP β CD) and incorporate them into microspheres of poly- ϵ -caprolactone (PCL), evaluating their biological activity. Validation parameters such as linearity, precision, accuracy, robustness, specificity, limits of detection and quantification were determined. The inclusion complexes were prepared by freeze-drying technique and physico-chemically characterized. PCL microspheres containing diffRACTAIC acid or inclusion complex DA:HP β CD were prepared by the double w/o/w emulsion-solvent evaporation method and its cytotoxicity against Vero cells was evaluated. The validated spectrophotometric method presented a linearity range from 1 to 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, and regression equation: Absorbance = $0.1541 \times [\text{AD}] (\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}) + 0.0053$, with $r = 0.99998$. There was no significant difference between means ($p < 0.05$). The accuracy revealed a mean percentage recovery of diffRACTAIC acid in microspheres of 98.31%. The method proved to be robust with limits of detection and quantification of 0.03 and 0.08 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectively. The phase-solubility diagram of DA:HP β CD showed an A_L curve with $K_{1:1} = 821 \text{ M}^{-1}$. The presence of 50 mmol of HP β CD, the solubility of DA increased more than 35-fold. The inclusion complex DA:HP β CD presented changes in IR, ^1H NMR and X-ray diffraction when compared with DA and HP β CD spectra. Unloaded PCL microspheres presented a diameter of $5.89 \pm 1.33 \mu\text{m}$ and zeta potential of $-12.68 \pm 0.56 \text{ mV}$, and microspheres containing diffRACTAIC acid or inclusion complex DA:HP β CD presented a diameter of $5.23 \pm 1.65 \mu\text{m}$ and $4.11 \pm 1.39 \mu\text{m}$ with zeta potential values of $-7.85 \pm 0.32 \text{ mV}$ and $-6.93 \pm 0.46 \text{ mV}$, respectively. Microspheres containing DA:HP β CD presented a more prolonged release profile of diffRACTAIC acid during *in vitro* kinetics when compared to microspheres with the free drug. The encapsulation of DA or DA:HP β CD in microspheres reduced the compound cytotoxicity against Vero cells. The complexation of diffRACTAIC acid to cyclodextrin, and their incorporation into drug delivery systems as microspheres provided an improvement on stability and water solubility of this compound, reducing its toxic effects.

Keywords: diffRACTAIC acid; UV spectrophotometric method; 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin; microspheres; PCL.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Apesar dos recentes avanços em modelos de fármacos, a síntese química e a biotecnologia promoverem o desenvolvimento de fármacos novos e potentes, os produtos naturais como plantas e líquens continuam sendo a maior fonte para obtenção de medicamentos para diversos fins. Atualmente, há uma diversidade de compostos naturais bioativos com potencial atividade farmacológica, muitos deles com atividade já comprovada (GARROS et al., 2006; RIBAS et al., 2006; SEGUNDO et al., 2007).

Os líquens, seres resultantes da associação entre fungos e algas, são umas das mais importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos, os quais derivam de seu metabolismo primário e secundário. A eficiência e a possibilidade de utilização econômica das substâncias liquênicas tornam esses organismos de particular interesse à pesquisa fundamental, em face de sua utilização na medicina popular desde a antiguidade (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999). Dos diversos metabólitos secundários produzidos pelos líquens, um depsídeo tipo orcinol isolado de *Usnea sp.*, o ácido difractáico, tem sido relatado com diversas propriedades biológicas, tais como: analgésica e antipirética (OKUYAMA et al., 1995), antiviral (NEAMATI et al., 1997), antitumoral (YAMAMOTO et al., 1995), antimicrobiana (FALCÃO et al., 2004; PIOVANO et al., 2002), antifúngica (PIOVANO et al., 2002), atividade antiproliferativa (KUMAR; MÜLLER, 1999a; KUMAR; MÜLLER, 1999b), gastroprotetora (BAYIR et al., 2006) e antimicobacteriana (HONDA et al., 2010).

Mesmo com variadas atividades, compostos liquênicos apresentam restrita aplicação terapêutica devido a suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade, toxicidade e difícil interação com as barreiras biológicas. Desta forma, a utilização terapêutica destes compostos em forma farmacêutica convencional torna-se muitas vezes inviável, sendo necessárias novas formas farmacêuticas para modificar as características físico-químicas, minimizar os efeitos tóxicos e melhorar sua biodisponibilidade (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2005; SANTOS et al., 2006).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos conhecidos por sua habilidade de incorporar moléculas apolares, ou parte delas, dentro de sua cavidade hidrofóbica, constituindo um complexo de inclusão. A complexação de fármacos com CDs proporciona uma melhoria na estabilidade, maior hidrossolubilidade, maior biodisponibilidade e diminuição de efeitos indesejáveis de vários compostos. Devido a isso, as ciclodextrinas são largamente utilizadas em diversas áreas tecnológicas como a farmacêutica, têxtil e alimentícia, e em processos de separação, fermentação e catalíticos, dentre outros (DEL VALLE, 2004; DEVARAKONDA et al., 2005).

A tecnologia de liberação controlada de fármacos permite o aumento da eficiência terapêutica através do controle da velocidade de liberação do fármaco ou ainda pelo seu melhor direcionamento ao sítio de ação, oferecendo várias vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais (BRANNON-PEPPAS, 1995).

Desta forma, os sistemas particulados poliméricos, como as microesferas, trazem perspectivas científicas promissoras, uma vez que apresentam estabilidade físico-química e biológica, já sendo utilizados para a encapsulação de várias substâncias, tais como: proteínas (BENOIT et al. 1999), antígenos (FLORINDO et al., 2008) e fármacos, como vancomicina (LE RAY et al., 2003; PETITTI et al., 2009), rifampicina (DOAN; OLIVIER, 2009) e praziquantel (CHENG et al., 2009). Na obtenção desses sistemas, polímeros sintéticos biodegradáveis são utilizados, com destaque para os poliésteres poli- ϵ -caprolactona (PCL), poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA) e o copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008; LECAROS et al., 2006; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000).

A encapsulação do ácido difractáico complexado a ciclodextrinas em microesferas poderia consistir em uma estratégia para a utilização desta substância liquênica como agente terapêutico, visando superar as limitações relacionadas à solubilidade bem como biodisponibilidade do fármaco, promovendo diminuição de seus efeitos indesejáveis e garantindo maior segurança e eficácia terapêutica.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar biologicamente complexos de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina incorporados em microesferas de PCL.

1.2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico por espectrofotometria UV para determinação do ácido difractáico em microesferas de PCL;
- Obter compostos de inclusão formados por ácido difractáico e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- Caracterizar os compostos de inclusão obtidos através de métodos físico-químicos;
- Preparar microesferas de PCL contendo ácido difractáico ou contendo o complexo de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- Caracterizar físico-quimicamente as microesferas com a avaliação da eficiência de encapsulação, índice de polidispersão e carga de superfície (potencial zeta);
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* das microesferas de PCL contendo ácido difractáico ou complexo de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos de inclusão e microesferas obtidos frente a células Vero.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Líquens

Líquens são definidos como uniões morfológicas e fisiológicas de um fungo, que pode ser um ascomiceto ou basidiomiceto, e uma ou mais algas verdes ou cianobactérias, formando um organismo simbiótico. O fungo, também chamado de micobionte, fornece proteção física, água e soluções minerais aquosas; enquanto as algas ou cianobactérias, também chamadas de fotobiontes, fornecem substâncias orgânicas através da fotossíntese (COCCHIETTO et al., 2002; SÜLEYMAN et al., 2003).

A morfologia dos líquens pode diferir perceptivelmente, de crostosos crescendo em rochas a líquens folhosos e fruticosos crescendo no solo, troncos de árvores ou outros substratos. Calcula-se que existam cerca de 17.000 espécies conhecidas, com dezenas de novas espécies sendo descobertas a cada ano (COCCHIETTO et al., 2002). Possuem uma tolerância ecológica muito ampla, e devido a isso podem ser encontrados praticamente em todos os lugares do globo terrestre (SÜLEYMAN et al., 2003). Localizam-se desde o nível do mar até grandes altitudes, contudo, são relativamente raros em altitudes acima de 5.000 m e em matas demasiadamente escuras. Estão presentes também em desertos, onde a temperatura é bastante variável, e em regiões polares, de temperaturas extremamente baixas (HONDA; VILEGAS, 1998).

A resistência dos líquens está relacionada em grande parte aos seguintes fatores: metabolismo lento, capacidade de sobreviver em metabolismo basal durante meses, e produção de diversas moléculas bioativas que oferecem proteção química (COCCHIETTO et al., 2002). De acordo com Huneck e Yoshimura (1996), o papel dessas substâncias ainda não é bem entendido, mas inclui: proteção contra uma vasta quantidade de parasitas virais, bacterianos e protozoários; contra predadores animais, como insetos, nematóides e contra plantas competidoras; defesa contra fatores de estresse ambiental como raios ultravioleta e períodos de seca extrema; regulação fisiológica do metabolismo do líquen, como a habilidade de aumentar a permeabilidade da parede celular da alga para aumentar o fluxo de nutrientes para o componente fúngico.

As substâncias químicas produzidas pelos líquens são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos intracelulares

incluem proteínas, aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas, e estão ligados à parede celular e ao protoplasto. Já os extracelulares, frequentemente chamados metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex dos líquens, raramente em ambas as camadas. Classificam-se em grupos químicos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácido úsnico (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999).

Aproximadamente 630 compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens são conhecidos (HONDA; VILEGAS, 1998), e a síntese destes metabólitos fez com que os líquens fossem utilizados durante muito tempo na medicina popular de vários países. No antigo Egito, extratos liquênicos eram utilizados no tratamento de feridas cutâneas (MÜLLER, 2001); as comunidades indígenas dos Andes venezuelanos os utilizavam como agentes antimicrobianos (CHOUDHARY et al., 2005); na Europa, os líquens *Cetraria islandica*, *Lobaria pulmonaria* e *Cladonia* eram utilizados para o tratamento da tuberculose (GUPTA et al., 2007). O uso medicinal dos líquens inclui ainda o tratamento para febre, epilepsia, tosse, raiva, gota, hepatite, irritações da garganta, asma e patologias gastrointestinais, tais como gastrite (CHOUDHARY et al., 2005; SÜLEYMAN et al., 2003).

As primeiras publicações científicas acerca dos líquens surgiram após o final da II Guerra Mundial (COCCHIETTO et al., 2002). A partir de então, verificou-se que as substâncias oriundas do metabolismo secundário dos líquens apresentam importantes atividades biológicas como antimicrobiana (majoritariamente contra bactérias Gram positivas) e antiherbívora (PERRY et al., 1999), antiproliferativa, antitumoral, analgésica (COCCHIETTO et al., 2002; MÜLLER, 2001), antiviral (incluindo a inibição da replicação do vírus HIV), ação hipotensiva, anti-inflamatória, bem como efeitos espasmolíticos (MAIA et al., 2002).

Das substâncias ativas de origem liquênica, o ácido úsnico é o mais extensivamente estudado (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). No entanto, muitos outros compostos vêm ganhando destaque graças ao potencial que apresentam para o uso farmacêutico, como a atranorina, o ácido barbático, o ácido lobárico, o ácido fumarprotocetrárico, o ácido difractáico, dentre outros (MÜLLER, 2001).

1.3.2 Ácido difractáico

1.3.2.1 Generalidades

O ácido difractáico é um depsídeo tipo orcinol, isolado de *Usnea sp.* Caracteriza-se como um composto formado pela condensação de dois ou mais ácidos hidroxibenzóicos, um grupo carboxila esterificado com o grupo hidroxila fenólico como uma molécula secundária. Caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação esbranquiçada, com cristais em forma de agulhas, ponto de fusão em torno de 189-190 °C, massa molecular de 374 g/mol, de fácil dissolução em éter, etanol, acetona e clorofórmio (Figura 1.1) (HUNECK; YOSHIMURA, 1996).

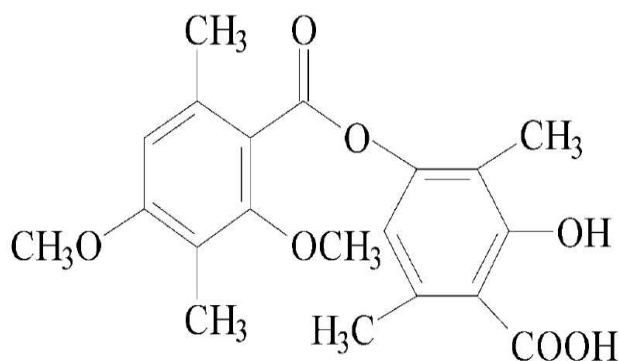


Figura 1.1 Estrutura química do ácido difractáico (C₂₀H₂₂O₇) (SANTOS et al., 2004).

1.3.2.2 Atividades biológicas

O ácido difractáico ainda não foi profundamente estudado, no entanto, já possui algumas de suas propriedades biológicas relatadas. Um dos registros disponíveis na literatura trata da atividade analgésica e antipirética, descrita por Okuyama e colaboradores (1995). Na investigação da atividade analgésica, verificou-se que o ácido difractáico inibiu em 47% a contorção induzida por ácido acético em camundongos através de administração oral de 200 mg/kg. Com relação à atividade antipirética, o ácido difractáico causou efeito hipotérmico também na dose de 200 mg/kg (OKUYAMA et al., 1995).

Estudos comprovaram ainda que depsídeos tipo orcinol demonstraram inibir a monoamino oxidase B (MAO-B), enzima responsável pela desaminação depressiva na doença de Parkinson (WILSON et al., 1998), tendo sido ainda relatado com atividade

antitumoral (YAMAMOTO et al., 1995). Neamati e colaboradores (1997) relataram a atividade antiviral do ácido difractáico, descrevendo que dezessete compostos liquênicos foram examinados para atividade inibitória contra a integrase HIV1, e entre eles, o ácido difractáico apresentou atividade moderada, com IC₅₀ abaixo de 50 µM.

A atividade antiproliferativa do ácido difractáico também foi descrita. Em estudo realizado com a linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT, verificou-se que o ácido difractáico demonstrou ser um potente agente antiproliferativo, inibindo o crescimento celular com o valor de IC₅₀ de 2.6 µM (KUMAR; MÜLLER, 1999^a; KUMAR; MÜLLER, 1999^b).

Piovano e colaboradores (2002) testaram as atividades antifúngica e antimicrobiana para o ácido difractáico pelo método de difusão em disco de papel. Os resultados de MIC (concentração mínima inibitória) em µg/ml do ácido difractáico para *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Microsporum canis* C112, *M. gypseum* C115, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC9972, *T. rubrum* C113 e *Epidermophyton floccosum* C114 foram, respectivamente: >250, >250, >250, 250, >250, >250, 50, <50, 50 e <50, demonstrando assim uma atividade moderada, mas significativa, contra *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum*; todos eles fungos dermatófitos causadores de infecções dérmicas. Quanto à atividade antimicrobiana, o composto apresentou MIC de 50 µg/ml para *Staphylococcus aureus*, com halo de inibição de 13 mm de diâmetro. Falcão e colaboradores (2004) descreveram a formação de halo de 9,3 mm de diâmetro para *Bacillus subtilis* e de 7,7 mm para *S. aureus* quando do estudo do ácido difractáico derivado do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron.

Santos e colaboradores (2004) testaram a atividade de dez compostos isolados de líquens brasileiros sobre a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em cultura de células de macrófagos do peritônio de camundongos. Dentre eles, o ácido difractáico induziu a liberação de óxido nítrico, presente em variadas condições patológicas, como doenças alérgicas das vias aéreas, artrite, vasculite e síndrome do choque tóxico; indicando assim uma provável capacidade deste composto de modular as atividades do sistema imunológico.

Recentes estudos indicam que o ácido difractáico isolado de *Usnea longissima* apresenta atividade gastroprotetora, através do tratamento da úlcera gástrica em ratos induzida pela indometacina. As lesões gástricas foram significativamente reduzidas por todas as doses utilizadas de ácido difractáico (25, 50, 100 e 200 mg/kg de peso corporal), quando comparado com o grupo tratado com ranitidina (fármaco referência) (BAYIR et al., 2006). No entanto, a dose de 200 mg/kg de ácido difractáico apresentou maior inibição ulcerativa (96,7%). Ainda foi descrito que a administração de ácido difractáico diminuiu a

atividade da mieloperoxidase quando comparado com a indometacina, indicando um efeito inibitório na infiltração neutrofílica nos tecidos da mucosa gástrica. Esses resultados sugerem que a ação gastroprotetora do ácido difractáico pode ser atribuída ao seu efeito redutor contra o dano oxidativo, assim como a redução dos efeitos de infiltração neutrofílica observado em estômago de ratos (BAYIR et al., 2006).

Pesquisas realizadas mais recentemente por Honda e colaboradores (2010) demonstraram que o ácido difractáico apresentou atividade antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, sendo considerado o mais ativo dos 26 compostos liquênicos utilizados no estudo, apresentando o valor de MIC de 15.6 µg/ml (41.6 µM), seguido pelo ácido norstíctico (MIC 62.5 µg/ml, 168 µM) e pelo ácido úsnico (MIC 62.5 µg/ml, 182 µM). Os ácidos hipostíctico (MIC 94.0 µg/ml, 251 µM) e o protocetrárico (MIC 125 µg/ml, 334 µM) demonstraram atividade inibitória moderada. Os outros compostos exibiram uma baixa atividade inibitória no crescimento de *M. tuberculosis*, com os valores de MIC variando de 250 a 1370 µM.

1.3.3 Ciclodextrinas

A fermentação enzimática de alguns carboidratos, como celulose, amido e sacarose, é capaz de produzir uma mistura de monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos, resultando assim em dextrinas lineares e cíclicas, sendo as últimas também conhecidas como ciclodextrinas (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que possuem estrutura rígida e são formados por unidades de glicopirranose unidas por ligações α (1-4). Têm a forma de um cone truncado, onde os grupos OH secundários ligados aos carbonos C-2 e C-3 ocupam a base de maior diâmetro do tronco, enquanto as hidroxilas primárias ligadas ao carbono C-6 localizam-se na base menor do tronco (Figura 1.2) (CHALLA et al., 2005). A formação de uma cavidade central hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica nas ciclodextrinas é favorecida pela disposição espacial dos grupamentos químicos, permitindo, desta forma, o processo de complexação molecular. Geralmente, substâncias químicas de baixa polaridade podem alojar-se no interior da cavidade das CDs formando complexos de inclusão dinâmicos em solução (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

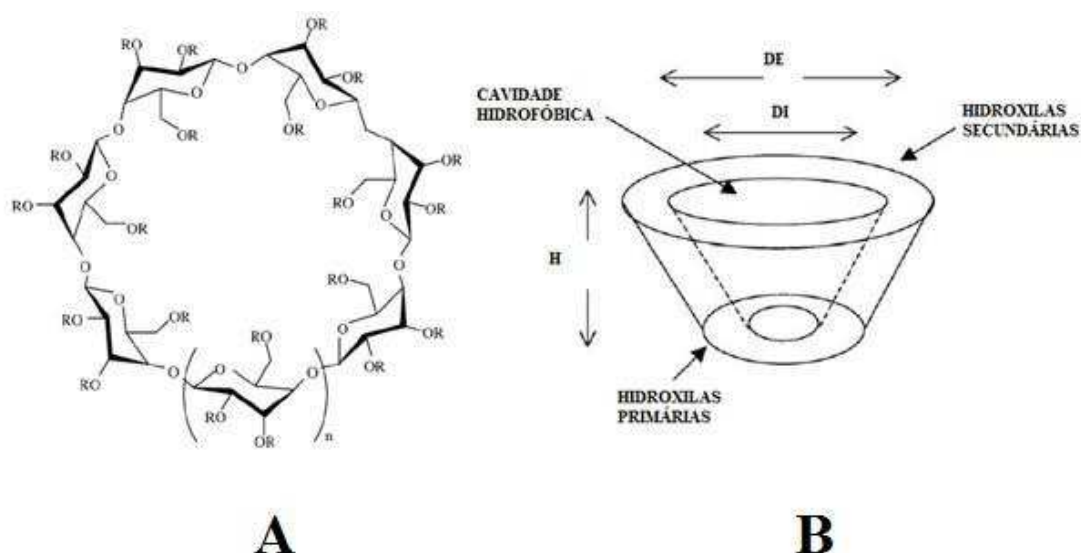


Figura 1.2 Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

As ciclodextrinas são conhecidas há mais de 100 anos: em 1891 foram produzidas pela primeira vez por Villiers através da digestão do amido pelo *Bacillus amylobacter*, e em 1903, Schardinger demonstrou a estrutura cíclica das ciclodextrinas (SINGH et al., 2001). Também são conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses e Schardinger dextrinas (DEL VALLE, 2004). Podem ser classificadas de acordo com o número de unidades de glicopirranose, sendo α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, as quais contêm respectivamente seis, sete e oito unidades glicosídicas (Figura 1.3) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

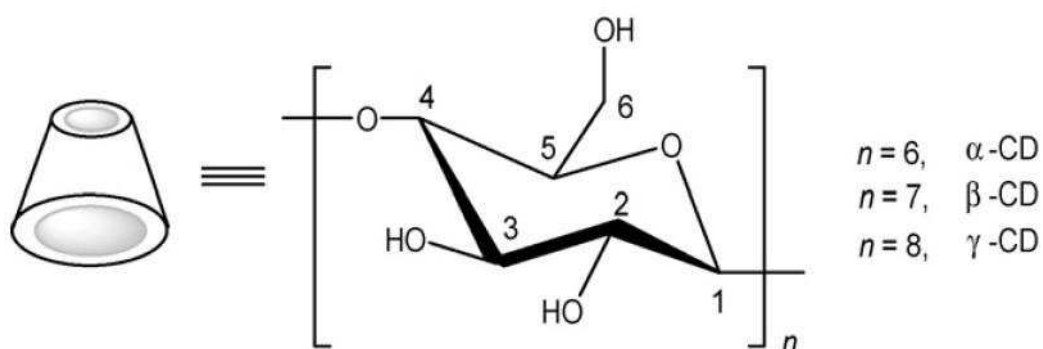


Figura 1.3 Estruturas moleculares das ciclodextrinas naturais (adaptado de SONG et al., 2009).

A ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), um exemplo de amilase, tem a capacidade de abrir a cadeia de um polissacarídeo e ligar as extremidades de cada fragmento formando ciclodextrinas. O tratamento do amido com amilase do *Bacillus macerans* (com CGTase) é capaz de produzir uma mistura de α -ciclodextrina (60%), β -ciclodextrina (20%) e γ -ciclodextrina (20%), juntamente com pequenas quantidades de ciclodextrinas com mais de oito unidades de glicose. Inovações biotecnológicas com diferentes tipos de enzimas CGTase tornaram possível a produção mais específica e com maior grau de pureza das α -, β - e γ -ciclodextrinas, permitindo o uso destas como excipientes farmacêuticos (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

As CDs apresentam diferentes propriedades, como tamanho de cavidade, reatividade, solubilidade, capacidade de complexação e efeito na estabilidade química das moléculas hóspedes (Tabela 1.1) (CONNORS, 1997). Dentre as ciclodextrinas naturais, a β CD é a mais utilizada por ter baixo custo e possuir afinidade com muitas moléculas hidrofóbicas. No entanto, a sua menor solubilidade em água limita o seu uso (Tabela 1.1). Esse fato se deve a ligação relativamente forte de suas moléculas em estado sólido associada à diminuição da habilidade de formação de ligações de hidrogênio com a água (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Tabela 1.1 Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (adaptado de CONNORS, 1997).

Propriedade	Ciclodextrina		
	A	B	γ
n° de unidades de glicose	6	7	8
Fórmula empírica	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Peso molecular	972,85	1134,99	1297,14
Largura da cavidade (Å)	8	8	8
Diâmetro da cavidade (Å-aprox)	~ 5,2	~ 6,6	~ 8,4
Solubilidade (água, 25°C) mol L ⁻¹	0,1211	0,0163	0,168

Quando necessário o uso de CDs como aditivos farmacêuticos, é importante considerar como pode ser diminuída a quantidade de ciclodextrina utilizada. Isso é possível com o aumento da eficiência de complexação, com o aumento da solubilidade da molécula hospedeira no meio aquoso de complexação através de processos de ionização, formação

de sal ou de complexos metálicos ou ainda pela adição de co-solventes orgânicos como o etanol (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; DUCHÊNE et al., 1999).

Diversos derivados semi-sintéticos de ciclodextrinas têm sido produzidos com o objetivo de otimizar a solubilidade e estabilidade de ciclodextrinas primárias. Evidenciou-se que a substituição de qualquer um dos grupos hidroxilas por grupamentos hidrofóbicos resulta em um aumento significativo da solubilidade aquosa. Outros tipos de modificações estruturais como aminação, esterificação das hidroxilas primárias e secundárias também podem ser realizadas (CALABRÒ et al., 2004; DAVIS; BREWSTER, 2004; DEL VALLE, 2004; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

A 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (Figura 1.4) é um derivado obtido pelo tratamento de uma solução de β CD com propilenoóxido, resultando em uma mistura de isômeros devido à substituição randômica dos grupamentos hidroxílicos (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

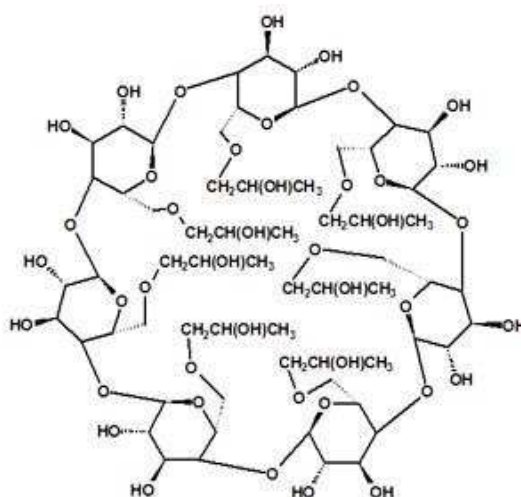


Figura 1.4 Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (extraído de <http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd488/biofarma/biofarma1.html>).

