



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

THIERS ARAÚJO CAMPOS

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO ÁCIDO
FUMARPROTOCETRÁRICO: 2- HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA: PREPARAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO EM
LIPOSSOMAS**

Vitória de Santo Antão

2012

THIERS ARAÚJO CAMPOS

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO ÁCIDO
FUMARPROTOCETRÁRICO: 2- HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA: PREPARAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO EM
LIPOSSOMAS**

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
2012

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

- C198c Campos, Thiers Araújo.
Complexos de inclusão ácido fumarprotocetrárico: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina: preparação, caracterização e encapsulação em lipossomas /Thiers Araújo Campos. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2012.
xvi, 83 folhas: il.
- Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.
Co-orientador: Nereide Stela Santos Magalhães.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2012.
Inclui bibliografia.
1. Biotecnologia. 2. Ácido fumarprotocetrárico. 3. 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. 4. Lipossomas. I. Santos, Noemia Pereira da Silva. II. Magalhães, Nereide Stela Santos. III. Título.
- 660.6 CDD (21.ed.) BIBCAV/UFPE-007/2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

THIERS ARAÚJO CAMPOS

Banca examinadora:

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Prof. Dra. Mariane Cabujá de Brito Lira

Prof. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Dedico aos meus pais, Albiratan e Tânia Campos, exemplo maior de amor não há.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir ver, ouvir, falar e sobretudo pensar. Por me guiar quando a dúvida me saltou e encorajar quando o cansaço me abateu. Amigo inseparável.

Aos meus pais, Tânia e Albiratan Campos, irmãos Tihany e Thyalles, sobrinha Tiffany, cunhado Flávio e vovó Cininha, pela compreensão nos momentos de ausência, pela paciência nos dias difíceis e pelo apoio incondicional nesta jornada que tantas barreiras atravessamos.

À Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos, pela confiança, paciência e por todo ensino no campo da ciência, como também pelo aprendizado de ética, humanidade e responsabilidade.

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 Camilla Vila Nova, doutoranda do grupo SLC, pela dedicação, amizade, apoio e a enorme colaboração prestada a este trabalho.

À Mirian Pereira da Silva Santos pelo elo com o mundo científico.

A todos os amigos que fazem o Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA).

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

Aos futuros pesquisadores Kleyton e Tássia, alunos de iniciação científica, pela ajuda na realização dos experimentos e amizade.

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

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do LIKA/UFPE e do Laboratório de Produtos Naturais (Departamento de Bioquímica), pela saudável convivência em laboratório.

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

Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique Silva, por obter confiança permitindo a entrada no grupo dos líquenólogos.

À Prof^a. Dr^a. Neli Kika Honda, por fornecer o ácido fumarprotocetrárico.

À Prof^a. Dr^a. Mariane Cajubá de Britto Lira, pelos valiosos ensinamentos na área farmacêutica.

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

A CAPES, 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 Fumarprotocetrário	5
1.3.2.1 Generalidades	5
1.3.2.2 Atividades biológicas	7
1.3.3 Ciclodextrinas	8
1.3.3.1 Classificação das ciclodextrinas	9
1.3.3.2 Aplicação das ciclodextrinas	11
1.3.3.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas	12
1.3.3.4 Preparação dos complexos de inclusão com ciclodextrinas	14
1.3.3.5 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão com ciclodextrinas	14
1.3.4 Nanotecnologia	17
1.3.4.1 Sistemas de liberação controlada	18
1.3.4.2 Lipossomas	20
1.3.4.2.1 Classificação dos lipossomas	22
1.3.4.2.2 Método de preparação e caracterização de lipossomas	25
1.3.4.3 Aplicação de substâncias liquênicas na nanotecnologia	26
CAPÍTULO 2	28
Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico UV para determinação do ácido fumarprotocetrário de <i>Cladonia verticillaris</i> (líquen) em complexos de inclusão com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina	
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	43
2.7 Referências Bibliográficas	44