Estatisticamente, há cerca de 130.000 possibilidades de formação de derivados de HP β CD, dentre eles, inúmeros isômeros geométricos e ópticos podem ser produzidos quando os grupamentos hidroxílicos são inseridos em centros ópticos das moléculas. Derivados menos polares (metoxilados, aminados ou esterificados), completamente substituídos apresentam uma menor solubilidade aquosa, devido à drástica redução de possibilidade de formação de isomerização. A habilidade dos derivados de ciclodextrina em formar complexos solúveis em água também depende do grau de substituição da

ciclodextrina, que pode ser modificado objetivando-se preservar as propriedades de solubilização. O grau de substituição da HP β CD de uso farmacêutico é de aproximadamente 0,65 (que significa que em média existem 0,65 de grupamentos hidroxipropil por unidade de glicose) (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Comparativamente, comprovou-se que a HP β CD apresenta maior solubilidade aquosa, maior potencial de complexação e menores restrições toxicológicas e biológicas em relação aos dados obtidos com a β CD (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; GOULD; SCOTT, 2005). Especificamente, a HP β CD é bem tolerada em organismo humano, onde após a administração oral é metabolizada por bactérias do cólon, sendo uma parte excretada de forma intacta (cerca de 60%) e outra parte como metabólitos (cerca de 40%) (DAVIS; BREWSTER, 2004). Estudos farmacocinéticos em ratos demonstraram que HP β CD apresenta $t_{1/2}$ de 20 min (i.v.), é excretada de forma intacta na urina em aproximadamente 90%, a absorção oral é menor ou igual a 3%, DL₅₀ de 10 g/Kg (i.v.) e maior que 2 g/Kg (v.o.), e as doses máximas em produtos do mercado são de 16.000 mg/dia (i.v.) e de 8.000 mg/dia (v.o.) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

1.3.3.1 Complexos de inclusão com ciclodextrinas

Devido à habilidade de interagirem com fármacos hidrofóbicos otimizando a sua solubilidade aquosa, as ciclodextrinas tem sido alvo do interesse farmacêutico. Os mecanismos envolvidos podem estar vinculados à formação de complexos de inclusão, de complexos de não-inclusão, de agregados e de soluções de fármacos supersaturadas estáveis. Muitas propriedades do fármaco podem ser melhoradas com a formação de complexos com ciclodextrinas. Dentre estas, solubilidade, taxa de dissolução, biodisponibilidade oral de fármacos de Classe II e IV (conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutico BCS), eficiência de encapsulação e perfil de liberação em sistemas de liberação controlada, e problemas associados à toxicidade e à irritação local (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Os complexos de inclusão têm sido amplamente estudados porque promovem, principalmente, o aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água; ademais, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do princípio ativo. Na formação de complexos com ciclodextrina é necessário que a molécula hóspede, ou parte da molécula, entre em contato com a cavidade da ciclodextrina para que seja formada uma associação

estável. Uma variedade de forças não-covalentes, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, são responsáveis pela formação do complexo, não ocorrendo interações fortes como ligações covalentes (DEVARAKONDA et al., 2005).

A estabilidade do complexo de inclusão formado é avaliada pela constante de estabilidade (K_c), também conhecida como constante de dissociação (K_d). Podem ser formados complexos de inclusão múltiplos e de não-inclusão de diferentes razões molares fármaco:ciclodextrina (1:1, 1:2, 1:3, 2:1). A maioria dos métodos utilizados para a determinação da K_c baseia-se na medida de uma propriedade física ou química da molécula hóspede com a ciclodextrina e determinada em função da concentração. O comportamento observado (função linear, quadrática ou cúbica) é indicativo da estequiometria do complexo formado entre o fármaco e a ciclodextrina (1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON et al., 2005).

Na formação de um complexo de inclusão 1:1 (mol/mol) (Figura 1.5), é necessário que a molécula hóspede ou parte dela, associe-se em um equilíbrio dinâmico com a cavidade da ciclodextrina e estabeleça ligações de caráter não-covalente, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Devido à natureza destas ligações, o complexo de inclusão fármaco:ciclodextrina está continuamente sendo formado e dissociado (DEL VALLE, 2004; LOFTSSON et al., 2005).

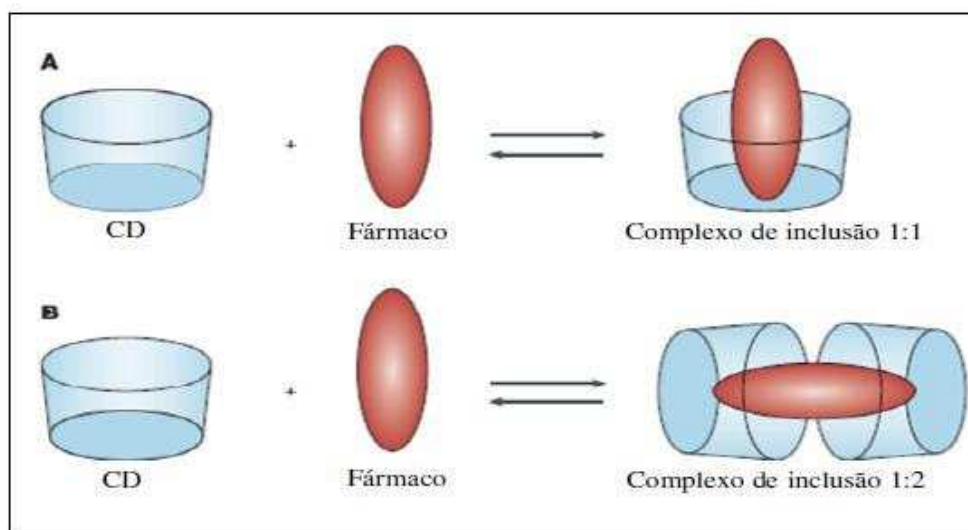


Figura 1.5 Esquema da associação entre ciclodextrina e molécula hóspede: (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2 (adaptado de DEVARAKONDA et al., 2005).

A habilidade de diferentes ciclodextrinas em solubilizar um determinado fármaco pode ser avaliada pela comparação de suas constantes de estabilidade (K_c). Para complexos 1:1, o valor da constante de associação, $K_{1:1}$, está frequentemente entre 50 e 2000 M^{-1} , com valores médios de 130, 490 e 350 M^{-1} para α CD, β CD e γ CD, respectivamente (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

1.3.3.2 Preparação e caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas

Para a escolha do método de preparação de complexos de inclusão, diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como baixo custo, simplicidade do método, rapidez, rendimento elevado e facilidade de transposição de escala, visto que o método de preparação exerce grande influência na qualidade do complexo final obtido (MURA et al., 1999). Cada composto a ser complexado é um caso particular por possuir características específicas e, devido a isso, as condições ideais podem variar de acordo com as características tanto do composto utilizado quanto da ciclodextrina (MURA et al., 1999).

Os métodos de preparação de complexos de inclusão mais utilizados são: mistura física, pasta, co-evaporação, co-precipitação, *spray-drying* e *freeze-drying* (DEVARAKONDA et al., 2005; ZINGONE; RUBESSA, 2005). Este último tem como vantagem a possibilidade de ser utilizado em escala laboratorial e também em escala industrial. Para a obtenção de complexos de inclusão através deste método, a ciclodextrina é completamente solubilizada em água e posteriormente o fármaco é adicionado à solução de ciclodextrina. A mistura permanece sob agitação constante durante um período de tempo pré-determinado, sendo congelada em seguida e submetida à liofilização (TEIXEIRA et al., 2003; ZINGONE; RUBESSA, 2005).

Estudos experimentais e teóricos são realizados para caracterizar complexos de inclusão de moléculas com ciclodextrinas, dentre eles destacam-se: difração de raios-X (XRD), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 (RMN 1H e ^{13}C) unidimensionais e bidimensionais (com efeito nuclear overhauser - NOESY), infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), estudos de dissolução, de modelagem molecular e estudo de solubilidade de fases (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; DE SOUSA et al., 2008).

Na caracterização por RMN, o consenso estabelecido na literatura é que o complexo de inclusão é formado quando ocorrem mudanças nos deslocamentos químicos dos

hidrogênios do interior da cavidade da ciclodextrina (3-H e/ou 5-H), sendo estes maiores do que os deslocamentos químicos correspondentes aos localizados no exterior da sua cavidade (2-H e/ou 4-H). Contudo, estudos demonstram que mesmo que a molécula hóspede esteja interagindo com o exterior da cavidade da ciclodextrina, mudanças nas propriedades espectroscópicas da ciclodextrina e físicas das moléculas podem acontecer. Com base nisto, foi proposta a definição de interação por encapsulação para estes casos em que a molécula hospedeira interage com a ciclodextrina sem envolver necessariamente o fenômeno de complexação por inclusão (SONG et al., 2009).

Higuchi e Connors foram os primeiros a descrever o estudo de solubilidade de fases, no ano de 1965. Experimentalmente, um excesso do fármaco hidrofóbico é adicionado a um volume constante de diferentes soluções aquosas de ciclodextrina em concentrações crescentes. As amostras são agitadas a uma temperatura constante até que o equilíbrio seja atingido, e a concentração do fármaco é determinada por técnicas analíticas como espectroscopia UV-Vis ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Em seguida, um diagrama de solubilidade de fases é construído, podendo ser produzidas curvas do tipo A (que indicam a formação de complexos de inclusão solúveis com razão estequiométrica molar de 1:1 fármaco:ciclodextrina) ou B (que sugerem a formação de complexos de inclusão com pobre solubilidade). As curvas do tipo A são subdivididas em A_L (aumento linear da solubilidade do fármaco como uma função da concentração da ciclodextrina), A_P (desvio isotérmico positivo), e A_N (desvio isotérmico negativo) e as curvas do tipo B, em B_S (curva que denota complexos de limitada solubilidade) e B_I (curva que indica complexos insolúveis) (Figura 1.6) (CHALLA et al., 2005).

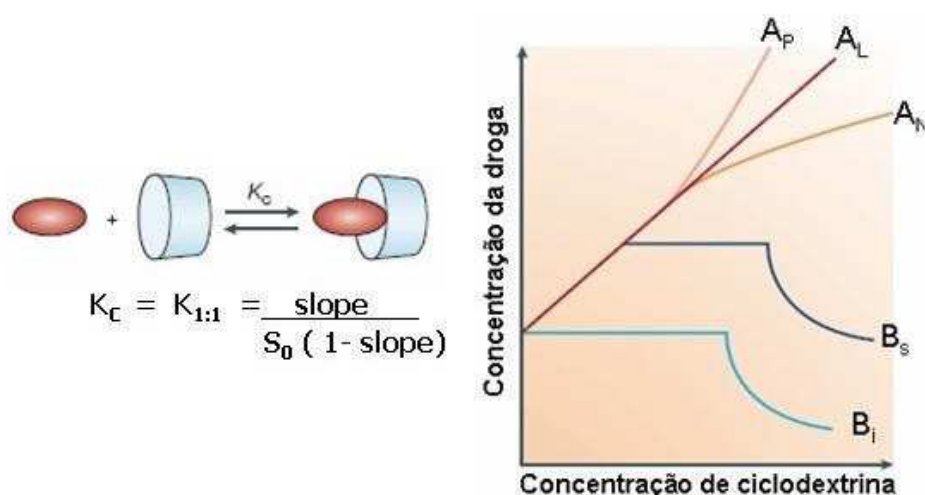


Figura 1.6 Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A (A_L , A_P e A_N) e B (B_S e B_I) (adaptado de DEVARAKONDA et al., 2005).

O diagrama de solubilidade de fases é obtido pela relação entre a concentração molar do fármaco e a concentração molar da ciclodextrina. A HP β CD, por exemplo, comumente forma complexos de inclusão solúveis, sendo produzidas, portanto, curvas do tipo A (CHALLA et al., 2005). Neste caso, como são formados complexos de inclusão 1:1, é possível calcular a constante de estabilidade a partir da porção linear da curva de solubilidade de fases utilizando a equação presente na Figura 1.6, em que “Slope” é a inclinação da reta e S_0 é a solubilidade intrínseca do composto, que pode ser assumida como igual ao valor do Y-intercepto da curva linear (CHALLA et al., 2005). No entanto, em decorrência da formação de interações hidrofóbicas, da presença de complexos múltiplos, bem como de condições não-ideais de saturação das soluções do fármaco, o valor de S_0 é frequentemente diferente do sugerido pelo Y-intercepto. Desta forma, a melhor maneira de comparar os efeitos solubilizantes das CDs é comparar suas eficiências de complexação (EC) (um parâmetro calculado sem levar em consideração a solubilidade intrínseca) pela utilização da seguinte equação: $EC = S_0 K_{1:1} = [D/CD]/[CD] = \text{Slope}/1 - \text{Slope}$, onde $[D/CD]$ é a concentração do complexo dissolvido; $[CD]$, a concentração de ciclodextrina livre dissolvida; e Slope é a inclinação do diagrama de solubilidade de fases (LOFTSSON et al., 2005).

1.3.3.3 Utilização de ciclodextrinas

Devido a sua capacidade de formar complexos de inclusão com diversos compostos, as ciclodextrinas vêm sendo amplamente utilizadas, principalmente pela indústria farmacêutica. Pesquisadores descreveram a utilização da HP β CD no aumento da solubilidade de produtos de origem natural, em particular, substâncias liquênicas, como o ácido úsnico (LIRA et al., 2009), o ácido fumarprotocetrárico e a atranorina, como compostos padrão de baixa solubilidade em água. Testaram ainda o efeito destes complexos em três tipos de linhagem celulares humanas malignas: T-47D (mama), Panc-1 (pâncreas) e PC-3 (próstata) e observaram que estas substâncias complexadas demonstraram atividade contra todos os tipos de linhagens celulares, além de promover aumento de quase 300 vezes em sua solubilidade (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2005; KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2002).

Há na literatura complexos de ciclodextrina com diversos fármacos incluindo, por exemplo, o carvedilol (HIRLEKAR; KADAM, 2009), a azitromicina (PASQUINI; PASQUINI, 2008), o estradiol (DE PAULA et al., 2007), o ácido 13-cis-retinóico (YAP et al., 2005), a β -

lapachona (NASONGKLA et al., 2003), o itraconazol (MIYAKE et al., 1999), o ibuprofeno (OH et al., 1998), dentre outros.

A despeito das inúmeras vantagens atribuídas à formação dos complexos de inclusão de fármaco com ciclodextrinas, muitas vezes apenas o mecanismo de complexação molecular não é suficiente para promover a liberação controlada do agente terapêutico. Com isso, a incorporação de complexos de inclusão em sistemas de liberação controlada poderia viabilizar a obtenção do perfil de liberação desejado (DE ROSA et al., 2005; FERNANDES et al., 2007). Lira e colaboradores (2009) verificaram que a encapsulação do complexo de inclusão ácido úsnico: β -ciclodextrina em lipossomas resultou na modulação da cinética de liberação *in vitro* do ácido úsnico, onde os lipossomas contendo o complexo apresentaram um perfil de liberação mais prolongada do ácido úsnico quando comparado a lipossomas contendo apenas o ácido.

A incorporação dos complexos de inclusão fármaco:ciclodextrina em sistemas poliméricos pode aumentar a eficiência de encapsulação e a biodisponibilidade oral dos princípios ativos que estão associados, bem como, modular a cinética de liberação destes dispositivos terapêuticos (DUCHÊNE et al., 1999). Isso é possível devido a natureza do complexo de inclusão formado, produzindo novas espécies com diferentes solubilidades e difusividades nas matrizes poliméricas (DE ROSA et al., 2005), capazes de melhorar a hidratação da matriz, promover sua erosão (SONG et al., 1997) e modificar o perfil de liberação do sistema polimérico (BIBBY et al., 2000; TRAPANI et al., 2003).

1.3.4 Tecnologia farmacêutica - Sistemas de liberação controlada

A tecnologia farmacêutica representa uma área multidisciplinar envolvida com o desenvolvimento de sistemas terapêuticos mais eficientes, que representam inovação tecnológica obtendo sistemas micro e nanométricos com o controle de liberação de fármacos e direcionamento ao sítio de ação (STAMATIALIS et al., 2008).

Os sistemas desenvolvidos por essa tecnologia são dispositivos que liberam o princípio ativo de forma controlada, mantendo uma concentração apropriada no plasma por um longo período de tempo. Com isso, exercem um papel fundamental na terapêutica, uma vez que possibilitam a otimização do uso de fármacos comercialmente disponíveis pela melhoria da eficácia terapêutica, tornando os princípios ativos muito mais seletivos em termos de concentração no local de ação, com menos efeitos colaterais e com uma maior

duração em relação ao efeito farmacológico (KUMAR et al., 2001; STAMATIALIS et al., 2008).

Os sistemas de liberação controlada apresentam inúmeras vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, tais como: liberação progressiva do fármaco; direcionamento a alvos específicos; proteção do princípio ativo (diminuindo a sua retenção e/ou degradação pelo organismo); redução do número de doses e quantidade do fármaco administrado, bem como manutenção da concentração constante do princípio ativo no plasma dentro de sua faixa terapêutica; diminuição de efeitos adversos; maior conveniência para o paciente e redução dos custos na saúde (Figura 1.7) (BRANNON-PEPPAS, 1995; PETITTI et al., 2008).

Diferentes sistemas podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada, como micropartículas, nanopartículas, lipossomas, dentre outros; como também diferentes tipos de liberação podem ser produzidos (contínua, pulsátil) de acordo com o fármaco, o dispositivo escolhido e a via de administração (PETITTI et al., 2008).

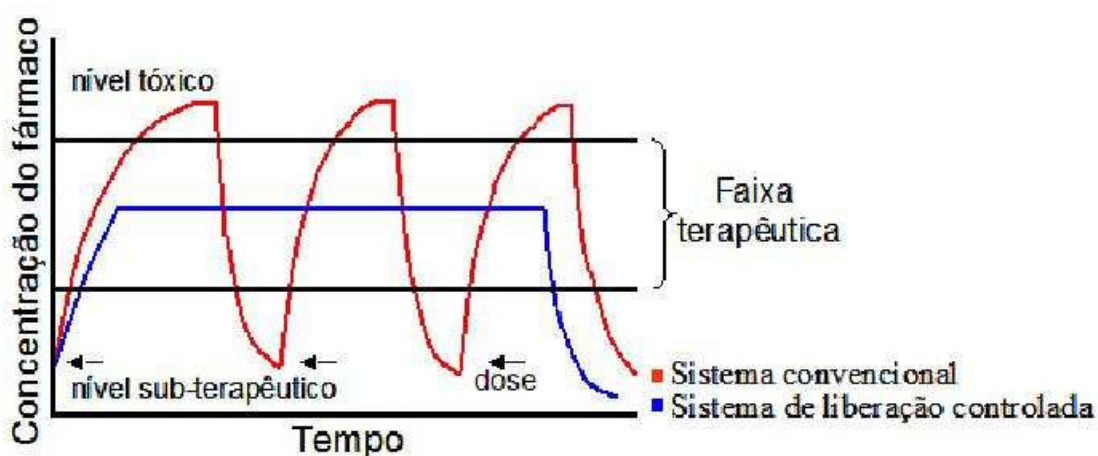


Figura 1.7 Comparação do perfil farmacocinético de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada (LIRA, 2007).

1.3.4.1 Sistemas particulados poliméricos

Nas últimas décadas, polímeros biodegradáveis têm sido bastante estudados visando o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. Sistemas particulados poliméricos podem ser obtidos em escalas nano e micrométrica, consistindo em sólidos bioerosíveis capazes de incorporar inúmeros agentes terapêuticos. Vários produtos farmacêuticos já foram desenvolvidos com sistemas poliméricos, muitos deles sendo

comercializados, como: Decapeptyl[®], Depot[®], Eligard[®], Enantone[®], Lupron[®], Profact[®], Trenantone[®] e Zoladex[®] (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Em virtude de sua diversidade de aplicações e da boa estabilidade físico-química e biológica, as perspectivas futuras destes dispositivos são promissoras em relação aos demais sistemas de liberação. Adicionalmente, podem ser produzidas eficiências de encapsulação satisfatórias para diferentes fármacos e vias de administração (injetável, intramuscular, oral, subcutânea, dentre outras) (BARAT et al., 2008; HANS; LOWMAN, 2002; SINGH; LILLARD, 2009).

Para a obtenção de micro e nanopartículas podem ser utilizados polímeros naturais ou sintéticos (BRANNON-PEPPAS, 1995). Dentre os polímeros naturais mais estudados encontram-se: ácido hialurônico, alginato, amido, colágeno e quitosana, que oferecem muitas vantagens quando usados como carreadores para liberação de fármacos (BALMAYOR et al., 2009). No entanto, problemas correlacionados à pureza, necessidade de modificação química ou mesmo de incompatibilidade com os constituintes da formulação justificam o uso preferencial de polímeros sintéticos biodegradáveis como matérias-primas destes sistemas (HANS; LOWMAN, 2002).

Os polímeros sintéticos mais comumente utilizados são ácidos poliamino, poliamidas, poliacrilamidas, poliésteres, poliortoésteres e poliuretanos (JAIN, 2000). Os poliésteres alifáticos com ligações hidrolizáveis são candidatos promissores para controlar o perfil de liberação em sistemas particulados. Os poliésteres como PCL, PGA, PLA e PLGA são bastante atrativos devido a características favoráveis, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade e segurança para uso em humanos, já sendo oficialmente regulamentados para uso interno (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008; GARBAYO et al., 2008).

Em particular o PCL, devido a sua alta permeabilidade a muitos fármacos e biocompatibilidade em meio fisiológico, além de outras vantagens, dentre elas, ser mais estável em condições ambientes, apresentar uma biodegradação mais lenta e ser menos oneroso, podendo ser utilizado em grandes quantidades (WANG et al., 2009).

O perfil de liberação destes sistemas pode ser delineado pela modificação de propriedades dos polímeros, como o grau de cristalinidade, as razões monoméricas e as condições de polimerização, podendo ser produzidos sistemas de liberação com segurança de uso que varia entre meses ou alguns anos (BRANNON-PEPPAS, 1995; HANS; LOWMAN, 2002).

1.3.4.2 Micropartículas

As micropartículas são definidas como pequenas partículas sólidas e esféricas de tamanho entre 1 a 1000 μm . Nas micropartículas poliméricas, o fármaco pode estar encapsulado como um núcleo sólido, como uma solução, ou disperso na matriz polimérica. Classificam-se em microcápsulas e microesferas. As primeiras são sistemas reservatórios contendo o fármaco em um núcleo central com revestimento polimérico que atua como um filme protetor; enquanto as microesferas são sistemas matriciais ou monolíticos, no qual o fármaco está uniformemente disperso e/ou dissolvido na matriz polimérica (Figura 1.8) (BERKLAND et al., 2001; MANDAL et al., 2001; PETITTI et al., 2008; SINGH et al., 2001).

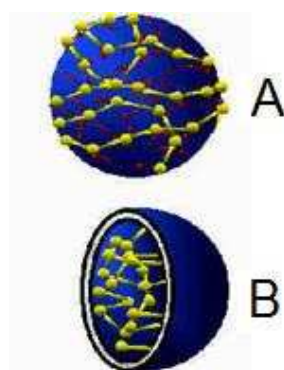


Figura 1.8 Representação esquemática da classificação das micropartículas: (A) microesfera (sistema matricial) e (B) microcápsula (sistema reservatório) (extraído de <http://www.nanoparticles.org/links/Nanosphere.jpg>).

Durante os últimos anos, diversas pesquisas foram focadas no desenvolvimento de micropartículas devido a inúmeros fatores, dentre os quais: ação terapêutica prolongada e elevada eficiência de encapsulação associadas as suas dimensões, melhoria da estabilidade e da biodisponibilidade oral de fármacos, aumento da permeabilidade através do epitélio intestinal e facilidade de administração (VASIR et al., 2003; WANG et al., 2009).

Princípios ativos de diversas classes terapêuticas já foram incorporados em micropartículas, incluindo antibióticos, anticancerígenos, antituberculosstáticos, antifúngicos, anti-inflamatórios, analgésicos, enzimas, hormônios, peptídeos, antireumáticos, antimaláricos, antivirais, dentre outros (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008; FREITAS et al., 2005; HIROTA et al., 2007; SANTOYO et al., 2002).

A liberação de fármacos encapsulados em micropartículas pode ser controlada pela formação de blendas poliméricas ou adição de diferentes aditivos hidrofóbicos ou hidrofílicos. Dentre os aditivos mais utilizados estão o polietilenoglicol (PEG), sendo normalmente utilizado para controlar a liberação inicial, todavia não se tem conhecimento se o mesmo permanece dentro da matriz polimérica durante muito tempo. O mecanismo do PEG no controle da liberação do fármaco em micropartículas não está totalmente elucidado, uma vez que aumentou a taxa de liberação do aciclovir (via intraocular) e diminuiu a da indometacina e do ibuprofeno em microesferas de PLGA (via intra-articular) (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008). O PEG também melhorou a estabilidade da lisozima (da clara de ovo de galinha), utilizada como proteína modelo em uma técnica de emulsificação espontânea, por minimização da adsorção protéica nas interfaces criadas durante o processo de formação de gotículas de óleo em água (MALZERT-FRÉON et al., 2009).

1.3.4.3 Métodos de preparação de micropartículas

Para identificar a influência de diferentes parâmetros na encapsulação do fármaco, morfologia das micropartículas e, conseqüentemente, na cinética de liberação, são necessárias investigações experimentais com diferentes métodos de preparação, condições de processo e materiais (PETITTI et al., 2008).

Vários fatores devem ser levados em consideração no momento da escolha do método mais adequado: propriedades físico-químicas do fármaco (peso molecular, solubilidade, pK_a , coeficiente de partição octanol-água - Log P, estabilidade) e do polímero; farmacocinética do fármaco; o tipo de micropartícula desejada; rendimento do processo; eficiência de encapsulação, dentre outros (FREITAS et al., 2005; WANG et al., 2009).

Os métodos usados na produção de micropartículas geralmente envolvem princípios de evaporação e/ou difusão do solvente, coacervação, spray-drying, dentre outros (ITO et al., 2009). As técnicas com evaporação do solvente apresentam vantagens significativas, tais como: controle da cinética de liberação e do tamanho de partícula (produzindo amostras monodispersas), uso de polímeros insolúveis em água, excelentes eficiências de encapsulação para fármacos hidrofóbicos (como exemplo: cisplatina, lidocaína, naltrexone e progesterona) e hidrofílicos (insulina, proteínas, peptídeos e vacinas), e a possibilidade de transposição para a escala industrial (técnica já utilizada pela indústria farmacêutica) (LI et al., 2008).

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

De acordo com Wischke e Schwendeman (2008), a determinação da solubilidade do fármaco em água, em solventes orgânicos e em co-solventes torna-se essencial para o estudo inicial da microencapsulação. Fatores que afetam a solubilidade aquosa, tais como pH e a presença de excipientes também devem ser considerados. Estima-se que mais de 40% das moléculas encapsuladas são hidrofóbicas. O termo “fármacos hidrofóbicos” descreve um grupo heterogêneo de moléculas que exibem baixa solubilidade em água, mas que são tipicamente solúveis em vários solventes orgânicos. Os termos ligeiramente solúvel (1 - 10 mg/mL), fracamente solúvel (0,1 - 1 mg/mL), e praticamente insolúvel (<0,1 mg/mL) são empregados para classificar estas substâncias.

As emulsões formadas nestes métodos podem ser do tipo simples, como de óleo/água (O/A, caracterizando um sistema rico em água) (Figura 1.9), óleo/óleo (O/O) ou múltiplas como água/óleo/água (A/O/A). O método O/O pode ser eficaz para moléculas que apresentam solubilidade aquosa razoável (como a hidrocortisona com 280 µg/mL), minimizando as perdas para a fase contínua aquosa, que pode ser evidenciada com o uso da técnica O/A (WANG et al., 2005).

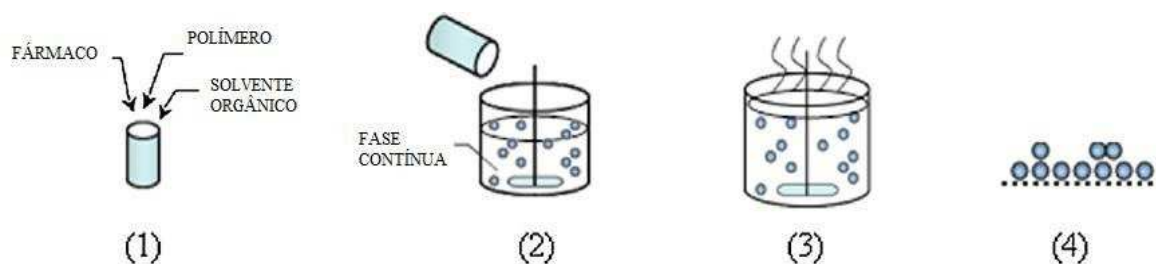


Figura 1.9 Método de preparação de micropartículas por emulsificação (O/A) e evaporação do solvente: (1) solubilização dos componentes na fase oleosa orgânica, (2) mistura da fase orgânica com a fase contínua contendo emulsificante sob agitação, (3) evaporação do solvente, (4) separação das micropartículas (adaptado de LI et al., 2008).

Modificações destes métodos, como o de sólido/óleo/água (S/O/A) podem ser úteis quando o fármaco não pode ser solubilizado em um solvente ou mistura de solventes, ou ainda, quando a perda de fármaco para a fase contínua não pode ser evitada com o uso de cosolventes. Como exemplo, pode-se citar que o β -estradiol (BIRNBAUM et al., 2000; MOGI et al., 2000) e o levonorgestrel (WANG et al., 2005) já foram encapsulados através da técnica S/O/A. Para outras moléculas hidrofóbicas, outras técnicas como sólido/óleo/óleo (S/O/O), óleo/óleo/óleo (O/O/O) e sólido/água/óleo/água (S/A/O/A) já foram eficazes (JANORIA; MITRA, 2007; HERRERO-VANELL et al., 2000; WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

1.3.4.4 Caracterização de micropartículas

Para a escolha da melhor formulação em aspectos farmacotécnicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos sistemas poliméricos micrométricos, são essenciais caracterizações físico-químicas e ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os parâmetros físico-químicos utilizados para caracterização destes sistemas são bem variados, podendo-se destacar: avaliação macroscópica e microscópica, distribuição e tamanho de partícula, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, potencial zeta, interações e incompatibilidades entre os componentes da formulação, estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo e cinética de liberação *in vitro* (MAGENHEIM; BENITA, 1991; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000).

A avaliação morfológica de micropartículas pode ser realizada através de microscopia óptica, eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (SCHAFFAZICK et al., 2006). A aplicação destas técnicas de microscopia tem como objetivo a avaliação da forma e do tamanho desses sistemas, sendo possível diferenciar microesferas de microcápsulas (MOSQUEIRA et al., 2000), bem como obter informações sobre o tipo de superfície das micropartículas (WANG et al., 2009).

A distribuição e tamanho de partícula podem ser determinados por microscopia, por métodos cromatográficos, pelo princípio Coulter, por difração a laser, por espalhamento de luz dinâmica (espectroscopia de correlação de fóton) e por tamisação (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008). O índice de polidispersão de uma amostra permite avaliar o grau de homogeneidade da distribuição do tamanho de partícula, onde um valor abaixo de 1 pode ser associado a um alto grau de homogeneidade da população de partículas, e elevados valores estão correlacionados a uma larga distribuição de tamanho ou à presença de várias

populações. Para o cálculo do índice de polidispersão considera-se: o tamanho médio da partícula, o índice de refração do solvente, o ângulo de medida e a variação da distribuição de tamanho (GAUMET et al., 2008).

A eficiência de encapsulação de micropartículas é dada através da razão entre a quantidade de fármaco encapsulada no sistema e a quantidade teórica adicionada inicialmente. Pode ser determinada através da dissolução do sistema polimérico em um solvente apropriado, onde o fármaco é quantificado por técnicas de espectrofotometria UV ou cromatografia (COCERO et al., 2009; RIBEIRO-COSTA et al., 2004). Determinados solventes, como acetona, acetonitrila, diclorometano ou dimetilsulfóxido são comumente utilizados para dissolver a matriz polimérica e o fármaco hidrofóbico (SAH; LEE, 2006); ou ainda etanol e metanol, que podem extrair seletivamente o fármaco independentemente da dissolução do polímero (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

O potencial zeta é comumente utilizado para determinar a carga de superfície de micropartículas e indica a estabilidade destas partículas em suspensão. Sua determinação é realizada através de técnicas de eletroforese, e o potencial zeta corresponde ao potencial elétrico teórico entre o ambiente aquoso e uma região difusa de carga predominante oposta à superfície da partícula. Este parâmetro é influenciado pela composição da partícula e pelo meio em que ela está dispersa. O potencial zeta pode ser utilizado para avaliar se o fármaco encontra-se no interior do sistema particulado ou adsorvido à sua superfície (CALVO et al., 1997; MAGENHEIM; BENITA, 1991; WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Técnicas como difração de raios-X (XRD), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), espectroscopia Raman e microscopia de varredura laser confocal, podem evidenciar a encapsulação do fármaco e distribuição na matriz polimérica, a interação ou incompatibilidade do fármaco com o polímero ou outros componentes da formulação (COCERO et al., 2009; FAISANT et al., 2002; FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008; WANG et al., 2009).

Na determinação da cinética de liberação *in vitro*, diferentes métodos são empregados para a avaliação do perfil de liberação do fármaco simulando condições fisiológicas. Para a cinética de micropartículas, o método de dissolução é o comumente utilizado. O sistema é submetido a condições controladas de agitação, pH e temperatura; alíquotas do meio são retiradas em tempos pré-estabelecidos, com reposição do meio, e o fármaco liberado quantificado em função do tempo. De maneira diferente das formas farmacêuticas convencionais, os sistemas de liberação controlada não apresentam métodos oficiais descritos nas farmacopéias; apesar disso, fundamentos de estudos de liberação

devem ser respeitados, como por exemplo, a manutenção das condições *sink*, a qual se refere a um excesso de volume de meio que irá permitir que o ativo dissolva-se continuamente (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Mais comprovações acerca das vantagens do uso de sistemas de liberação controlada podem ser obtidas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Avaliações *in vitro* da viabilidade celular e da atividade farmacológica podem ser realizadas; assim como testes *in vivo* para avaliação da farmacodinâmica, biodistribuição, eficácia farmacológica e toxicidade (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2008; GOMES et al., 2008; HASEGAWA et al., 2008; KEMPEN et al., 2008; LU et al., 2008; MURATA et al., 2008).

1.3.5 Poli-ε-caprolactona (PCL)

1.3.5.1 Generalidades

A poli-ε-caprolactona (PCL) é um poliéster alifático hidrofóbico, que começou a ser estudado em 1930 por Van Natta e colaboradores. Possui uma estrutura molecular de cinco grupos metileno apolares e um grupo éster polar (Figura 1.10) (SINHA et al., 2004).

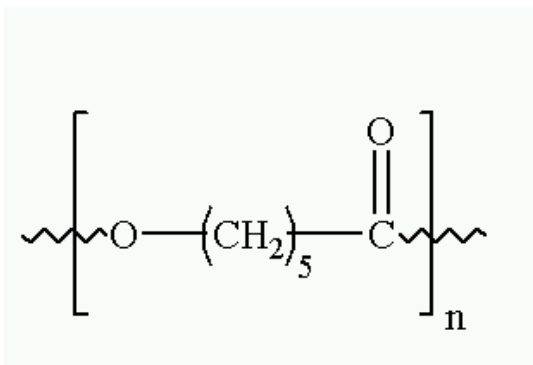


Figura 1.10 Estrutura molecular da poli-ε-caprolactona (PCL) (extraído de <http://www.mech.northwestern.edu/medx/web/publications/papers/42.pdf>).

Possui temperatura de transição vítrea (T_g) de -60 °C, e sua temperatura de fusão varia entre 59 e 64 °C, e seu peso molecular pode variar de 10.000 a 80.000. É solúvel em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, entre outros solventes em temperatura ambiente, tendo baixa solubilidade em acetona, acetato de etila, dimetilformamido e acetonitrila; é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter dietílico (SINHA et al., 2004).

É reabsorvível, biodegradável e biocompatível, podendo ser utilizado para fabricação de suturas cirúrgicas e formulações de medicamentos, apresentando também potencial aplicação para reparo de ossos e cartilagens (LE RAY et al., 2003; SINHA et al., 2004). Possui alta hidrofobicidade, boa estabilidade *in vitro* e baixo custo, além de ser disponível em grandes quantidades para compra e ter seu uso regulamentado. Sua degradação é lenta e não gera um meio desfavorável com pH ácido, como o PLA ou PLGA (FLORINDO et al., 2008; LUCIANI et al., 2008); sendo degradado para um produto não tóxico e de baixo peso molecular, o ácido 6-hidroxicaprílico, que pode ser absorvido pelo corpo ou ser eliminado através do metabolismo (HAMOUDEH; FESSI, 2006; WU et al., 2000). Pode ser utilizado em combinação com outros polímeros, formando blendas, com o objetivo de melhorar a resistência, biodegradação e adesão. Chang e colaboradores (1986) utilizaram o PCL associado com o PLA para manipular a taxa de liberação de microesferas contendo clorpomazine.

Sua atoxicidade permite que este polímero sintético seja adequado à nanotecnologia farmacêutica (LINCE et al., 2008), bem como o fato de que ele se mantém ativo por mais de um ano, ideal para sistemas de liberação a longo prazo (LE RAY et al., 2003). Uma vez que possui lenta taxa de degradação e elevada permeabilidade para fármacos de baixo peso molecular, o PCL é considerado ideal para utilização em sistemas de liberação controlada, tais como nanopartículas, micropartículas e implantes (WANG et al., 2008).

1.3.5.2 Microesferas de PCL

Microesferas de polímeros biodegradáveis são de grande interesse como sistemas de liberação controlada de fármacos, devido à capacidade de serem reabsorvidas pelo organismo. Princípios ativos das mais diversas classes terapêuticas vêm sendo incorporados em microesferas de PCL, tais como antígenos, anti-hipertensivos, antibióticos, agentes antiproliferativos, anti-inflamatórios, imunossupressores; bem como enzimas, proteínas, vacinas, RNA, dentre outros (SINHA et al., 2004).

Balmayor e colaboradores (2009) prepararam microesferas de PCL contendo dexametasona, um fármaco hidrofóbico, para aplicação em sistemas de liberação de fármacos e engenharia de tecidos. Neste mesmo contexto, Benoit e colaboradores (1999) desenvolveram microesferas para a liberação de vacinas por via oral contendo albumina de soro bovino, obtendo esferas de tamanho entre 5 e 10 μm .

Microesferas de PCL contendo o antígeno *Streptococcus equi* foram obtidas por Florindo e colaboradores (2008), as quais foram avaliadas quanto às características físico-químicas e através de testes *in vivo* em camundongos. Após a imunização por via subcutânea, as formulações induziram o aumento dos níveis de linfocinas, em comparação com o antígeno livre, ativando com sucesso as vias para as células Th1 e Th2.

O estudo desenvolvido por Wang e colaboradores (2009) produziu microesferas contendo dois compostos com diferentes solubilidades em água, a p-nitroanilina e a rodamina B. Verificou-se que, por ser mais hidrofóbica, a p-nitroanilina distribuiu-se em sua maior parte na matriz polimérica, enquanto a rodamina B, por ser mais hidrofílica, distribuiu-se na superfície das microesferas.

Pérez e colaboradores (2000) prepararam microesferas de PCL visando a utilização por via oral através de dois métodos diferentes. Nifedipina e propranolol, utilizados no tratamento da hipertensão, foram escolhidos como fármacos lipofílico e hidrofílico, respectivamente. As microesferas apresentaram-se de forma esférica, com diâmetro variando entre 191 e 351 μm para o método de emulsão óleo/água com evaporação do solvente, com eficiência de encapsulação de 91% para a nifedipina e 37% para o propranolol. Para o método de emulsão A/O/A com evaporação do solvente, o diâmetro variou entre 302 e 477 μm e a eficiência de encapsulação apresentada foi de 83% para a nifedipina e 57% para o propranolol.

CAPÍTULO 2

Validação de método espectrofotométrico UV para determinação do ácido difractáico de *Usnea sp.* em microesferas de Poli- ϵ -caprolactona

Camilla Vila Nova Soares Silva^{1,2,4}, Milena Sales Ferraz⁴, Nely Kika Honda³, Nereide Stela Santos Magalhães⁴, Noemia Pereira da Silva Santos^{2,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE; ²Laboratório de Biotecnologia e Fármacos - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE; ³Laboratório de Química de Produtos Naturais - Departamento de Química/UFMS; ⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE, Recife-PE, Brasil.

* Autor para correspondência:

Dra. Noemia Pereira da Silva Santos
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
Laboratório de Biotecnologia e Fármacos
Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,
55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil
Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)
E-mail: noemia.santos@pq.cnpq.br

2.1 Resumo

O ácido difractáico (AD) é um composto de origem líquênica que tem demonstrado importantes atividades biológicas, tais como: analgésica e antipirética, antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antiproliferativa e antimicobacteriana. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método espectrofotométrico UV para determinação de ácido difractáico em microesferas de poli- ϵ -caprolactona (PCL). Os parâmetros de validação linearidade, exatidão, precisão, robustez, especificidade, limites de detecção e quantificação foram determinados segundo diretrizes internacionais de padronização. A faixa de linearidade foi de 1 a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a equação de regressão: Absorbância = $0,1541 \times [\text{AD}] (\mu\text{g.mL}^{-1}) + 0,0053$ e $r = 0,99998$. A precisão intermediária indicou que a diferença entre as médias não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A exatidão revelou média percentual de recuperação do ácido difractáico das microesferas de 98,31%. O método foi robusto, apesar da variação de temperatura e solventes, e os excipientes da formulação de microesferas de PCL não interferiram na quantificação do produto final. Os limites de detecção e quantificação do ácido difractáico foram de 0,03 e 0,08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O método proposto demonstrou ser exato, preciso e reprodutível, sendo capaz de quantificar o ácido difractáico em matéria-prima e em microesferas de PCL.

Palavras-chave: ácido difractáico; método espectrofotométrico UV; microesferas.

2.2 Abstract

The aim of this pioneer study was to develop and validate an UV spectrophotometric method for determining diffractaic acid in poli- ϵ -caprolactone (PCL) microspheres. The validation parameters such as linearity, accuracy, precision, robustness, specificity, limits of detection and quantification were determined according to international guidelines for standardization. The linearity range was from 1 to 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, the regression equation: Absorbance = 0.1541 x [DA] ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) + 0.0053 and $r = 0.99998$. Intermediate precision indicated that the difference between the means was statistically insignificant ($p < 0.05$). The accuracy revealed a mean percentage recovery of diffractaic acid in microspheres of 98.31%. The method was robust, despite the change of temperature and solvent furnishers. The formulation excipients of PCL microspheres did not interfere in the quantification of diffractaic acid in the final product. The limits of detection and quantification of diffractaic acid were 0.03 and 0.08 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectively. The proposed method proved to be accurate, precise and reproducible being able to quantify diffractaic acid in raw material and PCL microspheres.

Key-words: diffractaic acid; UV spectrophotometric method; microspheres.

2.3 Introdução

O ácido difractáico é um depsídeo tipo orcinol, isolado de *Usnea sp.* Caracteriza-se por ser um composto formado pela condensação de dois ou mais ácidos hidroxibenzoicos, um grupo carboxila esterificado com o grupo hidroxila fenólico como uma molécula secundária (Figura 2.1) (Honda e Vilegas, 1998).

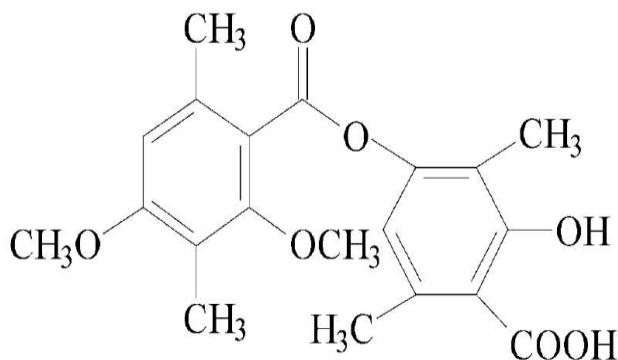


Figura 2.1 Estrutura química do ácido difractáico ($C_{20}H_{22}O_7$) (Santos et al., 2004).

Os cristais de ácido difractáico são em forma de agulhas, com ponto de fusão químico em torno de 189-190 °C, massa molecular de 374 g/mol, com fácil dissolução em éter, etanol, acetona e clorofórmio (Huneck e Yoshimura, 1996). O ácido difractáico tem sido relatado com diversas propriedades biológicas, tais como: analgésica e antipirética (Okuyama et al., 1995), antiviral (Neamati et al., 1997), antitumoral (Yamamoto et al., 1995), antimicrobiana (Falcão et al., 2004; Piovano et al., 2002), antifúngica (Piovano et al., 2002) e atividade antiproliferativa (Kumar e Müller, 1999a; Kumar e Müller, 1999b).

Estudos comprovaram que depsídeos tipo orcinol demonstraram inibir a monoamino oxidase B (MAO-B), enzima responsável pela desaminação na doença de Parkinson (Wilson et al., 1998).

Recentes estudos indicam que o ácido difractáico isolado de *Usnea longissima* foi aplicado no tratamento da úlcera gástrica induzida pela indometacina em ratos. O efeito gastroprotetor do ácido difractáico pode ser atribuído à sua ação redutora contra o dano oxidativo e seu efeito inibitório na infiltração neutrofílica, observado em estômago de ratos (Bayir et al., 2006).

Recentemente, pesquisas realizadas por Honda e colaboradores (2010) demonstraram que o ácido difractáico apresentou atividade *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, sendo considerado o mais ativo dos componentes utilizados no estudo, apresentando um valor de MIC de 15,6 µg/ml (41,6 µM).

O controle de qualidade de fármacos puros ou em formas farmacêuticas é realizado através de métodos oficiais ou validados. A espectrofotometria é a técnica analítica mais utilizada nos laboratórios de padronização de fármacos por ser simples, exata, reprodutível e de baixo custo. Ademais, os ensaios utilizando métodos espectrofotométricos são descritos em variadas farmacopéias para as análises de rotina de diferentes tipos de fármacos em formas farmacêuticas devido à sua relação custo-benefício, bem como às metodologias de fácil execução (MOTWANI et al., 2007; RAHMAN et al., 2005).

Apesar das atividades biológicas apresentadas pelo ácido difractáico, na literatura não está presente a descrição de um método de detecção validado utilizando espectroscopia com detecção em ultravioleta (UV) e aplicado a sua quantificação em formas farmacêuticas de liberação controlada. Verifica-se, desta forma, que a quantificação do ácido difractáico como matéria-prima e em produtos farmacêuticos necessita do desenvolvimento e validação de um método analítico para controle de qualidade. A espectroscopia pode ser perfeitamente adaptada à rotina de análises do teor de ativos, onde a utilização de espectroscopia UV é menos onerosa e mais facilmente executável.

Neste cenário, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método analítico para quantificar o ácido difractáico como matéria-prima e em microesferas de PCL através de espectrofotometria UV.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Reagentes e amostras

O ácido difractáico foi fornecido por Dra. Nely Kika Honda, do Laboratório de Química de Produtos Naturais/UFMS. A acetonitrila, o metanol e o diclorometano foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico. PCL, PVA (PM 30.000-70.000) e PEG (PM 3.350), juntamente com o crioprotetor trealose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). As análises para a determinação do ácido difractáico foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Ultrospec 3000 Pro (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) utilizando células de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

2.4.2 Desenvolvimento do método analítico

No desenvolvimento do método foi considerada a escolha do solvente capaz de solubilizar o analito em questão facilitando a preparação da amostra. O comprimento de onda de maior absorbância do ácido difractáico no solvente selecionado foi determinado pela varredura de várias diluições da solução estoque padrão em espectrofotômetro UV-Vis entre os comprimentos de onda de 200 e 400 nm. O preparo das soluções padrão e amostras são descritos em seguida.

2.4.3 Solução padrão

A solução padrão foi obtida pesando-se 5 mg de ácido difractáico que foram transferidos a um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, adicionaram-se 20 mL de acetonitrila que foi submetida à sonicação por 5 min. O volume foi completado obtendo-se uma concentração 0,2 mg.mL⁻¹.

2.4.4 Validação do método analítico

Segundo o guia para validação de métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), a validação de um método tem por objetivo determinar que o método seja adequado ao uso pretendido. Os parâmetros de validação (linearidade, exatidão, precisão, robustez, especificidade, limite de quantificação e limite de detecção) foram avaliados segundo as exigências da Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (*International Conference on Harmonisation - ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) (ICH, 2005).

2.4.4.1 Linearidade

Para a determinação da linearidade foram realizadas três curvas padrão autênticas com cinco concentrações diferentes de ácido difractáico (1, 2, 3, 4 e 5 µg.mL⁻¹). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados e analisada estatisticamente para definir o desvio padrão relativo e o coeficiente de determinação (mínimo aceitável R² = 0,99), através da equação de regressão (Equação 1).

$$DPR(\%) = DP/CMD \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que o DPR (%) é o desvio padrão relativo; DP é o desvio-padrão e CMD é a concentração média determinada.

2.4.4.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito em quantidades conhecidas à formulação de microesferas de PCL em três níveis de concentrações diferentes: concentração baixa ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Todas as amostras foram preparadas em triplicata. O coeficiente de variância e o percentual de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão, que foi calculada individualmente para cada concentração (Equação 2).

$$E(\%) = \text{CME}/\text{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que o E (%) é a exatidão; CME é a concentração média experimental; e CT é a concentração teórica.

2.4.4.3 Precisão

Os ensaios de precisão intermediária foram determinados por três amostras de concentrações diferentes (1 , 3 e $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) executados no mesmo dia (intra-dia) e dois dias consecutivos por analistas diferentes (inter-dia). O resultado foi expresso em desvio padrão relativo (Equação 1). As médias dos resultados obtidos foram avaliadas pelo teste *t* de Student (teste bilateral, $p < 0,05$).

2.4.4.4 Robustez

A robustez do método proposto foi verificada pela variação de temperatura de análise (4°C e 25°C) e pela mudança de fabricante do solvente (Merck e Fisher Scientific), na concentração de $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A concentração de ácido difractáico foi determinada em seis ensaios diferentes. A avaliação da robustez foi realizada pela análise dos coeficientes de variação entre as médias obtidas, utilizando o teste *t* de Student (teste bilateral, $p < 0,05$).

2.4.4.5 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos espectros de UV da solução padrão do ácido difractáico, das amostras placebo de microesferas de PCL e das microesferas de PCL contendo ácido difractáico. As varreduras foram realizadas entre os

comprimentos de onda de 200 a 400nm e foram observadas quanto à presença de picos de interferência (ICH, 2005).

2.4.4.6 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estimados matematicamente a partir da curva padrão resultante da média das três curvas de calibração autênticas. O cálculo para determinar os valores correspondentes baseia-se no desvio padrão do residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva padrão. Para determinar o limite de detecção e quantificação foram utilizadas as equações 3 e 4, respectivamente.

$$LD = (D.P./I) \times 3,3 \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = (D.P./I) \times 10,0 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que LD é o limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; D.P. é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e I é a inclinação da curva de calibração.

2.4.5 Aplicação farmacêutica do método

2.4.5.1 Preparação das microesferas de PCL contendo ácido difractáico

As microesferas foram preparadas através do método de emulsão múltipla com evaporação do solvente de acordo com Ribeiro-Costa e colaboradores (2004) e Moraes e colaboradores (2009). Uma emulsão simples (água/óleo) foi preparada dissolvendo PCL (225 mg) e 20 mg de ácido difractáico em diclorometano (6 mL). A solução orgânica foi emulsificada (Ultra-Turrax T25, IKA, Alemanha) com 125 mg de PEG em água por 1 min a 8.000 rpm utilizando banho de gelo. A emulsão formada foi adicionada a uma fase aquosa constituída por álcool polivinílico (PVA) 1,25% e emulsificada por 30 s a 8.000 rpm, resultando em uma emulsão múltipla (água/óleo/água). A emulsão resultante foi mantida sob agitação mecânica em um agitador de palheta a 400 rpm (2 h) para evaporação do solvente. As microesferas foram recuperadas através de centrifugação (Kubota KN-70 Centrifuge, Japão) a 3.000 rpm durante 10 min, lavadas três vezes com água destilada e dispersas no crioprotetor trealose 1% (m/v). Em seguida, as microesferas foram congeladas a -80 °C para liofilização (EZ-DRY, FTS System, EUA) por 48 h.

2.4.5.2 Determinação da eficiência de encapsulação das microesferas

A eficiência de encapsulação do ácido difractáico nas microesferas foi determinada por espectrofotometria (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Amostras de microesferas liofilizadas (5 mg) foram dissolvidas em 25 mL de uma mistura de diclorometano:metanol (3:2) e submetidas à sonicação por 10 min. O ácido difractáico foi determinado em comprimento de onda de 213 nm utilizando-se curva de calibração na faixa de concentração de 1 - 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em acetonitrila. Microesferas da formulação placebo foram submetidas ao mesmo método de doseamento para demonstrar a ausência de interferência dos constituintes da formulação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Desenvolvimento da metodologia analítica

O solvente de escolha para a solubilização do ácido difractáico foi acetonitrila. Neste solvente, o espectro de varredura do ácido difractáico na faixa compreendida entre 200 e 400 nm evidenciou um pico de absorbância máxima no comprimento de onda de 213 nm (Figura 2.2).

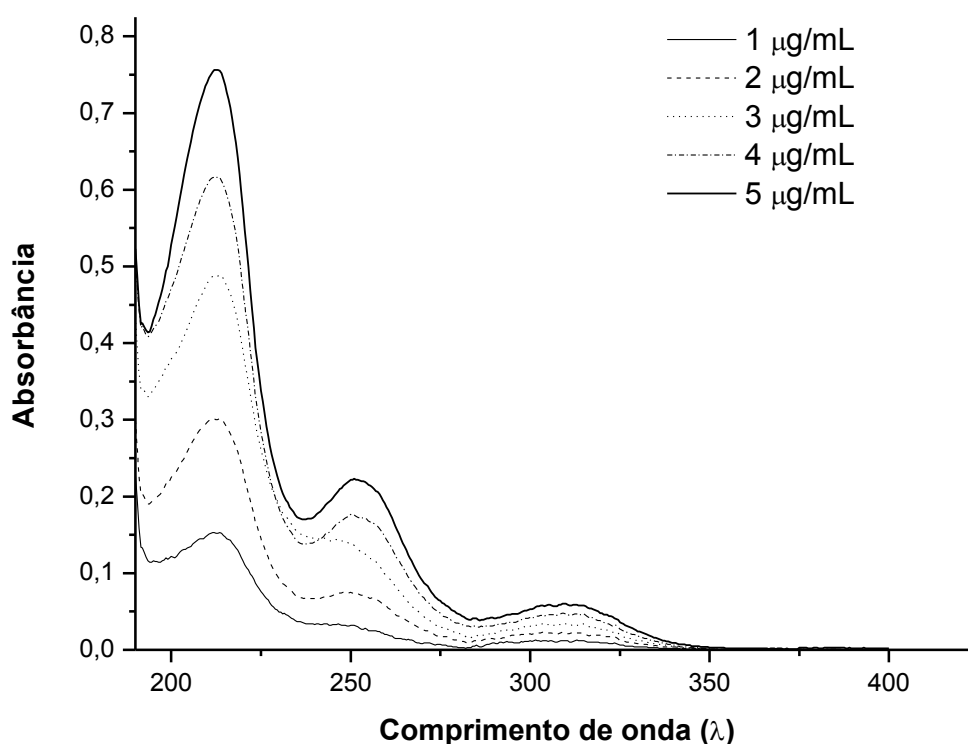


Figura 2.2 Espectro de varredura do ácido difractáico nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em acetonitrila ($\lambda_{\text{máx}}$ 213 nm).