CAPÍTULO 3	47
Complexo de inclusão contendo ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e incorporação em lipossomas	
3.1 Resumo	48
3.2 Abstract	49
3.3 Introdução	50
3.4 Material e Métodos	51
3.5 Resultados e Discussão	56
3.6 Conclusões	68
3.7 Referências Bibliográficas	70
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Líquen <i>Cladonia verticillares</i> (Fonte: WESSEN, 2007).	6
Figura 1.2	Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico. (EDWARDS et al., 2003).	6
Figura 1.3	Estrutura química da β -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 1.4	Ilustração da associação entre a ciclodextrina e o fármaco (Complexos de inclusão 1:1, 1:2 e 2:1) (DE SOUSA et al., 2008).	13
Figura 1.5	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 MESSNER et al., 2010).	16
Figura 1.6	Tamanho de moléculas orgânicas e macromoléculas biológicas em	17

	relação as nanopartículas de sílica (adaptado de: FARIJ; WIFP, 2009).	
Figura 1.7	Ilustração de alguns tipos de nanosistemas (adaptado de: FARIJ; WIFP, 2009).	19
Figura 1.8	Comparação do perfil farmacocinético de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada (adaptado de LIRA, 2007).	19
Figura 1.9	Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolipídio, da bicamada lipídica e do lipossoma (Adaptado de: courses.cm.utexas.edu)	20
Figura 1.10	Ilustração das etapas a entrega citosólica do lipossoma. 1 - Associação celular dos lipossomas; 2 - Internalização dos lipossomas através de endocitose; 3 - Escape endossomal dos lipossomas; 4 - Degradação lisossomal; 5 - Agente terapêutico livre e difuso no citoplasma; 6 - Transporte citoplasmático do agente terapêutico para a organela alvo; 7 - Exocitose de lipossomas (adaptado de: FARIJ; WIFP, 2009).	21
Figura 1.11	Ilustração esquemática dos diferentes tipos de lipossomas quanto ao tamanho. SUV- Pequenas Vesículas Unilamelares, LUV- Grandes Vesículas Unilamelares, MLV- Grandes Vesículas Multilamelares, MVV- Grandes Vesículas Multivesiculares. (adaptado de http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1243).	22
Figura 1.12	Ilustração esquemática dos tipos de lipossomas quanto à sua composição. A- Lipossomas convencionais. B- Lipossomas sítio-específicos. C- Lipossomas furtivos. D- Lipossomas direcionados de longa circulação. E- Lipossomas polimórficos : 1- lipossoma sensível ao pH ; 2- lipossoma catiônico (LAPENDA, 2009).	22
Figura 2.1	Estrutura química do ácido fumarprotocetrário ($C_{22}H_{16}O_{12}$) (Santos et al., 2004).	31
Figura 2.2	Espectro de varredura do solventes: (A) Clorofórmio; (B) Diclorometano; (C) Acetonitrila.	36
Figura 2.3	Espectro de varredura do ácido fumarprotocetrário nas concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 $\mu\text{g/mL}$ em metanol ($\gamma_{\text{máx}}$ 210 nm).	37
Figura 2.4	Curva padrão de ácido fumarprotocetrário (0,5 - 8 $\mu\text{g/mL}$) a 210 nm.	38
Figura 3.1	Diagrama de solubilidade de fases do ácido fumarprotocetrário (AF) e HP β CD a 25°C.	56
Figura 3.2	Espectros de infravermelho para a mistura física (MF), complexo de inclusão (AF:HP β CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e o ácido fumarprotocetrário (AF).	58
Figura 3.3	Padrões de difração de raios-X para o complexo de inclusão	60

	(AF:HP β CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), mistura física (MF) e o ácido fumarprotocetrárico (AF).	
Figura 3.4	Microscopia eletrônica de varredura do ácido fumarprotocetrárico (A), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (B), complexo de inclusão (C) e mistura física (D).	62
Figura 3.5	Varredura diferencial calorimétrico (DSC) do ácido fumarprotocetrárico (AF), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), complexo de inclusão (AF:HP β CD) e mistura física (MF).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (adaptado de MESSENER et al., 2010).	10
Tabela 2.1	Dados do teste de linearidade por espectrofotometria para ácido fumarprotocetrárico.	38
Tabela 2.2	Exatidão do ácido fumarprotocetrárico em diferentes níveis de concentrações.	39
Tabela 2.3	Estudo de precisão intracorrída (repetibilidade).	40
Tabela 2.4	Precisão intermediária do método espectrofotométrico para o doseamento do ácido fumarprotocetrárico.	40
Tabela 2.5	Teste <i>t</i> de <i>Student</i> aplicado aos parâmetros analisados para robustez do método de dosagem do ácido difractáico em espectroscopia UV.	41
Tabela 3.1	Sinais de RMN H ¹ para o ácido fumarprotocetrárico e complexo de inclusão AF:HP β CD (mudanças observadas nos sinais do AF).	59
Tabela 3.2	Sinais de RMN H ¹ para a HP β CD e complexo de inclusão AF:HP β CD (mudanças observadas nos sinais da HP β CD).	60
Tabela 3.3	Estudo de estabilidade acelerada dos lipossomas em suspensão contendo AF (LIPO-AF) ou complexo de inclusão (LIPO-AF:HP β CD).	64
Tabela 3.4	Ensaio de estabilidade a longo prazo das suspensões de lipossomas contendo AF livre ou AF:HP β CD.	65
Tabela 3.5	Efeito <i>burst</i> e parâmetros cinéticos de liberação (k_1 e k_2) para complexos de inclusão AF:HP β CD e lipossomas contendo complexo de inclusão AF:HP β CD.	68