2.5.2 Validação do método analítico

2.5.2.1 Linearidade

Os dados obtidos das três curvas padrão preparadas a partir de soluções estoque diferentes foram ajustados por análise de regressão linear. O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 213 nm para as concentrações estudadas (1 - 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A equação da regressão linear média obtida a partir de três curvas de calibração foi $y = 0,1541 x + 0,0053$, em que y é a absorbância (nm) e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$) em equivalentes de ácido difractáico (Figura 2.3).

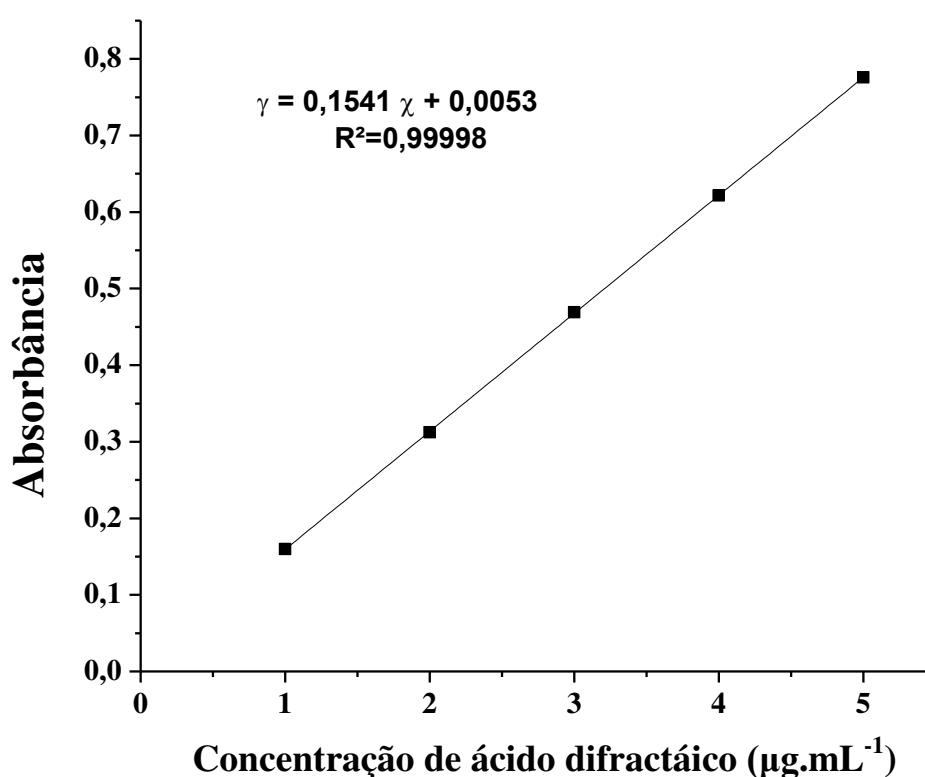


Figura 2.3 Curva padrão de ácido difractáico (1 - 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a 213 nm.

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99998, significando que 99,99% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado. Os dados de desvio padrão relativo (DPR) e exatidão (E) do intervalo do método são apresentados na Tabela 2.1. O maior desvio padrão relativo foi de 3,94%, portanto, menor do que o valor máximo de 5% permitido (ICH, 2005).

Tabela 2.1 Dados do teste de linearidade por espectrofotometria para ácido difractáico.

CT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ABS $\pm$ DP	CM $\pm$ DP	DPR (%)	E (%)
1	0,160 $\pm$ 0,006	1,00 $\pm$ 0,036	3,47	100,3
2	0,312 $\pm$ 0,008	1,99 $\pm$ 0,052	2,55	99,6
3	0,469 $\pm$ 0,019	3,01 $\pm$ 0,120	3,94	100,3
4	0,622 $\pm$ 0,023	4,00 $\pm$ 0,151	3,73	99,9
5	0,776 $\pm$ 0,028	5,00 $\pm$ 0,179	3,55	100,0

CT = Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); CM = Concentração Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de três determinações; ABS = Absorbância média de três determinações; DP = Desvio Padrão; DPR (%) = Desvio Padrão Relativo; E (%) = Exatidão.

2.5.2.2 Exatidão

A exatidão foi verificada para três níveis de concentração: baixa, média e alta. Os dados experimentais obtidos revelaram uma média de exatidão do analito de 98,31% (98%, 98,33% e 98,6% para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente) e que o maior desvio padrão relativo foi de 2,12% (Tabela 2.2). De acordo com o ICH, os resultados de exatidão não devem ser inferiores a 95% e o desvio padrão relativo não deve ultrapassar 5%. Deste modo, os dados obtidos apresentam apenas pequenas variações da concentração de ácido difractáico que são quantificadas pelo método analítico proposto. Dessa forma, o método analítico desenvolvido pode ser considerado exato.

Tabela 2.2 Exatidão do ácido difractáico em diferentes níveis de concentrações.

Concentração de ácido difractáico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Dados estatísticos		
Teórica	Experimental			Média	DP	DPR (%)
1	0,96	1,00	0,99	0,98	0,02	2,12
3	2,93	2,95	2,98	2,95	0,03	0,85
5	4,94	4,86	4,99	4,93	0,07	1,33

DP = Desvio Padrão; DPR = Desvio Padrão Relativo.

2.5.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelos estudos de precisão intermediária. A precisão intermediária avalia a variação de ensaios realizados em dias e com analistas diferentes.

Neste estudo o maior valor do desvio padrão relativo foi de 2,34%. Através do teste *t* de *Student* foi avaliada a possível existência de diferença significativa entre as médias obtidas para os ensaios realizados em dias diferentes e com analistas diferentes. Como pode ser observado na Tabela 2.3 em todos os casos o *t* calculado foi sempre menor do que o *t* crítico, demonstrando não existir diferença significativa entre as médias, ou seja, os resultados obtidos expressam o mesmo valor ($p < 0,05$). Além disso, todos os desvios padrão foram inferiores a 5%, indicando a precisão do método.

Tabela 2.3 Precisão intermediária do método espectrofotométrico para o doseamento do ácido difractáico.

Intra-dia						
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Analista 1		Analista 2		<i>t</i> calculado	<i>t</i> crítico
	CM $\pm$ DP	DPR (%)	CM $\pm$ DP	DPR (%)		
1	1,02 $\pm$ 0,01	0,96	1,03 $\pm$ 0,02	2,34	0,95	
3	3,12 $\pm$ 0,03	1,03	3,08 $\pm$ 0,03	1,02	0,29	4,30
5	5,21 $\pm$ 0,01	0,23	5,21 $\pm$ 0,09	1,65	0,87	
Inter-dia						
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Dia 1		Dia 2		<i>t</i> calculado	<i>t</i> crítico*
	CM $\pm$ DP	DPR (%)	CM $\pm$ DP	DPR (%)		
1	0,96 $\pm$ 0,03	2,93	1,01 $\pm$ 0,01	1,42	0,15	
3	2,93 $\pm$ 0,02	0,60	2,95 $\pm$ 0,03	0,99	0,19	4,30
5	4,94 $\pm$ 0,01	0,30	4,86 $\pm$ 0,08	1,73	0,26	

CM = Concentração Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de três determinações; DP = Desvio Padrão; DPR (%) = Desvio Padrão Relativo. *Valor tabelado de *t* (teste bilateral, $p < 0,05$).

2.5.2.4 Robustez

A variação da temperatura de análise não afetou a absorbância do ácido difractáico. As concentrações médias obtidas para as análises de soluções acondicionadas nas temperaturas de 4 °C e 25 °C foram de 2,98 ($\pm$ 0,19) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,0 ($\pm$ 0,15) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A mudança da fonte fornecedora de acetonitrila resultou em concentrações médias de 2,99 ($\pm$ 0,16) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o tipo A e 2,97 ($\pm$ 0,14) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o tipo B. Entre todos os resultados experimentais o valor máximo do coeficiente de variação encontrado foi 1,78%. Conforme o teste *t* de *Student*, (Tabela 2.4) não foi evidenciada diferença significativa entre os resultados obtidos quando foram analisadas diferentes

temperaturas e fontes fornecedoras de solvente durante as análises realizadas, ou seja, no nível de 95% de confiança as variações dos parâmetros analisados não influenciam a quantificação do ácido difractáico.

Tabela 2.4 Teste *t* de *Student* aplicado aos parâmetros analisados para robustez do método de dosagem do ácido difractáico em espectroscopia UV.

Parâmetros	Ácido difractáico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		t_{cal}^b
	Teórica	Experimental $\pm$ DP ^a	
4 °C	3	2,98 $\pm$ 0,19	1.60
25 °C	3	3,0 $\pm$ 0,15	0.92
Solvente A	3	2,99 $\pm$ 0,16	1.55
Solvente B	3	2,97 $\pm$ 0,14	1.78

^a Valores representam a média de 6 determinações. ^b t_{cal} é o valor calculado. O valor teórico de $t_{\text{crít}} = 2,57$ (teste bilateral, $p < 0,05$).

2.5.2.5 Especificidade

De acordo com os resultados apresentados na especificidade, verificou-se que os excipientes da formulação de microesferas de PCL não interferem na quantificação do produto final (Figura 2.4).

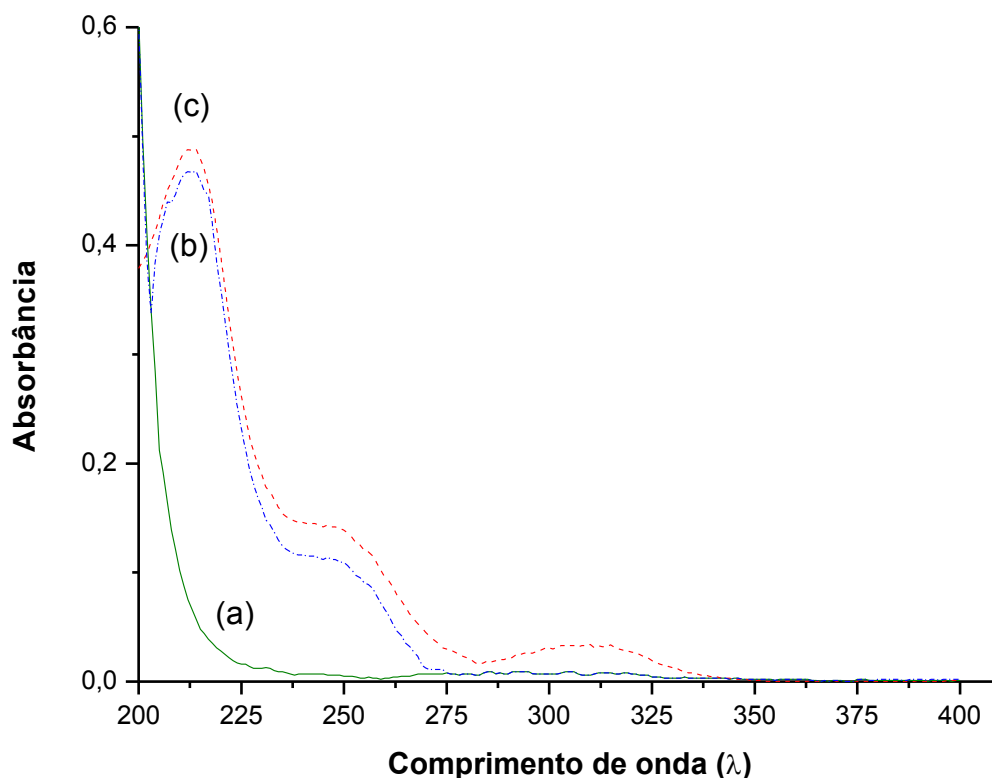


Figura 2.4 Espectro de varredura de: (a) microesferas de PCL, (b) microesferas de PCL contendo ácido difractáico ($3 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e (c) ácido difractáico ($3 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) em acetonitrila.

2.5.2.6 Limites de detecção e quantificação

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados pelas equações 3 e 4, foram $0,03$ e $0,08 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Com base nesses resultados, verifica-se que o método possui sensibilidade para detectar e quantificar o ácido difractáico.

2.5.3 Aplicação farmacêutica do método

A eficiência de encapsulação do ácido difractáico em microesferas de PCL foi determinada através de espectrofotometria UV em comprimento de onda de 213 nm , utilizando-se a equação da curva padrão: $\text{Absorbância} = 0,1541 \times [\text{AD}] (\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}) + 0,0053$. A eficiência de encapsulação obtida foi de $53,33\% \pm 0,08$. Este resultado encontra-se de acordo com os descritos na literatura para microesferas de PCL, onde Le Ray e colaboradores (2003) obtiveram uma eficiência de encapsulação de $57,28\%$ para vancomicina em microesferas. Pérez e colaboradores (2000) relataram eficiência de 57% para propranolol em microesferas de PCL. Ainda, experimentos recentes descreveram eficiência de encapsulação de $39,20\%$ para rodamina B em microesferas de PCL (Wang et al., 2009).

2.6 Conclusões

O método analítico espectrofotométrico proposto para doseamento do ácido difractáico em microesferas de PCL demonstrou ser simples, rápido, preciso, exato e reprodutível, aliado à acessibilidade e facilidade de execução. Foi possível quantificar com sucesso o ácido difractáico nas microesferas sem interferência da poli- ϵ -caprolactona, através de um método linear e com alta sensibilidade de quantificação. Os resultados de precisão e exatidão obtidos atestam confiabilidade necessária para o uso desta metodologia em laboratórios de controle de qualidade. Portanto, a metodologia estabelecida pode ser perfeitamente aplicada à rotina de análise de formulações contendo ácido difractáico.

Agradecimentos

Silva agradece à FACEPE pelo suporte financeiro na forma de bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado. Esta pesquisa teve suporte financeiro parcial do CNPq.

2.7 Referências Bibliográficas

ANVISA. 2003. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 17 de abril de 2009.

Bayir, Y., F. Odabasoglu, A. Cakir, A. Aslan, H. Suleyman, M. Halici e C. Kazaz. 2006. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative, stress and neutrophilic-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomed.*, 13: 584-590.

Falcão, E.P.S., N.H. Silva, N.B. Gusmão, S.M. Ribeiro e E.C. Pereira. 2004. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina solediosa* (B. de Lesd.) Laundron. *Acta Bot. Bras.*, 18: 911-918.

Honda, N.K. e W. Vilegas. 1998. Química dos líquens-Divulgação. *Quím. Nova*, 21: 110-125.

Honda, N.K., F.R. Pavan, R.G. Coelho, S.R. Andrade-Leite, A.C. Michelleti, T.I.B. Lopes, M.Y. Misutsu, A. Beatriz, R.L. Brum e C.Q.F. Leite. 2010. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomed.*, 17: 328-332.

Huneck, S. e I. Yoshimura. 1996. Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 251 p.

ICH Q2 (R1). 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 20 de abril de 2009.

Kumar, S. e K. Müller. 1999a. Lichen metabolite I. inhibitory action against leukotriene B₄, Biosynthesis by a non-redox mechanism. *J. Nat. Prod.*, 62: 821-823.

Kumar, S. e K. Müller. 1999b. Depsideos as non-redox inhibitors of leukotriene B₄ biosynthesis and HaCat cell growth.1. Novel analogues of barbatic and diffractaic. *Europ. J. Med. Chem.*, 34: 1035-1042.

Le Ray, A.M., S. Chiffolleau, P. looss, G. Grimandi, A. Gouyette, G. Daculsi e C. Merle. 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(e-caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. *Biomat.*, 24: 443-449.

Morais, W.A., M. Costa, A.D.O. Paixão, M.A.M. Maciel e N.S. Santos-Magalhães. 2009. Encapsulation and release characteristics of DCTN/PLGA microparticles. *J. Microencapsul.*, 26: 529-534.

Motvani, S.K., S. Chopra, F.J. Ahmad e K.K. Roop. 2007. Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and pharmaceutical formulations. *Spectrochim. Acta A*, 68: 250-256.

Neamati, N., H. Hong, A. Mazunder, S. Wang, S. Sunder, M.C. Nicklaus, G.W.A. Milne, B. Proksa e Y. Pommier. 1997. Depsides and depsidones, as inhibition of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibition through 3D databases searching. *J. Med. Chem.*, 40: 942-951.

Okuyama, E., K. Umeyama, M. Yamazaki, Y. Kinoshita e Y. Yamamoto. 1995. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipiretic components of *Usnea difracta*. *Planta Med.*, 61: 113-115.

Pérez, M.H., C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, A. Astier, M. Hoffman, R. Bodmeier e P. Maincent. 2000. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J. Control. Release*, 65: 429-438.

Piovano, M., J.A. Garbarino, F.A. Giannini, E.R. Correche, G. Feresin, A. Tapia, S. Zacchino e R.D. Enriz. 2002. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 47: 235-240.

Rahman, N., M. Singh e M.D.N. Hoda. 2005. Validation of simultaneous volumetric and spectrophotometric methods for the determination of captopril in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, 60: 569-574.

Ribeiro-Costa, R.M., A.J. Alves, N.P. Santos, S.C. Nascimento, E.C.P. Gonçalves, N.H. Silva, N.K. Honda e N.S. Santos-Magalhães. 2004. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J. Microencapsul.*, 21: 371-384.

Santos, L.C., N.K. Honda, I.Z. Carlos e W. Vilegas. 2004. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoterapia*, 75: 473-479.

Wang, X., Y. Wang, K. Wei, N. Zhao, S. Zhang e J. Chen. 2009. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release. *J. Mater. Process. Tech.*, 209: 348-354.

Wilson, C.O., O. Gisvold, J.N. Delgado e W.A. Remers. 1998. Textbook of organic medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Philadelphia: Lippincott Raven, 100 p.

Yamamoto, Y., Y. Miura, Y. Kinoshita, M. Higuchi, Y. Yamada, A. Murakami, H. Ohigashi e K. Koshimizu. 1995. Screening of tissue cultures and thalli of lichen and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter induced Epstein Bar virus activation. Chem. Pharma. Bull., 43: 1388-1390.

CAPÍTULO 3

Microesferas de Poli- ϵ -caprolactona contendo ácido difractáico e complexos de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina: caracterização e avaliação da citotoxicidade

Camilla Vila Nova Soares Silva ^{1,2,5}, Jéssica Andréia Pereira Barbosa ^{2,5}, Milena Sales Ferraz⁵, Nicácio Henrique da Silva ⁴, Nely Kika Honda ³, Nereide Stela Santos Magalhães ⁵,
Noemia Pereira da Silva Santos ^{2,5*}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE; ²Laboratório de Biotecnologia e Fármacos - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE; ³Laboratório de Química de Produtos Naturais - Departamento de Química/UFMS; ⁴Laboratório de Produtos Naturais - Departamento de Bioquímica/UFPE; ⁵Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE, Recife-PE, Brasil.

* Autor para correspondência:

Dra. Noemia Pereira da Silva Santos
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
Laboratório de Biotecnologia e Fármacos
Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,
55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil
Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)
E-mail: noemia.santos@pq.cnpq.br

3.1 Resumo

Neste estudo, a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) foi utilizada para melhorar a solubilidade do ácido difractáico (AD), e o complexo de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (AD:HP β CD) foi incorporado em microesferas de Poli- ϵ -caprolactona (PCL). Os complexos de inclusão foram preparados pela técnica de liofilização e caracterizados físico-quimicamente. As microesferas de PCL contendo o ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD foram preparadas através da técnica de emulsão múltipla A/O/A seguida de evaporação do solvente. O diagrama de solubilidade de fases do AD em HP β CD apresentou uma curva do tipo A_L , com uma constante de estabilidade $K_{1:1} = 821 \text{ M}^{-1}$. Na presença de 50 mM de HP β CD, a solubilidade do AD aumentou mais de 35 vezes. O complexo de inclusão AD:HP β CD apresentou modificações espectrais no IV e RMN ^1H em comparação com os espectros de AD e HP β CD. Uma mudança no AD, passando da forma cristalina para a amorfa foi observada por difração de raios-X, sugerindo a formação de um complexo de inclusão. As microesferas de PCL apresentaram diâmetro de $5,89 \pm 1,33 \text{ }\mu\text{m}$ e potencial zeta de $-12,68 \pm 0,56 \text{ mV}$. As formulações de microesferas contendo ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD apresentaram diâmetro de $5,23 \pm 1,65 \text{ }\mu\text{m}$ e $4,11 \pm 1,39 \text{ }\mu\text{m}$, com potencial zeta de $-7,85 \pm 0,32 \text{ mV}$ e $-6,93 \pm 0,46 \text{ mV}$, respectivamente. Ainda, o encapsulamento do AD:HP β CD nas microesferas resultou em uma modulação da cinética de liberação *in vitro* do AD. Desta forma, microesferas contendo AD:HP β CD apresentaram um perfil de liberação mais prolongada de ácido difractáico quando comparadas às microesferas de AD. As microesferas contendo o AD ou complexo de inclusão AD:HP β CD reduziram a citotoxicidade do composto frente a células Vero. Comprovando, portanto, que a complexação de substâncias lipofílicas a ciclodextrina, e sua incorporação em sistemas de liberação controlada, proporcionam uma melhoria na estabilidade e hidrossolubilidade destas substâncias, reduzindo os efeitos tóxicos.

Palavras-chave: sistemas de liberação controlada; microesferas; ácido difractáico; complexo de inclusão; 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

3.2 Abstract

In this pioneer study, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) was used to improve the solubility of diffractaic acid (DA), and the inclusion complex diffractaic acid:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (DA:HP β CD) was incorporated in Poli- ϵ -caprolactone (PCL) microspheres. The inclusion complexes were prepared by freeze-drying technique and physico-chemically characterized. PCL microspheres containing diffractaic acid or DA:HP β CD inclusion complex were prepared by the multiple W/O/W emulsion-solvent evaporation method. The phase-solubility diagram of DA in HP β CD showed an A_L curve with an apparent stability constant $K_{1:1} = 821 \text{ M}^{-1}$. In presence of 50 mmol of HP β CD the solubility of DA was increased more than 35-fold. DA:HP β CD inclusion complex presented IR and ^1H NMR spectral modifications in comparison with DA or HP β CD spectra. A change in DA from its crystalline to amorphous form was observed by X-ray diffraction, suggesting the formation of an inclusion complex. The PCL microspheres presented a diameter of $5.89 \pm 1.33 \text{ }\mu\text{m}$ and zeta potential of $-12.68 \pm 0.56 \text{ mV}$. The microspheres formulations containing diffractaic acid or inclusion complex DA:HP β CD presented diameter of $5.23 \pm 1.65 \text{ }\mu\text{m}$ and $4.11 \pm 1.39 \text{ }\mu\text{m}$ with zeta potential of $-7.85 \pm 0.32 \text{ mV}$ and $-6.93 \pm 0.46 \text{ mV}$, respectively. More, the encapsulation of DA:HP β CD in microspheres resulted in a modulation of *in vitro* kinetic release of DA. Thus, microspheres containing DA:HP β CD presented a more prolonged release profile of diffractaic acid when compared to DA microspheres. Microspheres containing DA or the inclusion complex DA:HP β CD reduced the compound's cytotoxicity against Vero cells, thus confirming that the complexation of lipophilic substances to cyclodextrin, and their incorporation into drug delivery systems provides an improvement on stability and water solubility of these substances, reducing toxic effects.

Key-words: drug delivery systems; microspheres; diffractaic acid; inclusion complex; 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

3.3 Introdução

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem uma superfície hidrofílica e uma cavidade central hidrofóbica, a qual favorece a formação de complexos de inclusão com fármacos de baixa polaridade (Loftsson e Duchêne, 2007; Duchêne et al., 1999). A ciclodextrina com maior aplicação no campo farmacêutico é a β -ciclodextrina, por apresentar eficiência de complexação satisfatória e baixo custo (Loftsson e Duchêne, 2007). No entanto, seus derivados quimicamente modificados, como a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), vêm sendo bastante utilizados devido ao aumento da capacidade de complexação (De Araújo et al., 2008).

A formação de complexos de inclusão de fármacos com ciclodextrinas pode proporcionar o aumento da solubilidade em água, além de melhorar a estabilidade, aumentar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade dos compostos associados (Schwingel et al., 2008; Brewster e Loftsson, 2007; Del Valle, 2004). Com o intuito de melhorar a eficiência de encapsulação e modular a cinética de liberação dos dispositivos terapêuticos, a incorporação de complexos de inclusão de fármacos com ciclodextrinas em sistemas de liberação controlada tem sido realizada (Duchêne et al., 1999).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos são dispositivos que apresentam diversas vantagens em relação aos sistemas convencionais. Dentre eles, a manutenção da concentração plasmática constante do fármaco dentro da faixa terapêutica durante um maior período de tempo, reduzindo as flutuações observadas no sistema convencional, que podem atingir níveis tóxicos ou subterapêuticos. Ademais, podem proporcionar aumento da biodisponibilidade; além da redução no número de administração das doses, aumentando a aceitação da terapia pelo paciente, podendo proporcionar, desta maneira, aumento da eficácia terapêutica (Garbayo et al., 2008; Mao et al., 2008; Freiberg e Zhu, 2004; Brannon-Peppas, 1995).

Dentre os sistemas de liberação controlada, as microesferas são partículas poliméricas sólidas, geralmente esféricas, que merecem destaque, tendo em vista sua estabilidade físico-química e biológica, sendo utilizadas para a encapsulação de diferentes substâncias, como peptídeos, proteínas, DNA/RNA e fármacos (Garbayo et al., 2008; Wischke e Schwendeman, 2008). Para o desenvolvimento de microesferas, alguns polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são bastante utilizados, tais como os poliésteres poli- ϵ -caprolactona (PCL), poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA), dentre outros (Fernández-Carballido et al., 2008; Lecaroz et al., 2006; Santos-Magalhães et al., 2000).

O ácido difractáico (AD) é um depsídeo tipo orcinol, isolado de *Usnea sp.* Caracteriza-se por ser um composto formado pela condensação de dois ou mais ácidos hidroxibenzoicos, um grupo carboxila esterificado com o grupo hidroxila fenólico como uma molécula secundária (Figura 3.1) (Honda e Vilegas, 1998).

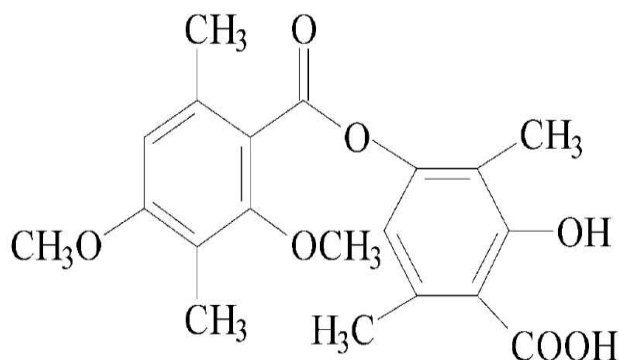


Figura 3.1 Estrutura química do ácido difractáico (C₂₀H₂₂O₇) (Santos et al., 2004).

Os cristais de ácido difractáico são em forma de agulhas, com ponto de fusão em torno de 189-190 °C, massa molecular de 374 g/mol, com fácil dissolução em éter, etanol, acetona e clorofórmio (Huneck e Yoshimura, 1996). O ácido difractáico tem sido relatado com diversas propriedades biológicas, tais como: analgésica e antipirética (Okuyama et al., 1995), antiviral (Neamati et al., 1997), antitumoral (Yamamoto et al., 1995), antimicrobiana (Falcão et al., 2004; Piovano et al., 2002), antifúngica (Piovano et al., 2002) e atividade antiproliferativa (Kumar e Müller, 1999a; Kumar e Müller, 1999b).

Estudos comprovaram que depsídeos tipo orcinol demonstraram inibir a monoamino oxidase B (MAO-B), enzima responsável pela desaminação na doença de Parkinson (Wilson et al., 1998). Recentes estudos indicam que o ácido difractáico isolado de *Usnea longissima* foi aplicado no tratamento da úlcera gástrica induzida pela indometacina em ratos. A ação gastroprotetora do ácido difractáico pode ser atribuída ao seu efeito redutor contra o dano oxidativo e seu efeito inibitório na infiltração neutrofílica, observado em estômago de ratos (Bayir et al., 2006).

Recentemente, pesquisas realizadas por Honda e colaboradores (2010) demonstraram que o ácido difractáico apresentou atividade *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, sendo considerado o mais ativo dos componentes utilizados no estudo, apresentando um valor de MIC de 15,6 µg/ml (41,6 µM).

Mesmo com variadas atividades, o ácido difractáico apresenta restrita aplicação terapêutica devido a suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, tais como: baixa solubilidade e difícil interação com as barreiras biológicas (Bayir et al., 2006). Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a possibilidade de formação de complexo de inclusão entre o AD e a HP β CD, caracterizar físico-quimicamente os complexos e incorporá-los em microesferas de PCL, avaliar a cinética de liberação *in vitro* e a citotoxicidade frente a células Vero (fibroblasto de rim de macaco).

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Reagentes e amostras

O ácido difractáico (AD) foi fornecido pela Dra. Nely Kika Honda, do Laboratório de Química de Produtos Naturais/UFMS. A acetonitrila, o metanol e o diclorometano foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico. PCL, PVA (PM 30.000-70.000) e PEG (PM 3.350), juntamente com o crioprotetor trealose e a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). As soluções aquosas foram preparadas com água purificada. As análises para a determinação do ácido difractáico foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Ultrospec 3000 Pro (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) utilizando células de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

3.4.2 Estudo de solubilidade de fases do ácido difractáico em HP β CD

O estudo de solubilidade de fases do ácido difractáico em soluções aquosas de HP β CD foi realizado de acordo com o descrito por Higuchi e Connors (1965). Uma quantidade em excesso de ácido difractáico (3 mg) foi adicionada a tubos contendo 1 mL de água purificada ou soluções aquosas de HP β CD em diferentes concentrações (0 a 50 mM), os quais foram deixados sob agitação vigorosa a 25 °C, durante 72 horas. Após este período, uma alíquota da mistura foi retirada, centrifugada, e o sobrenadante analisado para determinação do conteúdo de ácido difractáico através de espectrofotometria UV a 213 nm. Assumindo a formação de um complexo de razão estequiométrica 1:1, a constante de solubilidade ($K_{1:1}$) foi calculada através da relação linear entre a concentração molar do ácido difractáico na solução versus a concentração molar da HP β CD, de acordo com a equação $K_{1:1} = \text{slope}/[S_0(1-\text{slope})]$, onde S_0 é a solubilidade do ácido difractáico na ausência da HP β CD.

3.4.3 Preparação de complexo de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (AD:HP β CD)

Os complexos de inclusão AD:HP β CD foram obtidos pela técnica de *freeze-drying* (Lira et al., 2009). Neste procedimento, a HP β CD (73,2 mg) foi inicialmente solubilizada em água e o AD (20 mg) foi adicionado posteriormente. O complexo fármaco:ciclodextrina em solução permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente até atingir condições de equilíbrio (72 h), sendo em seguida congelado a - 80 °C para o processo de liofilização. Os complexos liofilizados foram acondicionados em dessecador à temperatura ambiente.

3.4.4 Caracterização dos complexos de inclusão AD:HP β CD

Os complexos de inclusão AD:HP β CD foram caracterizados através das técnicas de infravermelho, difração de raios-X e ressonância magnética nuclear de prótons (Lira et al., 2009).

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro IV-TF Bruker IFS66 (Bruker Optics, Alemanha), na faixa de 4000-400 cm^{-1} através do método do disco de KBr (brometo de potássio). Neste procedimento, os pellets foram preparados pela prensa de cada amostra (ácido difractáico, HP β CD, complexo de inclusão e mistura física) em um disco de KBr. Os padrões de difração de raios-X foram realizados em um aparelho Geiger-Flex 2073 (Rigaku, Japão), utilizando-se tubo de cobre com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5405 \text{ nm}$). A ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H) foi realizada através do espectrômetro Unity Plus 300 MHz (Varian, EUA), com as amostras diluídas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

O conteúdo de ácido difractáico nos complexos de inclusão foi quantificado através da dissolução de quantidades conhecidas em uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1), a qual foi submetida à sonicação por 5 minutos, com o restante do volume completado para 5 ml de acetonitrila. A suspensão foi então centrifugada a 10.000 rpm durante 15 min, e o ácido difractáico solubilizado no sobrenadante foi quantificado através de espectrofotometria UV a 213 nm. Uma curva padrão de ácido difractáico foi preparada em acetonitrila, nas concentrações de 1 a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, absorvância = $0,1541 \times [\text{AD}] (\mu\text{g.mL}^{-1}) + 0,0053$, $r = 0,99998$, conforme método validado previamente.

3.4.5 Preparação de microesferas de PCL contendo ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão múltipla com evaporação do solvente de acordo com Ribeiro-Costa et al. (2004) e Morais et al. (2009). Uma emulsão

simples A/O foi preparada dissolvendo-se 225 mg de PCL e quantidade conhecida de ácido difractáico em diclorometano (6 mL). A solução orgânica foi emulsificada (Ultra-Turrax T25, IKA, Alemanha) com 125 mg de PEG em água por 1 min a 8.000 rpm utilizando banho de gelo. A emulsão formada foi adicionada a uma fase aquosa constituída por álcool polivinílico (PVA) 1,25% e emulsificada por 30 s a 8.000 rpm, resultando em uma emulsão múltipla A/O/A. A emulsão resultante foi mantida sob agitação mecânica em um agitador de palheta a 400 rpm (2 h) para evaporação do solvente. As microesferas foram recuperadas através de centrifugação (centrífuga Kubota KN-70, Japão) a 3.000 rpm durante 10 min, lavadas três vezes com água destilada e dispersas no crioprotetor trealose 1% (m/v). Em seguida, as microesferas foram congeladas a - 80 °C para liofilização (EZ-DRY, FTS System, EUA) por 48 h. Após liofilização, as microesferas foram acondicionadas em dessecador à temperatura ambiente. Para a preparação das microesferas contendo complexo de inclusão AD:HP β CD, foram seguidas as mesmas condições descritas acima, com a dissolução do complexo em água.

3.4.6 Caracterização físico-química das microesferas

Tamanho de partícula e índice de polidispersão

O tamanho de partícula das microesferas foi determinado pela técnica de difração a laser através de um analisador de partículas (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, Reino Unido). Amostras de microesferas liofilizadas (10 mg) foram dispersas em uma solução aquosa de Tween[®]80 a 0,04% (m/v) e submetidas à sonicação por 10 min.

Os parâmetros calculados foram: diâmetro volumétrico médio (d_v) e o *índice span* pela equação $span = (d(v;0,9) - d(v;0,1)) / d(v;0,5)$, onde $d(v;0,9)$, $d(v;0,1)$ e $d(v;0,5)$ representam os percentuais das microesferas com diâmetros volumétricos médios acima de 90%, 10% e 50%. O índice *span* permite avaliar o grau de polidispersão da amostra, sendo que pequenos valores estão associados a uma distribuição homogênea de tamanho de partícula. Outros autores já propuseram o *span* como parâmetro para avaliar o grau de polidispersão de microesferas (Ito et al., 2009; Ribeiro-Costa et al., 2009).

Carga de superfície

A determinação da carga de superfície (potencial zeta) foi realizada pelo método de mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido), através do *software* Zetasizer. O potencial zeta (ζ) das microesferas foi medido após diluição das amostras em solução aquosa de NaCl 1Mm (0,5%, p/v) a 25 °C. Os resultados (média $\pm$ desvio padrão) são representantes de três experimentos independentes.

Eficiência de encapsulação das microesferas

A eficiência de encapsulação do ácido difractáico nas microesferas foi determinada por espectrofotometria (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Amostras de microesferas liofilizadas (5 mg) foram diluídas em 25 mL de uma mistura de diclorometano:metanol (3:2) e submetidas à sonicação durante 10 min. Uma alíquota dessa solução foi então diluída para a concentração teórica de $3 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. O ácido difractáico foi determinado em 213 nm utilizando-se curva padrão na faixa de concentração de 1 - 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em acetonitrila. Microesferas da formulação placebo foram submetidas ao mesmo método de doseamento para demonstrar a ausência de interferência dos constituintes da formulação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.7 Cinética de liberação *in vitro*

Um estudo prévio de solubilidade do AD em tampão fosfato pH 7,4 a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ foi realizado para assegurar as condições *sink* nos ensaios de cinética de liberação *in vitro*. O perfil de liberação do ácido difractáico encapsulado em microesferas de PCL foi realizado de acordo com Morais et al. (2009). Uma amostra de microesferas contendo AD ou complexo de inclusão AD:HP β CD foi ressuspensa em 300 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação magnética controlada em triplicata. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 1 mL do meio de dissolução foram retiradas, com reposição do mesmo volume de meio, e filtradas com o uso de Millex 0,22 μm (Millipore, EUA). O AD presente no meio de dissolução foi quantificado através de espectrofotometria UV como descrito previamente. Os perfis de liberação *in vitro* das microesferas foram expressos como o percentual de AD liberado (em relação à quantidade de AD encapsulado) em função do tempo (120 h).

3.4.8 Avaliação da citotoxicidade dos complexos de inclusão AD:HP β CD e das microesferas contendo AD e complexo de inclusão AD:HP β CD frente a células Vero

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do método de cultura de tecidos com células de linhagem contínua Vero (células de fibroblasto do rim de macaco) em fase exponencial de crescimento.

A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante vital Azul de Tripán 0,4% p/v, em PBS. Uma suspensão de células Vero (1×10^4 células/mL) foi distribuída em placas de cultura de 96 poços (220 μL /poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Sedas, Milão, Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO_2 . Após 24 h de incubação, amostras do ácido difractáico diluído em DMSO, complexo de inclusão AD:HP β CD,

microesferas de PCL contendo AD e microesferas de PCL contendo o AD:HP β CD diluídas em tampão fosfato pH 7,4 foram adicionadas à placa de cultura (22 μ L/poço), obtendo-se as concentrações finais de 52, 26, 13 e 6,5 μ g/mL. Foram realizados controles com DMSO e DMEM. Decorridas 72 h de tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras estudadas foram avaliados utilizando-se o método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) conforme protocolo do National Cancer Institute (NCI) modificado por Santos et al., 2005. A leitura foi realizada utilizando-se um leitor Elisa com filtro de 450 nm.

3.4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste *t* de *Student*, considerando $p < 0,05$. Os resultados experimentais foram expressos no formato de média $\pm$ D.P.

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Estudo de solubilidade de fases do ácido difractáico em HP β CD

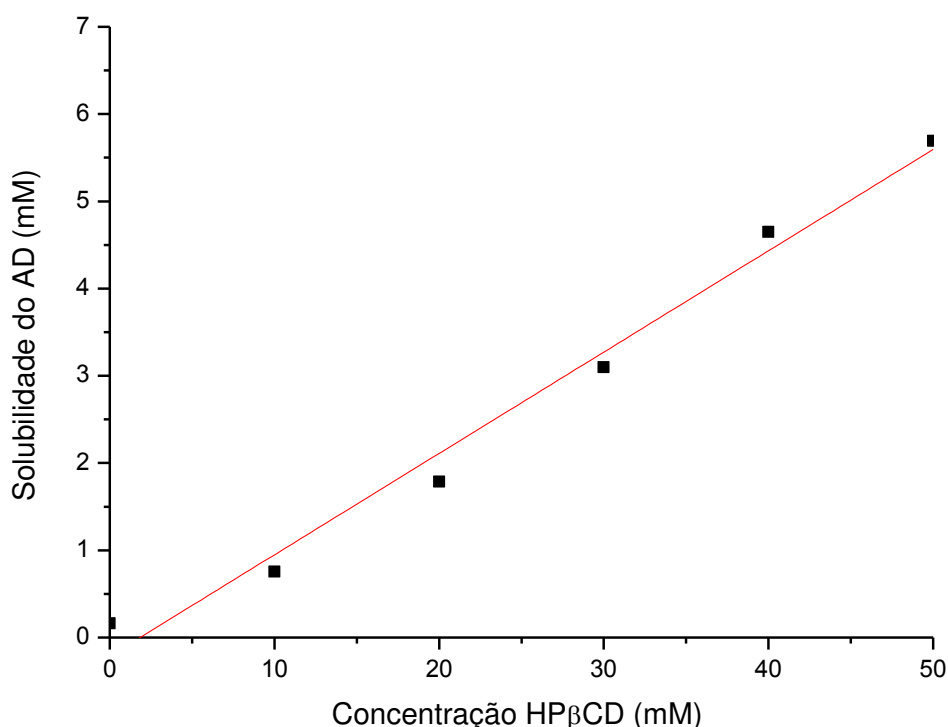


Figura 3.2 Diagrama de solubilidade de fases do ácido difractáico (AD) e HP β CD a 25 °C.

A Figura 3.2 apresenta o perfil de solubilidade para o ácido difractáico na presença de ciclodextrina em diferentes concentrações. A adição de 50 mM de HP β CD resultou em uma solubilidade de 5,6 mM para o AD, o que corresponde a um aumento de 35 vezes na solubilidade do fármaco quando em água (0,16 mM). Vlachou e Papaïoannou (2003) em estudo de solubilidade de fases com a HP β CD obtiveram um aumento de 11 vezes na solubilidade aparente da furosemida. Este aumento de solubilidade pode também ser comparado com o encontrado por Kristmundsdóttir et al. (2005) quando utilizaram a HP β CD como agente solubilizante para a atranorina e o ácido fumarprotocetrárico, ambas substâncias liquênicas. Ademais, Lira et al. (2009) obtiveram um aumento de mais de 5 vezes na solubilidade do ácido úsnico quando da adição de 16 mM de β -ciclodextrina.

A estequiometria do complexo de inclusão AD:HP β CD foi determinada em função do tipo de curva obtida no diagrama de solubilidade de fases do complexo conforme apresentado na Figura 3.2. Uma curva do tipo A_L foi obtida, isto é, houve um aumento linear da solubilidade da substância ativa (AD) com o aumento crescente da concentração de HP β CD, indicando a formação de complexos solúveis (Higuchi e Connors, 1965). O fato de que a solubilidade do ácido difractáico foi aumentada pela presença de HP β CD é um sinal de que uma ou mais interações moleculares podem ter ocorrido entre eles para a formação de espécies químicas distintas. Entretanto, não há garantias de que os complexos são de primeira ordem no hospedeiro (Higuchi e Connors, 1965).

A constante de associação obtida do complexo de inclusão AD:HP β CD foi de 821 M⁻¹ (Slope = 0,11615; S₀ = 0,16 mM; *r* = 0,98064), confirmando a interação entre o fármaco e a ciclodextrina. Esta significativa constante de associação pode ser comparada com relatos existentes na literatura para outras moléculas hidrofóbicas, como a β -lapachona, que apresentou valor de K_{1:1} de 700 M⁻¹ (Nasongkla et al., 2003), e como o efavirenz, um agente antiretroviral, que obteve valor de K_{1:1} de 1.073 M⁻¹ (Shatigari et al., 2009). Resultados similares foram obtidos por Loftsson e colaboradores (2005), quando avaliaram o efeito da ciclodextrina na solubilidade de diversos fármacos, como hidrocortisona e carbamazepina.

No sentido de minimizar os erros decorrentes nos cálculos considerando os valores de S₀ e/ou y-intercepto no estudo de solubilidade de fases, também foi calculada a eficiência de complexação do AD com a HP β CD, apresentando uma EC de 0,131. Com isso, a razão molar fármaco:ciclodextrina de 1:9 (razão molar = 1: (EC+1)/EC) foi obtida a partir da EC (Brewster e Loftsson, 2007).

3.5.2 Caracterização dos complexos de inclusão AD:HP β CD

3.5.2.1 Infravermelho

Os espectros de infravermelho do ácido difractáico, da HP β CD, do complexo de inclusão AD:HP β CD e da mistura física são apresentados na Figura 3.3.

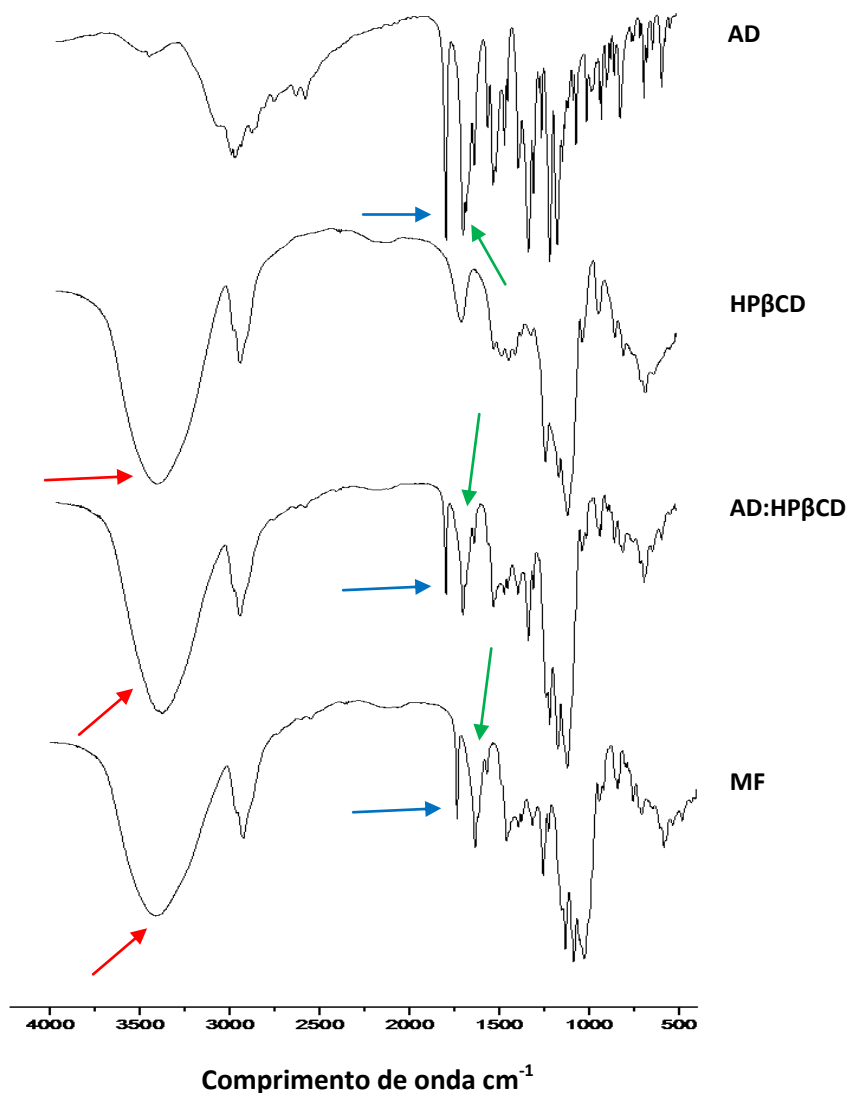


Figura 3.3 Espectros de infravermelho para o ácido difractáico (AD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), complexo de inclusão (AD:HP β CD) e mistura física (MF).

O espectro de infravermelho do ácido difractáico está de acordo com dados relatados na literatura (Bayir et al., 2006), onde a carboxila do composto pode ser bem evidenciada em torno de 1.760 cm^{-1} . Ainda é possível evidenciar o grupo éster do ácido

difractáico em torno de 1.735 cm^{-1} , que também pode ser observado na mistura física e no complexo de inclusão (setas verdes) (Nakanishi, 1964).

O espectro do complexo de inclusão mostrou um estreitamento da banda $\nu(\text{O-H})$ da HP β CD em 3.400 cm^{-1} (setas vermelhas) quando em comparação com os espectros de mistura física e HP β CD, sendo um representativo da formação de complexo de inclusão (Nalawade et al., 2010). A formação do complexo de inclusão implica a liberação de moléculas de água no interior da cavidade da HP β CD, significando que novas interações entre o ácido difractáico e a ciclodextrina podem ter aparecido. Além disso, quando o espectro do complexo de inclusão e da mistura física foram comparados com o do ácido difractáico, o aparecimento de bandas em torno de 1.760 cm^{-1} (setas azuis) foi observado, correspondente ao grupo cetona $\nu(\text{C=O})$, sugerindo que uma interação entre ambas as moléculas pode ter ocorrido.

A espectroscopia na região de infravermelho caracteriza-se como a técnica mais adequada para a compreensão das interações a nível molecular, através da detecção de alterações em faixas que podem estar relacionadas ao processo de complexação de fármacos e ciclodextrinas. No entanto, na maioria dos casos, as faixas de IV características da ciclodextrina não sofrem grandes alterações, devido a sua interação com a molécula hóspede, uma vez que apenas uma pequena fração delas é interrompida. Além disso, algumas das bandas da molécula hóspede podem ser afetadas pela interação com a ciclodextrina a nível molecular, sendo mascaradas pela alta absorbância relativa das bandas da ciclodextrina (García-Zubiri et al., 2003).

3.5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear ^1H

Os experimentos de ressonância magnética nuclear de prótons foram realizados para avaliar as mudanças nos sinais químicos ($\Delta\delta$) dos compostos puros (AD e HP β CD) e no complexo de inclusão AD:HP β CD (Tabelas 3.1 e 3.2). Para o ácido difractáico, foram observados singletos em 2.055, 2.074, 2.389, 2.500, 6.605 e 6.761 ppm, singlete largo em 12.540 ppm, no grupamento hidroxila, bem como singletos em 3.749 e 3.832 ppm, no grupamento éter. Todos os sinais químicos do AD foram de acordo com os previamente reportados por Bayir e colaboradores (2006), indicando a pureza da amostra. Um deslocamento significativo no grupamento OH ($\Delta\delta = 0.033\text{ ppm}$) do ácido difractáico foi observado para o complexo de inclusão AD:HP β CD (Tabela 3.1).

Na presença do AD, os prótons H3 e H5 da HP β CD sofreram deslocamento ($\Delta\delta = 0.018$ e 0.009 ppm , respectivamente) (Tabela 3.2). Devido a esses prótons serem localizados na cavidade hidrofóbica da HP β CD, estas mudanças sugerem que o ácido

difractáico formou um complexo através de sua inclusão dentro da cavidade da ciclodextrina (Nasongkla et al., 2003), pois, uma vez que os prótons H3 e H5 são os que encontram-se mais livres e com menos interações, eles estão mais predispostos a reagir com o composto. Ainda, devido ao deslocamento do grupamento OH ($\Delta\delta = 0.033$ ppm) do ácido difractáico, pode-se sugerir que a interação do AD com a HP β CD ocorreu através da hidroxila fenólica localizada na posição *orto* ao grupamento éter, por meio de ligações de hidrogênio (Dotsikas; Loukas, 2002).

Tabela 3.1 Sinais de RMN ^1H para o ácido difractáico e complexo de inclusão AD:HP β CD (mudanças observadas nos sinais do AD).

AD	δ AD (ppm)	δ AD:HP β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
OH (H1)	12.540 (sl)	12.573	0.033
H (H1)	6.761 (s)	6.777	0.016
H (H1)	6.605 (s)	6.595	-0.010
OCH ₃ (H3)	3.832 (s)	3.840	0.008
OCH ₃ (H3)	3.749 (s)	3.753	0.004
H (H3)	2.500 (s)	2.500	0.000
H (H3)	2.389 (s)	2.393	0.004
H (H3)	2.074 (s)	2.079	0.005
H (H3)	2.055 (s)	2.050	-0.005

Tabela 3.2 Sinais de RMN ^1H para a HP β CD e complexo de inclusão AD:HP β CD (mudanças observadas nos sinais da HP β CD).

HP β CD	δ HP β CD (ppm)	δ AD:HP β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	5.023	5.023	0.000
H2	3.625	3.623	-0.002
H3	3.901	3.919	0.018
H4	3.415	3.412	-0.003
H5	3.637	3.646	0.009
H6	3.745	3.753	0.008

3.5.2.3 Difração de raios-X

Os padrões de difração de raios-X estão descritos na Figura 3.4, e evidenciam a formação de espécies supramoleculares entre o ácido difractáico e a HP β CD.

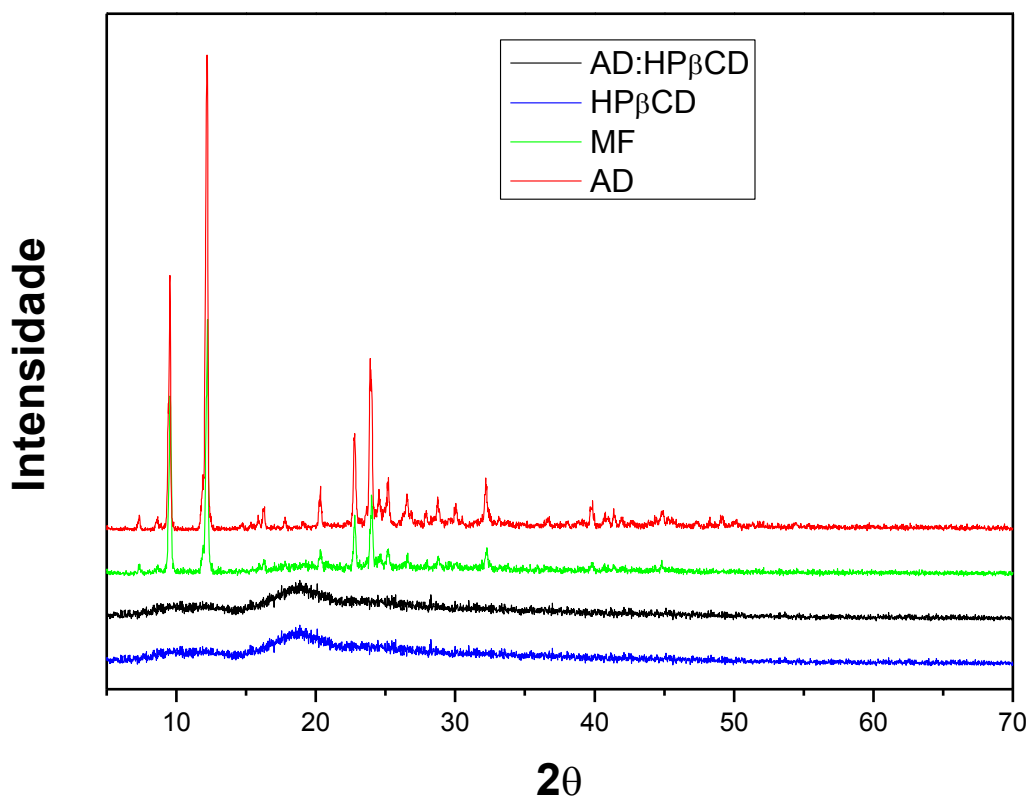


Figura 3.4 Padrões de difração de raios-X para o complexo de inclusão (AD:HP β CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), mistura física (MF) e o ácido difractáico (AD).

O padrão de difração de raios-X do ácido difractáico revelou picos pontiagudos, que são característicos de compostos com caráter cristalino, enquanto um pico largo foi gerado para a HP β CD, comprovando seu estado amorfo. Já a mistura física exibiu picos característicos do ácido difractáico e da HP β CD, sendo importante observar que estes picos resultaram da combinação destes componentes analisados separadamente, não havendo a formação de complexo através da mistura física. Pode-se verificar ainda que no padrão da mistura física os picos apresentaram um decréscimo em sua intensidade, provavelmente devido ao caráter amorfo desta ciclodextrina. Por outro lado, o padrão de difração de raios-X do complexo de inclusão AD:HP β CD foi caracterizado apenas por picos de difração largos, onde não é possível distinguir os picos característicos do AD. Estes resultados podem sugerir que o ácido difractáico não é mais presente como um material cristalino, e sim, que o

complexo sólido existe no estado amorfo, tendo este fato já sido observado em outros fármacos hidrofóbicos (Figueiras et al., 2007). Estes resultados revelam a produção de um estado amorfo do fármaco no produto liofilizado, como uma consequência das interações do fármaco com a ciclodextrina no estado sólido e da perda de cristalinidade, sendo um indicativo de possível formação de um complexo de inclusão (Pralhad e Rajendrakumar, 2004; Spamer et al., 2002).

3.5.3 Caracterização físico-química das microesferas

Para a obtenção das microesferas de PCL contendo AD, foi realizado inicialmente um estudo com diferentes razões fármaco:polímero, sendo mantida constante a massa do polímero PCL (225 mg) e variando-se a massa de AD (10 - 20 mg). Os parâmetros eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v) e polidispersão (*span*) foram avaliados e encontram-se descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v) e polidispersão (*span*) de microesferas de PCL (225 mg) contendo AD em diferentes razões fármaco:polímero.

Razão Fármaco:Polímero AD:PCL	Eficiência de Encapsulação $\pm$ D.P.* (%)	$d_v \pm$ D.P. (μ m)	<i>span</i>
1:11 ^a	58,33 $\pm$ 0,08	5,23 $\pm$ 1,65	1,00
1:15 ^b	39,13 $\pm$ 0,40	4,55 $\pm$ 3,22	1,65
1:22 ^c	16,05 $\pm$ 0,19	4,41 $\pm$ 0,12	1,28

^a 20 mg de AD; ^b 15 mg de AD e ^c 10 mg de AD. * D.P.

O AD foi encapsulado nas microesferas de PCL com uma eficiência de encapsulação variando entre 16,05 $\pm$ 0,19% (10 mg de AD) e 58,33 $\pm$ 0,08% (20 mg de AD). Um aumento da eficiência de encapsulação foi observado com o aumento da massa do fármaco. Balmayor e colaboradores (2009) também observaram aumento da eficiência de encapsulação da dexametasona (de 74,99% para 93,65%) em microesferas de PCL (com 525,3 μ m), quando a concentração do fármaco foi aumentada pela modificação da razão fármaco:polímero de 1:20 para 1:5.

Neste estudo, também foi verificado o aumento no tamanho de partícula quando a razão fármaco:polímero passou de 1:22 para 1:11 (de 4,41 $\pm$ 0,12 para 5,23 $\pm$ 1,65,

respectivamente). As microesferas de PCL com tamanhos de partícula maiores encapsularam mais efetivamente o AD. Benoit et al. (1999) também obtiveram dados semelhantes para a albumina de soro bovino (BSA) encapsulada em microesferas de PCL. As microesferas de PCL contendo BSA apresentaram tamanho de partícula variando entre 5 e 10 μm , mas sua eficiência de encapsulação máxima foi de 30%. Le Ray e colaboradores (2003) obtiveram uma eficiência de encapsulação de 57,28% para microesferas contendo vancomicina, enquanto Pérez e colaboradores (2000) relataram eficiência de 57% para microesferas de PCL contendo propranolol, equiparando-se à obtida neste estudo (58,33%) para as microesferas de AD (Micro-AD) de razão 1:11.

O valor de *span* obtido para as microesferas de razão 1:15 e 1:22 sugerem amostras heterogêneas, uma vez que foi maior que 1,00 (1,65 e 1,28, respectivamente), enquanto que as microesferas de PCL de razão 1:11 apresentaram valor de *span* igual a 1,00, sugerindo microesferas homogêneas (Ribeiro-Costa et al., 2009).

Com base nos resultados obtidos no estudo com diferentes razões fármaco:polímero, o complexo de inclusão AD:HP β CD 1:1 (mol/mol) foi encapsulado na formulação de microesferas de PCL na razão fármaco:polímero 1:11. A Tabela 3.4 mostra as propriedades de eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v), polidispersão (*span*) e potencial zeta (ζ) das microesferas de PCL contendo AD:HP β CD (Micro-AD:HP β CD) comparadas aos sistemas contendo somente AD e à formulação placebo.

Tabela 3.4 Eficiência de encapsulação, tamanho médio de partícula (d_v), polidispersão (*span*) e potencial zeta (ζ) de microesferas de PCL (225 mg) na razão fármaco:polímero 1:11.

Fármaco:Polímero (1:11)	Eficiência de Encapsulação $\pm$ D.P.* (%)	$d_v \pm$ D.P. (μm)	<i>span</i>	Potencial Zeta (ζ) $\pm$ D.P. (mV)
Placebo	-	5,89 $\pm$ 1,33	0,97	- 12,68 $\pm$ 0,56
AD:HP β CD	41,87 $\pm$ 0,12	4,11 $\pm$ 1,39	1,89	- 6,93 $\pm$ 0,46
AD	58,33 $\pm$ 0,08	5,23 $\pm$ 1,65	1,00	- 7,85 $\pm$ 0,32

* D.P.

Os complexos de inclusão não modificaram em muito a eficiência de encapsulação do AD nas microesferas de PCL, havendo uma redução deste parâmetro provavelmente por perdas de massa transferidas para a emulsão aquosa externa devido a sua natureza mais hidrossolúvel quando comparado ao AD não complexado. Isto pode ser explicado pela

natureza mais hidrofílica do complexo de inclusão quando comparado ao fármaco livre, podendo se difundir mais facilmente para a fase aquosa externa durante a preparação das microesferas (Trapani et al., 2003).

Wang e colaboradores (2009) também observaram diminuição da eficiência de encapsulação para a rodamina (usada como um modelo de fármaco hidrossolúvel) quando encapsulada em microesferas de PCL visto a relativa hidrofobicidade do polímero. Quanto maior a afinidade entre fármaco e o polímero maior a tendência do fármaco ser incorporado à matriz polimérica (Ruan et al., 2002; Zhou et al., 2004). Uma diminuição na eficiência de encapsulação também foi encontrada por Maestrelli e colaboradores (2008) quando incorporaram o complexo de inclusão de cetoprofeno com HP β CD em microesferas de PLGA.

O uso dos complexos de inclusão produziu microesferas menores ($4,11 \pm 1,39 \mu\text{m}$), talvez associadas à menor agregação das partículas durante o processo de liofilização pela contribuição do efeito crioprotetor da HP β CD (Abdelwahed et al., 2006). No entanto, houve um aumento no valor de *span* das Micro-AD:HP β CD (1,89) quando comparado ao *span* das Micro-AD (1,00), sugerindo uma população heterogênea, uma vez que o valor foi maior que 1,00 (Ribeiro-Costa et al., 2009).

O potencial zeta (ζ) das microesferas de PCL da formulação placebo, das Micro-AD e das Micro-AD:HP β CD (Tabela 3.4) revelou que os valores do potencial zeta das Micro-AD e Micro-AD:HP β CD tornaram-se menos negativos em relação às microesferas de PCL placebo ($\zeta = -12,68 \pm 0,56 \text{ mV}$), com o menor valor em módulo para as microesferas contendo o complexo de inclusão AD:HP β CD ($\zeta = -6,93 \pm 0,46 \text{ mV}$). Esse fenômeno pode estar associado provavelmente à presença de moléculas do fármaco adsorvidas na parede polimérica das microesferas, o que pode influenciar na carga de superfície (Wischke e Schwendeman, 2008).

3.5.4 Cinética de liberação *in vitro*

Os perfis de liberação do AD e AD:HP β CD a partir das microesferas de PCL durante 5 dias em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C, estão demonstrados na Figura 3.5. Os símbolos representam os dados experimentais medidos e as curvas representam o ajuste do modelo matemático de Fick ($M_t/M_\infty = (1-k_1 e^{-k_2 t})$). Como pode ser observado, uma boa adequação entre os dados teóricos e os experimentais foi obtida ($r \geq 0,99$). Isto indica que o mecanismo de difusão simples está envolvido no mecanismo de transporte de massa dos sistemas microparticulados.

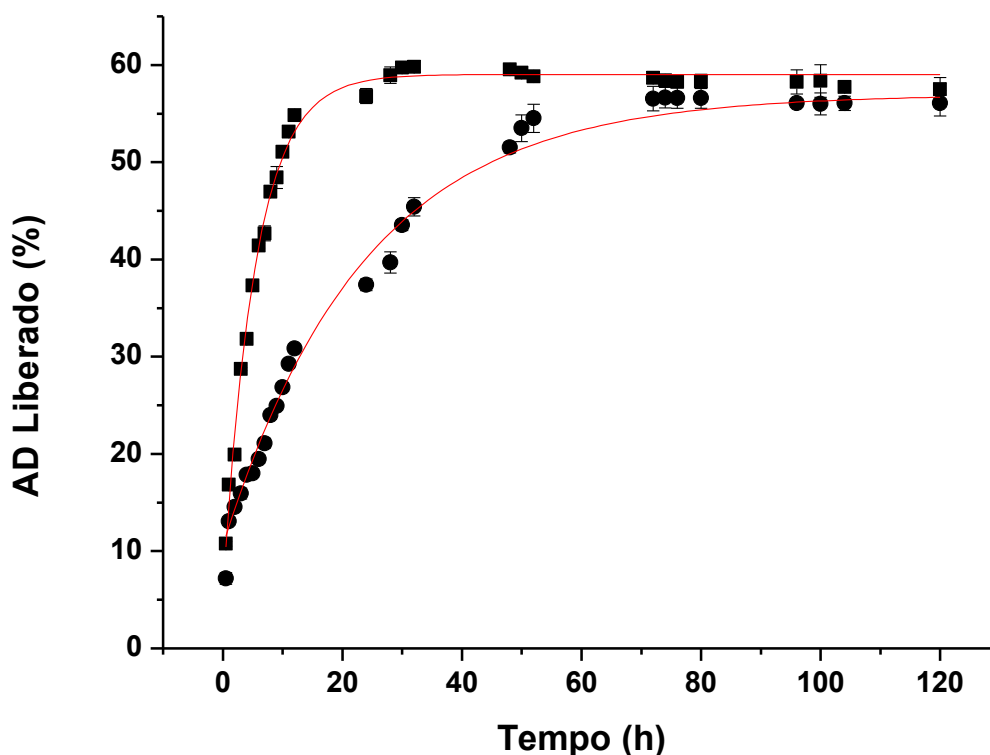


Figura 3.5 Cinética de liberação *in vitro* do AD (■) e do complexo de inclusão AD:HPβCD (●) a partir das microesferas de PCL, em tampão pH 7,4 a 37 °C. Cada ponto representa a média de três diferentes experimentos $\pm$ D.P. As linhas representam o ajuste ao modelo de difusão não linear Fickiano.

Os parâmetros calculados das cinéticas estão resumidos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Efeito *burst* (1h) e parâmetros cinéticos de liberação (k_1 e k_2) para microesferas de PCL contendo AD e contendo complexo de inclusão AD:HPβCD.

Formulações	Efeito <i>burst</i> % (1h)	Modelo exponencial $M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$		Percentual total de AD liberado (%)
		k_1	$k_2 (h^{-1})$	
Micro-AD	$16,84 \pm 0,40$	$0,902 \pm 0,012$	$0,183 \pm 0,005$	$58,93 \pm 0,84$
Micro-AD:HPβCD	$13,06 \pm 0,16$	$0,814 \pm 0,007$	$0,042 \pm 0,001$	$56,54 \pm 1,45$

Ambas as formulações de microesferas demonstraram um padrão de liberação bifásico caracterizado por um efeito *burst* inicial seguido por uma etapa de liberação controlada com diferentes valores de k_2 e de taxa de liberação. Para as microesferas contendo apenas AD, foi verificado um maior efeito *burst* ($16,84 \pm 0,40\%$), na primeira hora da cinética, em relação às microesferas contendo o complexo de inclusão HP β CD ($13,06 \pm 0,16\%$). Este período foi seguido por um estágio de liberação controlada durante 12 h pelas Micro-AD liberando cerca de 55% do fármaco. Por outro lado, as Micro-AD:HP β CD liberaram aproximadamente 45% em 32 h.

Diante destes dados, pode-se sugerir que as Micro-AD:HP β CD obtiveram uma maior eficácia na etapa de liberação controlada em relação às Micro-AD, onde a mesma permaneceu em liberação controlada por um período mais longo. Porém, não houve diferenças estatísticas entre o percentual total liberado entre as duas formulações ($p < 0,05$; $t_{cal} = 2,72$).

A difusão é conhecida por ser o mecanismo dominante neste tipo de sistema de liberação de fármacos (Klose et al., 2008). Com base nos cálculos de modelagem matemática, a constante k_2 (constante de associação de difusão aparente) das Micro-AD:HP β CD obteve valores menores ($k_2 = 0,042 \pm 0,001$) quando comparados aos valores apresentados pelas Micro-AD ($k_2 = 0,183 \pm 0,005$). Isto pode indicar uma menor mobilidade do fármaco quando associado à HP β CD dentro da malha polimérica. Este fato pode ser atribuído à interação do complexo de inclusão com o polímero, o que reduz efetivamente a difusibilidade aparente do fármaco como descrito previamente na literatura para outros compostos associados à ciclodextrinas (Fernandes et al., 2007; Quaglia et al., 2003).

Tem sido relatado que a solubilidade e difusibilidade de um fármaco podem ser modificadas quando complexos de inclusão são incorporados às matrizes poliméricas, alterando o perfil de liberação do fármaco a partir do dispositivo polimérico (Trapani et al., 2003; Bibby et al., 2000). Como observado neste estudo, a HP β CD foi capaz de modificar o perfil de liberação do AD, com a etapa de liberação controlada do fármaco tendo sido mantida durante um maior período de tempo (32 h). De acordo com De Rosa e colaboradores (2002), a natureza mais hidrofílica do complexo facilita a interação da matriz polimérica com o meio aquoso. Portanto, a complexação do AD com HP β CD influenciou a liberação inicial, o estágio de liberação controlada e o total de fármaco liberado.

3.5.5 Avaliação da citotoxicidade dos complexos de inclusão AD:HP β CD e das microesferas contendo AD e complexo de inclusão AD:HP β CD frente a células Vero

O ácido difractáico nas concentrações de 6,5 μ g/mL, 13 μ g/mL, 26 μ g/mL e 52 μ g/mL apresentou uma viabilidade celular de $84,68 \pm 3,7\%$, $69,44 \pm 4,72\%$, $56,99 \pm 3,5\%$ e $46,5 \pm 4,5\%$, respectivamente, frente às células Vero (Figura 3.6).

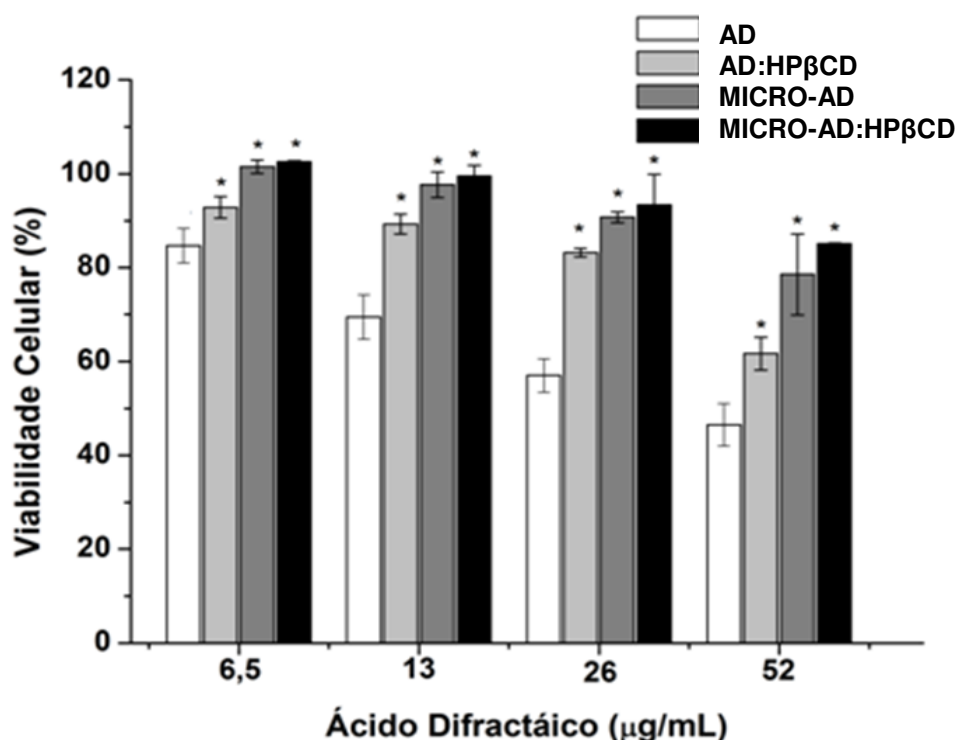


Figura 3.6 Estudo da ação citotóxica do ácido difractáico (AD), do complexo de inclusão (AD:HP β CD), das microesferas contendo ácido difractáico (MICRO-AD) e das microesferas contendo o complexo de inclusão (MICRO-AD:HP β CD) em diferentes concentrações (6,5; 13; 26 e 52 μ g/mL) frente a células Vero. *Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao ácido difractáico ($p < 0,05$).

Conforme estes dados, uma relevante ação citotóxica foi evidenciada quando estas células foram incubadas com 52 μ g/mL do ácido difractáico, onde o mesmo promoveu uma inibição do crescimento celular em $46,5 \pm 4,5\%$. Quando as mesmas células foram incubadas a uma concentração de 6,5 μ g/mL do composto estudado, o mesmo não apresentou efeito citotóxico ($84,68 \pm 3,7\%$). Dessa forma, observa-se que o aumento da concentração deste metabólito liquênico proporciona uma redução da viabilidade celular, revelando assim um

efeito dose dependente. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a IC₅₀ do ácido difractáico frente às células Vero situou-se em torno de 52 µg/mL. Este efeito também foi relatado por Freire e colaboradores (2005), em avaliação citotóxica do pentaclorofenol frente a células Vero através do ensaio de vermelho neutro, com IC₅₀ (concentração requerida para inibir 50% do crescimento celular) de 5,5 µm.

A complexação do ácido difractáico com a HPβCD reduziu a citotoxicidade do composto, onde a menor viabilidade celular do AD:HPβCD foi alcançada também na dose de 52 µg/mL, sendo de 61,66 ± 3,4%. Nas concentrações de 6,5 µg/mL, 13 µg/mL, 26 µg/mL, a viabilidade celular obtida foi de 92,81 ± 2,29%, 89,29 ± 2,14% e 83,19 ± 0,94%, respectivamente, sendo maior que a apresentada pelo ácido difractáico isolado. Conforme os resultados obtidos, verificou-se que a complexação do AD com a HPβCD proporcionou a diminuição do efeito tóxico do ácido difractáico, sendo esta uma das propriedades atribuídas aos complexos de inclusão (Del Valle, 2004; Devarakonda et al., 2005). Este resultado condiz com o descrito por Cavalli e colaboradores (2009), que investigaram a citotoxicidade do aciclovir conjugado à beta-ciclodextrina e encapsulado em nanopartículas. Tanto o aciclovir complexado quanto o encapsulado não exibiram efeitos citotóxicos significativos sobre as células Vero, como evidenciado pelo método de MTT.

As formulações de microesferas contendo o ácido difractáico (Micro-AD) e complexo de inclusão AD:HPβCD (Micro-AD:HPβCD) não apresentaram efeito citotóxico quando comparadas ao ácido difractáico. Nas concentrações de 6,5 µg/mL, 13 µg/mL, 26 µg/mL e 52 µg/mL, a viabilidade celular obtida para as Micro-AD foi de 101,49 ± 1,39%, 97,65 ± 2,77%, 90,75 ± 1,19% e 78,53 ± 8,66%, respectivamente, enquanto que para as Micro-AD:HPβCD, os valores foram de 102,57 ± 0,2%, 99,50 ± 2,29%, 93,37 ± 6,51% e 85,07 ± 0,19%. Os dados apresentados demonstraram que a encapsulação do AD e do AD:HPβCD em microesferas de PCL diminuiu a ação citotóxica do ácido difractáico, e que o PCL não mostrou-se tóxico, sendo adequado para o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos (Sinha et al., 2004). Os valores de viabilidade celular acima de 100% apresentados para a dose de 6,5 µg/mL podem ser explicados devido ao fato de que, por não serem citotóxicas nesta dose, as Micro-AD e as Micro-AD:HPβCD permitiram o crescimento das células Vero durante o período de realização dos testes (Bencini et al., 2008).

Estes ensaios evidenciaram, portanto, que além da complexação, o uso de sistemas de liberação controlada como microesferas foi capaz de reduzir a citotoxicidade do ácido difractáico frente a células Vero.

3.6 Conclusões

No presente estudo, verificou-se que a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina foi capaz de aumentar em mais de 35 vezes a solubilidade do ácido difractáico. Foram obtidos complexos de inclusão ácido difractáico:2:hidroxipropil- β -ciclodextrina através da técnica de liofilização, o que pode ser sugerido através dos resultados das análises de IV, RMN ^1H e difração de raios-X. As microesferas de PCL contendo ácido difractáico ou complexo de inclusão AD:HP β CD, preparadas através da técnica de emulsão múltipla A/O/A seguida de evaporação de solvente, apresentaram escala micrométrica e carga de superfície negativa. O AD foi encapsulado com sucesso nas microesferas de PCL, com a maior eficiência de encapsulação na razão fármaco:polímero 1:11. Através do estudo de cinética de liberação *in vitro*, verificou-se que o encapsulamento do AD:HP β CD nas microesferas resultou em uma modulação da cinética de liberação do AD. Desta forma, microesferas contendo AD:HP β CD apresentaram um perfil de liberação mais prolongada de ácido difractáico quando comparadas às microesferas de AD. Microesferas contendo AD ou complexo de inclusão AD:HP β CD reduziram a citotoxicidade do composto frente a células Vero, comprovando que a encapsulação de compostos liquênicos lipofílicos complexados a ciclodextrinas em microesferas torna-se, portanto, uma excelente alternativa para superar as limitações relacionadas à solubilidade do ácido e promover uma diminuição de seus efeitos indesejáveis, garantindo maior segurança e eficácia terapêutica.

Agradecimentos

Silva agradece à FACEPE pelo suporte financeiro na forma de bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado. Esta pesquisa teve suporte financeiro parcial do CNPq.

3.7 Referências Bibliográficas

Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Fessi, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006;63:87-94.

Balmayor, E.R.; Tuzlakoglu, K.; Azevedo, H.S.; Reis, R.L. Preparation and characterization of starch-poly-ε-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomater.*, 2009;5:1035-1045.

Bayir, Y.; Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Aslan, A.; Suleyman, H.; Halici, M.; Kazaz, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative, stress and neutrophilic-infiltration in rats by the lichen constituent difractaic acid. *Phytomed.*, 2006;13:584-590.

Bencini, M.; Ranucci, E.; Ferruti, P.; Trotta, F.; Donalisio, M.; Cornaglia, M.; Lembo, D.; Cavalli, R. Preparation and in vitro evaluation of the antiviral activity of the Acyclovir complex of a β-cyclodextrin/poly(amidoamine) copolymer. *J. Control. Release*, 2008;126:17-25.

Benoit, M.-A.; Baras, B.; Gillard, J. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ε-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *Inter. J. Pharm.*, 1999;184:73-84.

Bibby, D.C.; Davies, N.M.; Tucker, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 2000;197:1-11.

Brannon-Peppas, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 1995;116:1-9.

Brewster, M.E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2007;59:645-666.

Cavalli, R.; Donalisio, M.; Cibra, A.; Ferruti, P.; Ranucci, E.; Trotta, F.; Lembo, D. Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into β-cyclodextrin-poly(4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. *J. Control. Release*, 2009;137:116-122.

De Araújo, M.V.G.; Vieira, E.K.B.; Lázaro, G.S.; Conegero, L.S.; Almeida, L.E.; Barreto, L.S.; Da Costa Jr., N.B.; Gimenez, I.F. Sulfadiazine/hydroxypropyl-β-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorgan. Med. Chem.*, 2008;16:5788-5794.

De Rosa, G.; Larobina, D.; La Rotonda, M.I.; Musto, P.; Quaglia, F.; Ungaro, F. How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based

microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. J. Control. Release, 2005;102:71-83.

De Rosa, G.; Quaglia, F.; La Rotonda, M.I.; Appel, M.; Alphandary, H.; Fattal, E. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the controlled release of oligonucleotide/polyethylenimine complexes. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002;91:790-799.

Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. Proceed. Biochem., 2004;39:1033-1046.

Devarakonda, B.; Hill, R.A.; Liebenberg, W.; Brits, M.; Villiers, M.M. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. Int. J. Pharm., 2005;304:193-209.

Dotsikas, Y.; Loukas, Y.L. Inclusional complex study between 6-ptoluidinylnaphthalene-2-sulfonate and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. J. Biochem. Biophys. Methods, 2002;52:121-134.

Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; Ponchel, G. Cyclodextrins and carrier systems. J. Control. Release, 1999;62:263-268.

Falcão, E.P.S.; Silva, N.H.; Gusmão, N.B.; Ribeiro, S.M.; Pereira, E.C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. Acta Bot. Bras., 2004;18:911-918.

Fernandes, V.C.; Denadal, A.M.L.; Millán, R.D.S.; Alves, R.J.; Cunha Júnior, A.S. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil- β -ciclodextrina e insulina:hidroxipropil- β -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007;43:543-553.

Fernández-Carballido, A.; Pastoriza, P.; Barcia, E.; Montejo, C.; Negro, S. PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. Int. J. Pharm., 2008;352:50-57.

Figueiras, A.; Carvalho, R.A.; Ribeiro, L.; Torres-Labandeira, J.J.; Veiga, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. Eur. J. Pharm. and Biopharm., 2007;67:531-539.

Freiberg, S.; Zhu, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. Int. J. Pharm., 2004;282:1-18.

Freire, P.F.; Labrador, V.; Pérez, J.M.; Martín, Hazen, M.J. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*, 2005;210:37-44.

Garbayo, E.; Ansorena, E.; Lanciego, J.L.; Aymerich, M.S.; Blanco-Prieto, M.J. Sustained release of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor from biodegradable polymeric microspheres. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 2008;69:844-851.

García-Zubiri, I.X.; González-Gaitano, G.; Sánchez, M.; Isasi, J.R. FITIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin. *Vibrat.Spectrosc.*, 2003;33:205-213.

Higuchi, T.; Connors, K.A. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 1965;4:117-212.

Honda, N. K.; Vilegas, W. Química dos líquens-Divulgação. *Química Nova*, São Paulo, 1998;21:110-125.

Honda, N.K.; Pavan, F.R.; Coelho, R.G.; Andrade-Leite, S.R.; Michelleti, A.C.; Lopes, T.I.B; Misutsu, M.Y.; Beatriz, A.; Brum, R.L.; Leite, C.Q.F. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomed.*, 2010;17:328-332.

Huneck, S.; Yoshimura, I. Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 251 p, 1996.

Ito, F.; Fujimori, H.; Honnami, H.; Kawakami, H.; Kanamura, K.; Makino, K. Study of types and mixture ratio of organic solvent used to dissolve polymers for preparation of drug-containing PLGA microspheres. *Eur. Polym. J.*, 2009;45:658-667.

Klose, D.; Siepmann, F.; Elkharraz, K.; Siepmann, J. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *Int. J. Pharm.*, 2008;354:95-103.

Kristmundsdóttir, T.; Jónsdóttir, E.; Ögmundsdóttir H.M.; Ingólfssdóttir, K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005;24:539-543.

Kumar, S.; Müller, K. Depsideos as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCat cell growth.1. Novel analogues of barbatic and difractaic. *Europ. J. Med. Chem.*, 1999b;34:1035-1042.

Kumar, S.; Müller, K. Lichen metabolite I. inhibitory action against leukotriene B4, Biosynthesis by a non-redox mechanism. *J. Nat. Prod.*, 1999a;62:821-823.

Le Ray, A.-M.; Chiffolleau, S.; looss, P.; Grimandi, G.; Gouyette, A.; Daculsi, G.; Merle, C. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. *Biomaterials*, 2003;24:443-449.

Lecaroz, C.; Amazo, C.; Renedo, M.J.; Blanco-Prieto, M.J. Biodegradable micro-and nanoparticles as long-term delivery vehicles for gentamicin. *J. Microencapsul.*, 2006;23:782-792.

Lira, M.C.B.; Ferraz, M.S.; Silva, D.G.V.C.; Cortes, M.E.; Teixeira, K.I.; Caetano, N.P.; Sinisterra, R.D.; Ponchel, G.; Santos-Magalhães, N.S. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2009;64:215-224.

Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.*, 2007;329:1-11.

Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.*, 2005;302:18-28.

Maestrelli, F.; Zerrouk, N.; Cirri, M.; Mennini, N.; Mura, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008;34:1-11.

Mao, S.; Shi, Y.; Li, L.; Xu, J.; Schaper, A.; Kissel, T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 2008;68:214-223.

Morais, W.A.; Costa, M.; Paixão, A.D.O.; Maciel, M.A.M.; Santos-Magalhães, N.S. Encapsulation and release characteristics of DCTN/PLGA microparticles. *J. Microencapsul.*, 2009;26:529-534.

Nakanishi, K. Infrared absorption spectroscopy. Practical. Tokyo: Nankodo Company Limited/Holden-Day, 233p, 1964.

Nalawade, P.; Kadam, V.; Hirlekar, R. Study of inclusion complexes of valsartan with β -cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin. *J. Sci. Ind. Research*, 2010;69:295-299.

Nasongkla, N.; Wiedmann, A.F.; Bruening, A.; Beman, M.; Ray, D.; Bommann, W.G.; Boothman, D.A.; Gao, J. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.*, 2003;20:1626-1633.

Neamati, N.; Hong, H.; Mazunder, A.; Wang, S.; Sunder, S.; Nicklaus, M.C.; Milne, G.W.A.; Proksa, B.; Pommier, Y. Depsides and depsidones, as inhibition of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibition through 3D databases searching. *J. Med. Chem.*, 1997;40:942-951.

Okuyama, E.; Umeyama, K.; Yamazaki, M.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y. Usnic acid and difractaic acid as analgesic and antipiretic components of *Usnea difracta*. *Planta Med.*, 1995;61:113-115.

Pérez, M.H.; Zinutti, C.; Lamprecht, A.; Ubrich, N.; Astier, A.; Hoffman, M.; Bodmeier, R.; Maincent, P. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J. Control. Release*, 2000;65:429-438.

Piovano, M.; Garbarino, J.A.; Giannini, F.A.; Correche, E.R.; Feresin, G.; Tapia, A.; Zacchino, S.; Enriz, R.D. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 2002;47:235-240.

Pralhad, T.; Rajendrakumar, K. Study of freeze-dried quercetincyclodextrinbinary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 2004;34:333-339.

Quaglia, F.; De Rosa, G.; Granata, E.; Ungaro, F.; Fattal, E.; La Rotonda, M.I. Feeding liquid non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by spray-drying. *J. Control. Release*, 2003;86:267-278.

Ribeiro-Costa, R.M.; Alves, A.J.; Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Gonçalves, E.C.P.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos - Magalhães, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J. Microencapsul.*, 2004;21:371-384.

Ribeiro-Costa, R.M.; Cunha, M.R.; Gongora-Rubio, M.R.; Michaluart-Júnior, P.; Ré, M.I. Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by an emulsion/solvent evaporation process employing LTCC micromixers. *Powder Technol.*, 2009;190:107-111.

Ruan, G.; Feng, S-S.; Li, Q-T. Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. *J. Control. Release*, 2002;84:151-160.

Santos, L.C.; Honda, N.K.; Carlos, I.Z.; Vilegas, W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoterapia*, 2004;75:473-479.

Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Silva, J.F.; Pereira, E.C.G.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos-Magalhães, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 2005;15:355-361.

Santos-Magalhães, N.S.; Pontes, A.; Pereira, V.M.W.; Caetano, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, 2000;208:71-80.

Sathigari, S.; Chadha, G.; Lee, Y-H.P.; Wright, N.; Parsons, D.L.; Rangari, V.K.; Fasina, O.; Babu, R.J. Physicochemical characterization of efavirenz–cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Sci. Tech.*, 2009;10:1-10.

Schwingel, L.; Fasolo, D.; Holzschuh, M.; Lula, I.; Sinisterra, R.; Koester, L.; Teixeira, H.; Bassani, V. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and *ex vivo* skin permeation studies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2008;62:149-159.

Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R. Trehan, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.*, 2004;278:1-23.

Spamer, E.; Müller, D.G.; Wessels, P.L.; Venter, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002;16:247-253.

Trapani, G.; Lopedota, A.; Boghetich, I.; Latrofa, A.; Franco, M.; Sanna, E.; Liso, G. Encapsulation and release of the hypnotic agent zolpidem from biodegradable polymer microparticles containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, 2003;268:47-57.

Vlachou, M.; Papaioannou, G. Preparation and characterization of the inclusion complex of furosemide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Biomater. Appl.*, 2003;17:197-206.

Wang, X.; Wang, Y.; Wei, K.; Zhao, N.; Zhang, S.; Chen, J. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and *in vitro* release. *J. Mater. Process. Tech.*, 2009;209:348-354.

Wilson, C.O.; Gisvold, O.; Delgado, J.N.; Remers, W.A. Textbook of organic medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Philadelphia: Lippincott Raven, 100p, 1998.

Wischke, C.; Schwendeman, S.P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.*, 2008;364:298-327.

Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Kinoshita, Y.; Higuchi, M.; Yamada, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichen and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter induced Epstein Bar virus activation. *Chem. Pharma. Bull.*, 1995;43:1388-1390.

Zhou, S.; Deng, X.; Xiaohong, L.; Wenxiang, J.I.A.; Liu, L. Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2004;91:1848-1856.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Em síntese, primeiramente foi desenvolvido neste estudo um método de espectrofotometria UV exato, preciso e reprodutível para a quantificação do ácido difractáico em matéria-prima e em microesferas de PCL, onde os parâmetros de validação foram determinados segundo diretrizes internacionais de padronização.

Através do estudo de solubilidade de fases do ácido difractáico em HP β CD, foi verificado que o AD apresentou uma curva de solubilidade do tipo A_L , com constante de estabilidade de $K_{1:1} = 821 \text{ M}^{-1}$. A presença de 50 mM de HP β CD aumentou em cerca de 35 vezes a solubilidade do ácido difractáico em relação à sua solubilidade em água, demonstrando que houve uma relação linear entre as concentrações do ácido difractáico e da ciclodextrina. Foram obtidos complexos de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina pelo método de liofilização. Nas análises de caracterização físico-química dos complexos puderam ser observadas variações nos espectros de infravermelho, ressonância magnética nuclear de prótons e difração de raios-X quando comparados aos espectros do ácido difractáico e da HP β CD em separado, sugerindo que houve interação entre os compostos.

Foram obtidas microesferas de PCL através da técnica de emulsão múltipla A/O/A com evaporação do solvente, as quais se apresentaram em escala micrométrica, com carga de superfície negativa.

Na cinética de liberação *in vitro* a encapsulação do complexo de inclusão AD:HP β CD modificou o perfil de liberação de ácido difractáico a partir das microesferas, com o aumento do percentual do fármaco liberado e um controle mais efetivo da velocidade de liberação. Desta forma, microesferas contendo AD:HP β CD apresentaram um perfil de liberação mais prolongado de ácido difractáico quando comparadas às microesferas contendo somente AD, tendo influenciado a liberação inicial, o estágio de liberação controlada e o total de fármaco liberado. Esse resultado pode estar relacionado à natureza mais hidrofílica do complexo, que facilita a interação da matriz polimérica com o meio aquoso.

Na avaliação da citotoxicidade, verificou-se que as microesferas contendo ácido difractáico e o complexo de inclusão AD:HP β CD reduziram a citotoxicidade do composto frente a células Vero, comprovando portanto que a complexação do ácido difractáico à ciclodextrina e sua incorporação em sistemas de liberação controlada, como microesferas,

são uma excelente alternativa para superar as limitações relacionadas à solubilidade deste composto, melhorando sua estabilidade e promovendo a diminuição de seus efeitos tóxicos, garantindo assim maior segurança e eficácia terapêutica.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.63, p.87-94, 2006.

ANVISA. 2003. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 17 de abril de 2009.

BALMAYOR, E.R.; TUZLAKOGLU, K.; AZEVEDO, H.S.; REIS, R.L. Preparation and characterization of starch-poly-ε-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. **Acta Biomater.**, v.5, p.1035-1045, 2009.

BARAT, A.; CRANE, M.; RUSKIN, H.J. Quantitative multi-agent models for simulating protein release from PLGA bioerodible nano- and microspheres. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v.48, p.361-368, 2008.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative, stress and neutrophilic-infiltration in rats by the lichen constituent difractaic acid. **Phytomed.**, v.13, p.584-590, 2006.

BENCINI, M.; RANUCCI, E.; FERRUTI, P.; TROTTA, F.; DONALISIO, M.; CORNAGLIA, M.; LEMBO, D.; CAVALLI, R. Preparation and in vitro evaluation of the antiviral activity of the Acyclovir complex of a β-cyclodextrin/poly(amidoamine) copolymer. **J. Control. Release**, v.126, p.17-25, 2008.

BENOIT, M.-A.; BARAS, B.; GILLARD, J. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ε-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. **Inter. J. Pharm.**, v.184, p.73-84, 1999.

BERKLAND, C.; KIM, K.K.; PACK, D.W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and nanodisperse size distributions. **J. Control. Release**, v.73, p.59-74, 2001.

BIBBY, D.C.; DAVIES, N.M.; TUCKER, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v.197, p.1-11, 2000.

BIRNBAUM, D.T.; KOSMALA, J.D.; HENTHORN, D.B.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of β-estradiol from PLGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. **J. Control. Release**, v.65, p.375-387, 2000.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v.116, p.1-9, 1995.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.59, p.645-666, 2007.

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

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **Int. J. Pharm.**, v.153, p.41-50, 1997.

CAVALLI, R.; DONALISIO, M.; CIVRA, A.; FERRUTI, P.; RANUCCI, E.; TROTTA, F.; LEMBO, D. Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into β -cyclodextrin-poly(4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. **J. Control. Release**, v.137, p.116-122, 2009.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.6, p.329-357, 2005.

CHANG, R.K.; PRICE, J.C.; WHITWORTH, C.W. Dissolution characteristics of poly (ϵ -caprolactone)-polylactide microspheres of chlorpromazine. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.12, p.2355-2380, 1986.

CHENG, L.; GUO, S.; WU, W. Characterization and *in vitro* release of praziquantel from poly(ϵ -caprolactone) implants. **Int. J. Pharm.**, v.377, p.112-119, 2009.

CHOUDHARY, M.I.; AZIZUDDIN; JALIL, S.; ATTA-UR-RAHMAN. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. **Phytochem.**, v.66, p.2346-2350, 2005.

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

COCERO, M.J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **J. Supercrit. Fluid.**, v.47, p.546-555, 2009.

CONNORS, K.A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. **Chem. Rev.**, v.97, p.1325-1358, 1997.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, p.1-9, 2007.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.3, p.1023-1035, 2004.

DE ARAÚJO, M.V.G.; VIEIRA, E.K.B.; LÁZARO, G.S.; CONEGERO, L.S.; ALMEIDA, L.E.; BARRETO, L.S.; DA COSTA JR., N.B.; GIMENEZ, I.F. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. **Bioorgan. Med. Chem.**, v.16, p.5788-5794, 2008.

DE PAULA, D.; OLIVEIRA, D.C.R.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Enhancing effect of modified beta-cyclodextrins on *in vitro* skin permeation of estradiol. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.43, p.111-120, 2007.

DE ROSA, G.; LAROBINA, D.; LA ROTONDA, M.I.; MUSTO, P.; QUAGLIA, F.; UNGARO, F. How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. **J. Control. Release**, v.102, p.71-83, 2005.

DE ROSA, G.; QUAGLIA, F.; LA ROTONDA, M.I.; APPEL, M.; ALPHANDARY, H.; FATTAL, E. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the controlled release of oligonucleotide/polyethylenimine complexes. **J. Pharm. Sci.**, v.91, p.790-799, 2002.

DE SOUSA, F.B.; DENADAI, A.M.L.; LULA, I.S.; LOPES, J.F.; DOS SANTOS, H.F.; DE ALMEIDA, W.B.; SINISTERRA, R.D. Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical study. **Int. J. Pharm.**, v.353, p.160-169, 2008.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Proceed. Biochem.**, v.39, p.1033-1046, 2004.

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

DOAN, T.V.P.; OLIVIER, J.C. Preparation of rifampicin-loaded PLGA microspheres for lung delivery as aerosol by premix membrane homogenization. **Int. J. Pharm.**, v.382, p.61-66, 2009.

DOTSIKAS, Y.; LOUKAS, Y.L. Inclusional complex study between 6-ptoluidinylnaphthalene-2-sulfonate and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.52, p.121-134, 2002.

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

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J.P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.15, p.355-366, 2002.

FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; GUSMÃO, N.B.; RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, E.C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. **Acta Bot. Bras.**, v.18, p.911-918, 2004.

FERNANDES, V.C.; DENADAL, A.M.L.; MILLÁN, R.D.S; ALVES, R.J.; CUNHA JÚNIOR, A.S. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil-β-ciclodextrina e insulina:hidroxipropil-β-ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v.43, p.543-553, 2007.

FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A.; PASTORIZA, P.; BARCIA, E.; MONTEJO, C.; NEGRO, S. PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. **Int. J. Pharm.**, v.352, p.50-57, 2008.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; VEIGA, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified b-cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. and Biopharm.**, v.67, p.531-539, 2007.

FLORINDO, H.F.; PANDIT, S.; GONÇALVES, L.M.D.; ALPAR, H.O.; ALMEIDA, A.J. *Streptococcus equi* antigens adsorbed onto surface modified poly-ε-caprolactone microspheres induce humoral and cellular specific immune responses. **Vaccine**, v.26, p.4168-4177, 2008.

FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. **Int. J. Pharm.**, v.282, p.1-18, 2004.

FREIRE, P.F.; LABRADOR, V.; PÉREZ, J.M.; MARTÍN; HAZEN, M.J. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. **Toxicology**, v.210, p.37-44, 2005.

FREITAS, S.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **J. Control. Release**, v.102, p.313-332, 2005.

GARBAYO, E.; ANSORENA, E.; LANCIEGO, J.L.; AYMERICH, M.S.; BLANCO-PRIETO, M.J. Sustained release of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor from biodegradable polymeric microspheres. **Eur. J. Pharm. and Biopharm.**, v.69, p.844-851, 2008.

GARCÍA-ZUBIRI, I.X.; GONZÁLEZ-GAITANO, G.; SÁNCHEZ, M.; ISASI, J.R. FITIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin. **Vibrat.Spectrosc.**, v.33, p.205-213, 2003.

GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.; TAMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.; SANTIS-ISOLAN, P.M.; OLIVEIRA, R.M; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Acta Cirug. Bras.**, v.21, p.56-65, 2006.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **Eur. J. Pharm. and Biopharm.**, v.69, p.1-9, 2008.

GOMES, A.J.; LUNARDI, C.N.; LUNARDI, L.O.; PITOL, D.L.; MACHADO, A.E.H. Identification of psoralen loaded PLGA microspheres in rat skin by light microscopy. **Micron.**, v.39, p.40-44, 2008.

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

GUPTA, V.K.; DAROKAR, M.P.; SAIKIA, D.; PAL, A.; FATIMA, A.; KHANUJA, S.P.S. Antimycobacterial activity of lichens. **Pharm. Biol.**, v.45, p.200-204, 2007.

HAMOUDEH, M.; FESSI, H. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. **J. Col. and Int. Sci.**, v.300, p.584-590, 2006.

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.**, v.6, p.319-327, 2002.

HASEGAWA, T.; IJIMA, K.; HIROTA, K.; NAKAJIMA, T.; MAKINO, K.; TERADA, H. Exact determination of phagocytic activity of alveolar macrophages toward polymer microspheres by elimination of those attached to the macrophage membrane. **Colloid Surface B**, v.63, p.209-216, 2008.

HERRERO-VANELL, R.; RAMIREZ, L.; FERNANDEZ-CARBALLIDO, A.; REFOLO, M.F. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. **Pharm. Res.**, v.17, p.1323-1328, 2000.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instr.**, v.4, p.117-212, 1965.

HIRLEKAR, R.; KADAM, V. Preparation and characterization of inclusion complexes of carvedilol with methyl- β -cyclodextrin. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v.63, p.219-224, 2009.

HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; HINATA, H.; ITO, F.; INAGAWA, H.; KOCHI, C.; SOMA, G.-I.; MAKINO, K.; TERADA, H. Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages. **J. Control. Release**, v.119, p.69-76, 2007.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. Química dos líquens-Divulgação. **Quím. Nova**, v.21, p.110-125, 1998.

HONDA, N.K.; PAVAN, F.R.; COELHO, R.G.; ANDRADE-LEITE, S.R.; MICHELLETI, A.C.; LOPES, T.I.B; MISUTSU, M.Y.; BEATRIZ, A.; BRUM, R.L.; LEITE, C.Q.F. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomed.**, v.17, p.328-332, 2010.

HUNECK, S. The significance of lichen and their metabolites. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.86, p.559-570, 1999.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of Lichen Substances**. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 251 p, 1996.

ICH Q2 (R1). 2005. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 20 de abril de 2009.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochem.**, v.61, p.729-736, 2002.

ITO, F.; FUJIMORI, H.; HONNAMI, H.; KAWAKAMI, H.; KANAMURA, K.; MAKINO, K. Study of types and mixture ratio of organic solvent used to dissolve polymers for preparation of drug-containing PLGA microspheres. **Eur. Polym. J.**, v.45, p.658-667, 2009.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, p.2475-2490, 2000.

JANORIA, K.G.; MITRA, A.K. Effect of lactide/glycolide ratio on the in vitro release of ganciclovir and its lipophilic prodrug (GCV-monobutyrate) from PLGA microspheres. **Int. J. Pharm.**, v.338, p.133-141, 2007.

KEMPEN, D.H.R.; LU, L.; HEFFERAN, T.E.; CREEMERS, L.B.; MARAN, A.; CLASSIC, K.L.; DHERT, W.J.A.; YASZEMSKI, M.J. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.29, p.3245-3252, 2008.

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; SIEPMANN, J. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. **Int. J. Pharm.**, v.354, p.95-103, 2008.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; ARADÓTTIR, H.A.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H.M. Solubilization of the lichen metabolite usnic acid for testing in tissue culture. **J. Pharm. Pharm.**, v.54, p.1447-1452, 2002.

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

KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M.N.V.; DOMB, A.J. Biodegradable block copolymers. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v.53, p.23-44, 2001.

KUMAR, S.; MÜLLER, K. Depsideos as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCat cell growth.1. Novel analogues of barbatic and difractaic. **Europ. J. Med. Chem.**, v.34, p.1035-1042 1999b.

KUMAR, S.; MÜLLER, K. Lichen metabolite I. inhibitory action against leukotriene B4, Biosynthesis by a non-redox mechanism. **J. Nat. Prod.**, v.62, p.821-823, 1999a.

LE RAY, A.-M.; CHIFFOLEAU, S.; IOOSS, P.; GRIMANDI, G.; GOUYETTE, A.; DACULSI, G.; MERLE, C. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. **Biomaterials**, v.24, p.443-449, 2003.

LECAROZ, C.; AMAZO, C.; RENEDO, M.J.; BLANCO-PRIETO, M.J. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for gentamicin. **J. Microencapsul.**, v.23, p.782-792, 2006.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **Int. J. Pharm.**, v.363, p.26-39, 2008.

LINCE, F.; MARCHISIO, D.L.; BARRESI, A.A. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **J. Col. and Int. Sci.**, v.322, p.505-515, 2008.

LIRA, M.C.B. **Complexo de inclusão Ácido Úsnico: β -Ciclodextrina; Preparação, Caracterização e Nanoencapsulação em Lipossomas.** 2007. 90 p. dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2007.

LIRA, M.C.B.; FERRAZ, M.S.; SILVA, D.G.V.C.; CORTES, M.E.; TEIXEIRA, K.I.; CAETANO, N.P.; SINISTERRA, R.D.; PONCHEL, G.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v.64, p.215-224, 2009.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.**, v.329, p.1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **Int. J. Pharm.**, v.302, p.18-28, 2005.

LU, J.; JACKSON, J.K.; GLEAVE, M.E.; BURT, H.M. The preparation and characterization of anti-VEGFR2 conjugated, paclitaxel-loaded PLLA or PLGA microspheres for the systemic targeting of human prostate tumors. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.61, p.997-1005, 2008.

LUCIANI, A.; COCCOLI, V.; ORSI, S.; AMBROSIO, L.; NETTI, P.A. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. **Biomaterials**, v.29, p.4800-4807, 2008.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.34, p.1-11, 2008.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sci.**, v.1, p.221-241, 1991.

MAIA, M.B.S.; SILVA, N.H.; SILVA, E.F.; CATANHO, M.T.J.; SCHULER, A.R.P.; PEREIRA, E.C. Antinociceptive activity of crude extracts and atranorina obtained from the Lichen *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**, v.21, p.259-264, 2002.

MALZERT-FRÉON, A.; SCHÖNHAMMER, K.; BENOÎT, J-P.; BOURY, F. Interactions between poly(ethylene glycol) and protein in dichloromethane/water emulsions: 2. Conditions required to obtain spontaneous emulsification allowing the formation of bioresorbable poly(D,L Lactic Acid) microparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.73, p.66-73, 2009.

MANDAL, T.K.; BOSTANIAN, L.A.; GRAVES, R.A.; CHAPMAN, S.R.; IDODO, T.U. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.52, p.91-96, 2001.

MAO, S.; SHI, Y.; LI, L.; XU, J.; SCHAPER, A.; KISSEL, T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. **Eur. J. Pharm. and Biopharm.**, v.68, p.214-223, 2008.

MIYAKE, K.; IRIE, T.; ARIMA, H.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K.; HIRANO, M.; OKAMOTO, Y. Characterization of itraconazole:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. **Int. J. Pharm.**, v.179, p.237-245, 1999.

MOGI, T.; OHTAKE, N.; YOSHIDA, M.; CHIMURA, R.; KAMAGA, Y.; ANDO, S.; TSUKAMOTO, T.; NAKAJIMA, T.; UENODAN, H.; OTSUKA, M.; MATSUDA, Y.; OHSHIMA, H.; MAKINO, K. Sustained release of 17 β -estradiol from poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vitro and in vivo. **Colloids Surf. B**, v.17, p.153-165, 2000.

MORAIS, W.A.; COSTA, M.; PAIXÃO, A.D.O.; MACIEL, M.A.M.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Encapsulation and release characteristics of DCTN/PLGA microparticles. **J. Microencapsul.**, v.26, p.529-534, 2009.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by solvent displacement process: influence of composition on physico-chemical and structural properties. **J. Pharm. Sci.**, v.89, p.614-626, 2000.

MOTVANI, S.K.; CHOPRA, S.; AHMAD, F.J.; ROOP, K.K. Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and pharmaceutical formulations. **Spectrochim. Acta A**, v.68, p.250-256, 2007.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.56, p.9-16, 2001.

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

MURATA, N.; TAKASHIMA, Y.; TOYOSHIMA, K.; YAMAMOTO, M.; OKADA, H. Anti-tumor effects of anti-VEGF siRNA encapsulated with PLGA microspheres in mice. **J. Control. Release**, v.126, p.246-254, 2008.

NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy. Practical.** Tokyo: Nankodo Company Limited/Holden-Day, 233p, 1964.

NALAWADE, P.; KADAM, V.; HIRLEKAR, R. Study of inclusion complexes of valsartan with β -cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin. **J. Sci. Ind. Research**, v.69, p.295-299, 2010.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A.F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BORNAMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A.; JINMING, G. Enhancement of solubility and bioavailability of β -lapachone using cyclodextrin inclusion complex. **Pharm. Res.**, v.20, p.1626-1633, 2003.

NEAMATI, N.; HONG, H.; MAZUNDER, A.; WANG, S.; SUNDER, S.; NICKLAUS, M.C.; MILNE, G.W.A.; PROKSA, B.; POMMIER, Y. Depsides and depsidones, as inhibition of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibition through 3D databases searching. **J. Med. Chem.**, v.40, p.942-951, 1997.

OH, I.; LEE, M.; LEE, Y.; SHIN, S.; PARK, I. Spectroscopic characterization of ibuprofen/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Int. J. Pharm.**, v.175, p.215-223, 1998.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic acid and difractaic acid as analgesic and antipiretic components of *Usnea difracta*. **Planta Med.**, v.61, p.113-115, 1995.

PASQUINI, N.C.; PASQUINI, N.L.S. Biodisponibilidade da azitromicina livre e complexada em β -ciclodextrinas. **Rev. Elet. Farm.**, v.1, p.46-51, 2008.

PÉREZ, M.H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. **J. Control. Release**, v.65, p.429-438, 2000.

PERRY, N.B.; BENN, M.H.; BRENNAN, N.J.; BURGUES, E.J.; ELISS, G.; GALLOWAYD, J.; LORIMER, S.D.; TANGNEY, R.S. Antimicrobial, antiviral and citotoxic activity of New Zeland lichen. **Lichenologist**, v.31, p.627-636, 1999.

PETITTI, M.; BARRESI, A.A.; VANNI, M. Controlled release of vancomycin from PCL microcapsules for an ophthalmic application. **Chem. Eng. Res. Des.**, v.87, p.859-866, 2009.
PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A.A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chem. Eng. Res. Des.**, v.86, p.1294-1300, 2008.

PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; GIANNINI, F.A.; CORRECHE, E.R.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S.; ENRIZ, R.D. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, v.47, p.235-240, 2002.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetincyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v.34, p.333-339, 2004.

QUAGLIA, F.; DE ROSA, G.; GRANATA, E.; UNGARO, F.; FATTAL, E.; LA ROTONDA, M.I. Feeding liquid non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by spray-drying. **J. Control. Release**, v.86, p.267-278, 2003.

RAHMAN, N., SINGH, M; HODA, M.D.N.. Validation of simultaneous volumetric and spectrophotometric methods for the determination of captopril in pharmaceutical formulations. **Il Farmaco**, v.60, p.569-574, 2005.

RIBAS, O.R.M.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* sobre o processo de reparao tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto. Ciênc.**, v.21, p.245-252, 2006.

RIBEIRO-COSTA, R.M.; ALVES, A.J.; SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; GONÇALVES, E.C.P.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS - MAGALHÃES, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **J. Microencapsul.**, v.21, p.371-384, 2004.

RIBEIRO-COSTA, R.M.; CUNHA, M.R; GONGORA-RUBIO, M.R.; MICHALUART-JÚNIOR, P.; RÉ, M.I. Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by an emulsion/solvent evaporation process employing LTCC micromixers. **Powder Technol.**, v.190, p.107-111, 2009.

RUAN, G.; FENG, S-S.; LI, Q-T. Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. **J. Control. Release**, v.84, p.151-160, 2002.

SAH, H.; LEE, B.J. Development of new microencapsulation techniques useful for the preparation of PLGA microspheres. **Macromol. Rapid Commun.**, v.27, p.1845-1851, 2006.

SANTOS, L.C.; HONDA, N.K.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. **Fitoterapia**, v.75, p.473-479, 2004.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **J. Drug Deliv. Sci. Tech.**, v.15, p.355-361, 2005.

SANTOS, N.P.S.; NASCIMENTO, S.C.; WANDERLEY, M.S.O.; PONTES-FILHO, N.T.; DA SILVA, J.F.; DE CASTRO, C.M.M.B.; PEREIRA, E.C.; DA SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: Na attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.64, p.154-160, 2006.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v.208, p.71-80, 2000.

SANTOYO, S.; JALÓN, E.G.; YGARTUA, P.; RENEDO, M.J.; BLANCO-PRÍETO, M.J. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. **Int. J. Pharm.**, v.242, p.107-113, 2002.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y-H.P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D.L.; RANGARI, V.K.; FASINA, O.; BABU, R.J. Physicochemical characterization of efavirenz–cyclodextrin inclusion complexes. **Pharm. Sci. Tech.**, v.10, p.1-10, 2009.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.17, p.562-569, 2006.

SCHWINGEL, L.; FASOLO, D.; HOLZSCHUH, M.; LULA, I.; SINISTERRA, R.; KOESTER, L.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and *ex vivo* skin permeation studies. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v.62, p.149-159, 2008.

SEGUNDO, A.S.; BOSCO, A.F.; MAIA, D.; RIBEIRO, R.V.; AGUIAR, E.B.H.; DIAS ROCATTO, G.; CIRILO, D. M.; BUZELLE, S.L.; VEDOVE, T.A. Influência do Aloe vera e Própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Periodontia**, v.17, p.5-10, 2007.

SINGH, M.; SHIRLEY, B.; BAJWA, K.; SAMARA, E.; HORA, M.; O'HAGAN, D. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles. **J. Control. Release.**, v.70, p.21-28, 2001.

SINGH, R.; LILLARD JR, J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Exp. Mol. Pathol.**, v.86, p.215-223, 2009.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R. TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **Int. J. Pharm.**, v.278, p.1-23, 2004.

SONG, C.X.; LABHASETWAR, V.; LEVY, R.J. Controlled release of U-86983 from double-layer biodegradable matrices: effect of additives on release mechanism and kinetics. **J. Control. Release**, v.45, p.177-192, 1997.

SONG, L.X.; BAI, L.; XU, X.M.; HE, J.; PAN, S.Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. **Coordin. Chem. Rev.**, v.253, p.1276-1284, 2009.

SPAMER, E.; MÜLLER, D.G.; WESSELS, P.L.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.16, p.247-253, 2002.

STAMATIALIS, D.F.; PAPENBURG, B.J.; GIRONÉS, M.; SAIFUL, S.; BETTAHALI, S.N.M.; SCHIMITMEIER, S.; WESSLING, M. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. **J. Membrane Sci.**, v.308, p.1-34, 2008.

SÜLEYMAN, H.; ODABASOGLU, F.; ASLAN, A.; CAKIR, A.; KARAGOZ, Y.; GOCER, F.; HALICI, M.; BAYIR, Y. Anti-inflammatory and antiulcerogenic effects of the aqueous extract of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. **Phytomed.**, v.10, p.552-557, 2003.

TEIXEIRA, L.R.; SINISTERRA, R.D.; VIEIRA, R.P.; DORETTO, M.C.; BERALDO, H. Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into β -cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation. **J. Inc. Phen. Macro. Chem.**, v.47, p.77-82, 2003.

TRAPANI, G.; LOPEDOTA, A.; BOGHETICH, I.; LATROFA, A.; FRANCO, M.; SANNA, E.; LISO, G. Encapsulation and release of the hypnotic agent zolpidem from biodegradable polymer microparticles containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.**, v.268, p.47-57, 2003.

VASIR, J.K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **Int. J. Pharm.**, v.255, p.13-32, 2003.

VLACHOU, M.; PAPAIOANNOU, G. Preparation and characterization of the inclusion complex of furosemide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **J. Biomater. Appl.**, v.17, p.197-206, 2003.

WANG, S.; GUO, S.; CHENG, L. Disodium norcantharidate loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres I. Preparation and evaluation. **Int. J. Pharm.**, v.350, p.130-137, 2008.

WANG, S.H.; ZHANG, L.C.; LIN, F.; SA, X.B.; ZUO, J.B.; SHAO, Q.X.; CHEN, G.S.; ZENG, S. Controlled release of levonorgestrel from biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres: in vitro and in vivo studies. **Int. J. Pharm.**, v.301, p.217-225, 2005.

WANG, X.; WANG, Y.; WEI, K.; ZHAO, N.; ZHANG, S.; CHEN, J. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release. **J. Mater. Process. Tech.**, v.209, p.348-354, 2009.

WILSON, C.O.; GISVOLD, O.; DELGADO, J.N.; REMERS, W.A. **Textbook of organic medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Raven, 100p, 1998.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S.P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **Int. J. Pharm.**, v.364, p.298-327, 2008.

WU, C.; JIM, T.F.; GAN, Z.; ZHAO, Y.; WANG, S.A. A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. **Polymer**, v.41, p.3593-3597, 2000.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichen and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter induced Epstein Bar virus activation. **Chem. Pharma. Bull.**, v.43, p.1388-1390, 1995.

YAP, K.L.; LIU, X.; THENMOZHIAL, J.C.; HO, P.C. Characterization of the 13-*cis*-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.25, p.49-56, 2005.

ZHOU, S.; DENG, X.; XIAOHONG, L.; WENXIANG JIA; LIU, L. Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.91, p.1848-1856, 2004.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.**, v.291, p.3-10, 2005.

ANEXO A

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS REGIONAIS E NACIONAIS

1 - SILVA, C.V.N.S.; BARBOSA, J.A.P.; FERRAZ, M.S.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SANTOS, N.P.S. **Inclusion complex of diffractaic acid:2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. Preparation and chemical characterization.** X Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Salvador - BA, 2010.

2 - BARBOSA, J.A.P.; SILVA, C.V.N. S.; FERRAZ, M.S.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SANTOS, N.P.S. **Desenvolvimento de complexos de inclusão ácido difractáico:ciclodextrina e avaliação da citotoxicidade frente a células Vero (fibroblastos do rim de macaco).** 1º Congresso Nordestino de Biologia, 1º CNBIO - 9ª SEMBIO. Paulo Afonso - BA, 2010.

3 - SILVA, C.V.N.S.; FERRAZ, M.S.; BARBOSA, J.A.P.; BARBOSA, B.T.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SANTOS, N.P.S. **Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico UV para determinação de ácido difractáico em complexos de inclusão com 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina.** 4º Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas/3º Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão do Centro Acadêmico de Vitória - CAV/UFPE. Vitória de Santo Antão - PE, 2009.

4 - SILVA, C.V.N.S.; FERRAZ, M.S.; BARBOSA, J.A.P.; BARBOSA, B.T.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SANTOS, N.P.S. **Development and validation of a UV-spectrophotometric analytical method for determination of diffractaic acid.** II Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental/V Jornada Científica do LIKA/II Fórum Brasileiro de Genética em Neuropsiquiatria. Recife - PE, 2009.

ANEXO B

NORMAS DAS REVISTAS

Analytical Letters



Published By: Taylor & Francis

Volume Number: 44

Frequency: 18 issues per year

Print ISSN: 0003-2719

Online ISSN: 1532-236X

Instructions for Authors

SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Aims and Scope. *Analytical Letters* is an international medium for the rapid publication of original research papers, accelerated articles, or mini-reviews on important developments in all areas of analytical chemistry, including electrochemistry, mass spectrometry, separations, and spectroscopy. Papers are welcomed that consider fundamental developments, new or improved instrumentation and sensors, and applications of analytical chemistry in all areas that include biological and clinical science, engineering and instrumentation science, environmental chemistry and analysis, geochemistry, materials science, nanotechnology, and physics.



Types of papers. *Analytical Letters* encourages the submission of papers as original research papers, accelerated articles, or as mini-reviews.

Original research papers. Papers that report novel, significant fundamental developments in analytical science are encouraged for submission. The submission of work that describes innovative and improved instrumentation and sensors for chemical analysis is welcomed. It is also encouraged to submit manuscripts that describe significant applications in all areas of analytical science, including biological and clinical science, engineering and instrumentation science, environmental chemistry and analysis, geochemistry, materials science, nanotechnology, and physics.

Classical analytical methods, such as chemometrics, solvent extraction, spectrophotometry, spectrofluorimetry, and titrimetry, are well-established and considered to be routine methods of analysis. Hence, papers in these areas should clearly demonstrate significant advantages over conventional methods, or illustrate a significant application of the methodology.

Manuscripts that employ established analytical methodology to simple sample matrices, such as pharmaceutical samples, are discouraged unless significant advances are demonstrated. Reports of routine sample analysis are similarly discouraged without significant analytical utility or application. Papers that focus upon reports of fundamental constants, such as equilibrium or stability constants, are not appropriate without clear demonstration of the significance of the measurements upon analytical science.

Original research papers are reviewed based upon the novelty of the scientific work presented, the significance compared to existing instrumentation and methods, and the practicality of the approach. Manuscripts should cite relevant literature, including the authors' own work, and discuss how the new work relates to existing analytical methods. Method development papers should include analytical figures of merit, interference studies, and validation by a standard method or a certified reference material. Where appropriate, statistical treatment of the results should be provided.

Accelerated articles. Accelerated articles are designed to rapidly publish particularly significant original research findings in analytical science in the areas discussed above. Accelerated articles will be reviewed by one referee in order to ensure rapid consideration of the work. Because these papers will only be reviewed by one referee, the quality and significance must be clearly evident. Authors are encouraged to designate papers for consideration as accelerated articles, but the final decision will be up to the Editor-in-Chief.

Mini-reviews. Mini-reviews are designed to highlight recent and most relevant advances in any area of analytical chemistry. They should not be comprehensive treatises, but rather highlight significant developments in fundamental analytical science, instrumentation and sensors, methodology, or application in any of the scientific areas described above. Minireviews are reviewed using the criteria described above for original research papers.

Review process. All submissions will be reviewed by at least two external referees. The referees are experts who advise the editors on the matter of acceptance of manuscripts. The authors are responsible for the accuracy of results and conclusions presented and for obtaining any required permissions to publish. It is assumed that the work has not been previously published or submitted for publication. Referees are encouraged to provide critical, unbiased reviews in order to improve the quality of the science and of the presentation. Authors should understand the goal of the peer-review process is to enhance the quality of the published work. Publication is contingent upon response by the authors to review comments. Please direct questions about the technical review process to the Editor-in-Chief of *Analytical Letters*, David J. Butcher, david.butcher@analytchem.org.

Submission of Manuscripts. *Analytical Letters* receives all manuscript submissions electronically via the Manuscript Central website located at: <http://mc.manuscriptcentral.com/lanl/>. Manuscript Central allows for rapid submission of

original and revised manuscripts, as well as facilitating the review process and internal communication between authors, editors and reviewers via a web-based platform. For Manuscript Central technical support, you may contact them by e-mail or phone support via <http://scholarone.com/services/support/>.

If you have any other requests please contact the Editor-in-Chief, David J. Butcher, Analytical Letters, College of Arts and Sciences, 340C Stillwell Science Building, 246 Central Drive, Western Carolina University, Cullowhee, NC 28723, USA. Voice: (828) 227-7646; Fax: (828) 227-7647 ; Email: david.butcher@analytchem.org. *Do not use this e-mail address for article submissions; use it for other communications only.*

Each manuscript must be accompanied by a statement that it has not been published elsewhere and that it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher.

Electronic document page setup. All parts of the manuscript should be typewritten, double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. Number manuscript pages consecutively throughout the paper. Authors should also supply a shortened version of the title suitable for the running head, not exceeding 50 character spaces.

Abstract. Each article should be summarized in an abstract of not more than 250 words. The abstract should include the purpose of the work, the major results, and most significant conclusions. Avoid abbreviations, diagrams, and reference to the text in the abstract.

Introduction. The objectives should be stated, along with relevant citations. A comprehensive literature survey should be avoided.

Experimental/Material and Methods. This section should include sufficient information for the reproduction of the work, while avoiding procedural details. Methods that have been previously reported should be cited by a reference, with a brief description of modifications.

Results and Discussion. The reported results should be presented clearly and concisely. The significance of the results should be explored in the context of previous work.

Mathematical Equations. Mathematical equations may be done in a recent version of MathType, version 4 or higher, if there are no suitable keyboard characters. Mathematical equations should not be embedded in the middle of a paragraph; they should be keyed between paragraphs.

Chemical Structures. Structures should be prepared with a chemical drawing program, preferably ChemDraw 4.5 or higher, and submitted as .tif, .eps, or .psd format.

Tables. Tables should not be embedded in the text, but should appear after the references in the .doc file at the end of the manuscript. A short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes should be clearly identified below. All units must be included. Abbreviations should be defined in the caption or in a footnote.

Figures. Figures (illustrations) should not be embedded in the text, but should be included as separate sheets or files. Artwork may be created in various applications but must be submitted to conform to the standards and file formats outlined below in order to ensure that art can be promptly processed and published at quality levels suitable for publication both on the web and in print.

Figures should be completely labeled, taking into account necessary size reduction. Captions should be typed, double-spaced, at the end of the text.doc, after the references and any tables.

Illustrations. For highest quality reproduction, digital files should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in text files

Images embedded in Microsoft Word .doc format are not acceptable as a substitute for the provision of separate image files in the correct format, although embedded images may be provided in addition to the separate files.

Color Reproduction. Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in color art reproduction. Color art can be purchased for online only reproduction or for print + online reproduction. Color reprints can only be ordered if print + online reproduction costs are paid. Rates for color art reproduction are: Online Only Reproduction: \$225 for the first page of color; \$100 per page for the next three pages of color. A maximum charge of \$525 applies. Print + Online Reproduction: \$900 for the first page of color; \$450 per page for the next three pages of color. A custom quote will be provided for articles with more than four pages of color. Art not supplied at a minimum of 300 dpi will not be considered for print.

References. Cite in the text by author and date (Smith 1983). Prepare reference list in accordance with the Chicago Manual of Style., with the references organized alphabetically by the last name of the first author of each citation. Examples include:

Journal: Seki, H. and A. Suzuki. 1997. A new method for the removal of toxic metal ions from acid-sensitive biomaterial. J. Coll. Interf. Sci. 190: 206–211.

Book: Martens, H. and T. Naes. 1991. Multivariate Calibration. Chichester, UK: J. Wiley and

Sons.

Contribution to a Book: Chianelli R. R., M. Daage, and M. J. Ledoux. 1994. Fundamental studies of transition-metal sulfide catalytic materials. In *Advances in Catalysis*, Vol. 40, edited by D. D. Eley, H. Pines, and W. O. Haag. Burlington, Mass.: Academic Press.

Proofs. Page proofs are sent to the designated author using Taylor & Francis' EProof system. Authors must proofread the copyedited content for accuracy, respond to copyeditor queries, and returned within 48 hours of receipt.

Offprints/Reprints. Each corresponding author of an article will receive a PDF file of the article via email. This file is for personal use only and may not be copied and disseminated in any form without prior written permission from Taylor and Francis Group, LLC



Visit our [Author Services website](#) for further resources and guides to the complete publication process and beyond.

Journal of Microencapsulation



Journal of Microencapsulation
Instructions for Authors

About the Journal

Aims and Scope

The Journal of Microencapsulation is a well-established, peer-reviewed journal dedicated to the publication of original research findings related to the preparation, properties and uses of individually encapsulated novel small particles, as well as significant improvements to tried-and-tested techniques relevant to micro and nano particles and their use in a wide variety of industrial, engineering, pharmaceutical, biotechnology and research applications. Its scope extends beyond conventional microcapsules to all other small particulate systems such as self assembling structures that involve preparative manipulation.

The journal covers:

- the chemistry of encapsulation materials;
- the physics of release through the capsule wall and/or desorption from carrier;
- the techniques of preparation;
- content and storage;
- the many uses to which microcapsules are put.

Nanotechnology is now moving into medicine as nanomedicine; an emerging speciality with great potential in the development of unique opportunities for more refined targeting and for new therapeutic approaches to diagnose and treat life threatening diseases. Therefore, coverage also includes nanotechnological advances in the design and synthesis of these structures and their potential applications. Furthermore, there is an extensive information and reference section found in every issue of the journal comprising patent briefings. This publication is aimed at a broad, interdisciplinary audience of academic and industrial

researchers actively engaged in basic and applied laboratory practice, related to engineering micro- and nano-structured particles, including pharmaceutical science, medicine, photographic and copying processes, food technology, agrochemicals, adhesives and all those interested in small particle science and technology.

Editor-in-Chief

Professor Oya Alpar

University of London, School of Pharmacy

London

England, UK

Manuscript Submission

All submissions should be made online at the Journal of Microencapsulation's ScholarOne Manuscripts site. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the 'get help now' link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text under a subheading "Declaration of interest", and, where available within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site). Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Manuscript Preparation

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be doublespaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text, but should be submitted as separate digital files and designated with the appropriate file type on ScholarOne Manuscripts. References should be given in Harvard style (see References section for example).

Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; main text; acknowledgements; Declaration of Interest statement; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

Journal of Microencapsulation publishes the following manuscript types:

- Original papers
- Reviews
- Notes
- Letters to the Editor

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. Three to six key terms that are not in the title should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

Abstract

All original articles and reviews should start with an abstract of 150 or fewer words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. The recommended format is as a structured abstract, with the following headings for an original article: context, objective, materials and methods, results, discussion and conclusion. For a review article, it should be structured as follows: context, objective, methods (including data sources, study selection and data extraction), results and conclusion. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

Main Text

Original articles

The body of the article should include the following sections: introduction; methods; results; discussion; conclusions.

Introduction: This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose.

Methods: This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. You should describe your selection of the observational or experimental participants, identify the methods, apparatus and procedures

in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Journal of Microencapsulation requires that studies involving humans, both volunteers and patients, or animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. Details including clinical trial registration number must be provided in the methods section if research includes studies conducted on human volunteers.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations.

Discussion: This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.

Conclusions: This must summarise the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalised to a broader study population.

Reviews

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate that details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched (normally Medline and at least one or two other databases), the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed. Wherever possible, use primary resources, avoiding “Data on File”, “Poster” or other unpublished references.

Acknowledgement and Declaration of Interest sections

Acknowledgement and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgements sections details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here. Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable. For a more detailed list of points to include, please see “Declaration of Interest section” below.

Acknowledgement section

Any acknowledgement authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgement into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading 'Declaration of interest'. If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: The authors report no declarations of interest. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the 'Declaration of interest' field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission. Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

References

References should be given in the Harvard style. Citation in the text is by author and date (Smith, 2001). The list of references appears alphabetically by primary author's last name.

Examples:

- Journal: Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. Chemical basis for the biological activity of Imexon and related Cyanaziridines. *J Med Chem*, 2004;47:218-23.
- Book: Vyas SP, Khar RK. 2001. Targeted and controlled drug delivery. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.
- Contribution to a Book: Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. 1978. Methods to achieve controlled drug delivery: The biomedical engineering approach. In: Robinson JR, ed. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker 557-93.
- Electronic Resources: Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Itokawa H, Morris-Natschke, SL, Lee K-H. 2007. Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharm Biol* [Online] Available at:

<http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/13880200701585592>. Accessed 12 April 2009.

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages.

Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, JPG, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in the text
- Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click [here](#). For information on colour figures and charges please click [here](#).

Notes on Style

General Style

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise UK English. Language and grammar should be consistent with Fowler's English Usage; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language please ensure the manuscript

has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.

2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicised.

3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.

4. "US" is preferred to "American", "USA" to "United States", and "UK" to "United Kingdom".

5. Double quotation marks rather than single are used unless the "quotation is 'within' another".

6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: "e.g."; "i.e."; "cf.". Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.

7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.

8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: "The 1980s [not the 1980's] saw ...". Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: "The APU's findings that ..." but note that the plural is "APUs".

9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. "The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ..." and subsequently, "The APU studies of achievement ...", in a reference "(Department of Education and Science [DES] 1989a)". 10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial comments in a typical text are indicated in the following with square brackets: "From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses".

11. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, "African-American", "Hispanic" and "Native American" are used, e.g. "The African-American presidential candidate, Jesse Jackson ..."; for the UK, "Afro-Caribbean" (not "West Indian"), etc.

12. Material to be emphasised by italicisation in the printed version should be italicised in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.

13. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, $\times 05$ or 0×05). “%” (not “per cent”) should be used in typescripts.

14. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgements section. The style of the title is shown by the following example: “Appendix C: The random network generator”.

Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as “the appendix” and not called “Appendix A”.

Abbreviations and nomenclature

For abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the CSE Style Manual available from the Council of Science Editors, 60 Revue Drive, Suite 500 Northbrook, IL, 60062, USA. Mathematics

Please click [here](#) for more information on the presentation of mathematical text.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of research should appear in a separate Declaration of interest section at the end of the paper. Acknowledgements of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation belong in a separate Acknowledgements section. Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialise symbol sequence within tables.

Editorial Policies

Authorship

According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Pharmaceutical Science adheres to the ICMJE guidelines

(<http://www.icmje.org/#author>), which state that “authorship credit should be based on all of the following: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published”. All other contributors should be listed as acknowledgements. All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation.

Submission

Journal of Microencapsulation considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to Journal of Microencapsulation, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere. Informa Pharmaceutical Science adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE). As per these guidelines, failure to adhere to the above conditions will result in the editor and Informa publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. In extreme cases, offending authors may be banned from submitting to Informa Pharmaceutical Science journals in the future, or reported to their institution’s ethics committee.

Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers’ feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

Ethics and Consent

- Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.
- Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively (see below).
- To comply with FDAAA legislation, Informa Pharmaceutical Science requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical trials. Trial

registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section.

- All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Human Studies Committee or Ethics Committee or Animal Care and Use Committee), if applicable. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study followed principles in the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>).
- When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation. Further information on Ethics and Consent can be found by clicking [here](#).

Copyright and Permissions

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. Available at: <http://www.icmje.org/> protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgement is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Pharmaceutical Science is notified so that our records show that its use is properly authorised. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Pharmaceutical Science. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. Further information on Permissions can be found by clicking [here](#).

Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Pharmaceutical Science, to adhere in principle to the Conflict of Interest policy recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence

(bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding for research are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure. If there are no declarations, authors should explicitly state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of interest", and within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site). Manuscript submission cannot be completed unless a declaration of interest statement (either stating the disclosures or reporting that there are none) is included. This will be made available to reviewers and will appear in the published article. If any potential conflicts of interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to COPE guidance. The intent of this policy is not to prevent authors with any particular relationship or interest from publishing their work, but rather to adopt transparency such that reviewers, editors, the publisher, and most importantly, readers can make objective judgements the work product. NIH/Wellcome Public and Open Access Policies In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Public and Open Access Policies, Informa Pharmaceutical Science acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research results may benefit future scientific and medical research. Because we value the current and future contributions our journals make to the scientific body of knowledge, we have made certain that our policies accommodate those authors who wish to submit to PubMed Central. As part of our author services program, Informa Pharmaceutical Science will deposit to PubMed Central (PMC) and UK PubMed Central (UKPMC) author manuscripts reporting NIH or Wellcome Trust funded research. This service will help authors to comply with the NIH and Wellcome Trust revised 'Public Access Policy' and 'Open Access Policy', respectively. NIH policy NIH-funded authors must submit to PMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication. [Click here for more information.](#)

Wellcome Trust policy

Wellcome-funded authors must submit to UKPMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on UKPMC no later

than 6 months after final publication.

[Click here for more information.](#)

Informa Pharmaceutical Science will deliver to PMC/UKPMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review. We will also authorise the author manuscript's public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in print or electronic form (whichever is the sooner). Following the deposit, authors will receive further communications from the NIH Manuscript Submission System/UK Manuscript Submission System with respect to the submission. Under our Author Rights policy, authors also have the right to post their version of the submitted author manuscript (pre-print), or their version of the final published article (postprint) on their personal or institutional web site. Post-print web postings are subject to an embargo of 12 months. Please note that authors should not post manuscripts directly to PMC/UKPMC or other third party sites for any systematic external distribution by a third party (e.g., to a listserv or database connected to a public access server).

Additional Information

Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author's preferential rate of \$25/£15 per copy.

Further information on Reprints can be found by [clicking here](#).

Colour figure charges

Any figure submitted as a colour original will appear in colour in the Journal's online edition free of charge. Print copy colour reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for the first page with colour is US \$1000/£500, each subsequent page is charged at US \$500/£250. There are no charges for non-colour pages.

Contact the publisher

[Click here for contact details for the Publisher.](#)