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/menos
°C	Graus Celsius
Δ	Letra grega Delta
Ε	Letra grega Épsilon
Z	Letra grega Zeta
<	Menor que

LISTA DE ABREVIATURAS

HP β CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
AF ou FA	Ácido fumarprotocetrárico
AF:HP β CD ou	Ácido fumarprotocetrárico complexado a 2-hidroxipropil- β -
FA:HP β CD	ciclodextrina
RNA	Ácido ribonucléico
A/O	Água/óleo
A/O/A ou W/O/W	Água/óleo/água
BSA	Albumina de soro bovino
KBr	Brometo de potássio
DSC	Calorimetria térmica diferencial
CGTase	Ciclodextrina-glicosil-transferase
CDs	Ciclodextrinas
MIC	Concentração inibitória mínima
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico
D.P.	Desvio padrão
d _v	Diâmetro volumétrico médio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DL ₅₀	Dose letal que pode causar a morte de 50% de uma dada
	população de organismos
g	Grama
h	Hora
IV ou IR	Infravermelho
i.p.	Intraperitonal
i.v.	Intravenoso
Lipo-AF	Lipossomas contendo Ácido fumarprotocetrárico
Lipo-AF: HP β CD	Lipossomas contendo complexos de inclusão ácido
	fumarprotocetrárico:2 -hidroxipropil- β -ciclodextrina
m/v	Massa/volume
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MG	Miligrama

mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
Min	Minuto
MF	Mistura física
PGA	Poliácido glicólico
PLA	Poliácido láctico
Kg	Quilograma
RMN ^1H ou	Ressonância magnética nuclear de prótons
^1H RMN	
RPM	Rotações por minuto
S	Segundo
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
UV	Ultravioleta
α CD	α -ciclodextrina
β CD	β -ciclodextrina
γ CD	γ -ciclodextrina

RESUMO

Isolado da *Cladonia verticillaris*, o ácido fumarprotocetrárico (AF) apresenta diversas propriedades biológicas. O seu uso terapêutico ainda é limitado devido a sua baixa hidrofiliabilidade. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que podem formar complexos de inclusão com compostos lipofílicos, aumentando a hidrossolubilidade. Os lipossomas vêm se destacando nas pesquisas por incorporar uma variedade de compostos com características físico-química desfavoráveis. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar complexos de inclusão ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e incorporar em lipossomas. Os parâmetros de validação foram estudados segundo as exigências da Conferência Internacional de Padronização de Uso Humano (ICH). Os

complexos de inclusão foram preparados por liofilização e caracterizados físico-quimicamente. Os lipossomas contendo o AF ou complexo de inclusão AF:HP β CD foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, submetidos a ensaios de estabilidade e consequentemente a avaliação do perfil cinético de liberação *in vitro*. A linearidade foi determinada através da equação da reta Absorvância = 0,1119x[AF]+0,0071($r^2=0,999$). A exatidão foi atestada na recuperação do AF no complexo de inclusão. Os coeficientes de variação nos ensaios de precisão intermediária e robustez apresentaram valores inferiores a 5%, caracterizando o método como preciso e robusto. Os limites de detecção e quantificação do AF foram de 0,24 e 0,74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O método também demonstrou ser reprodutível, simples e específico. O diagrama de solubilidade de fases de AF:HP β CD apresentou uma curva do tipo A_L , com $K_{1:1} = 58 \text{ M}^{-1}$. Na presença de 300 mM de HP β CD, a solubilidade do AF aumentou 19 vezes. O complexo de inclusão AF:HP β CD apresentou modificações no IV, RMN ^1H , difração de raios-X, microscopia e DSC, sugerindo a formação do complexo de inclusão. Após o processo de preparação, as formulações lipo-AF e lipo-AF:HP β CD demonstraram-se homogêneas com efeito tyndall. O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foram $85,8 \pm 4,5 \text{ nm}$ e $0,41 \pm 0,14$ para lipo-AF e; $86,5 \pm 1,41 \text{ nm}$ e $0,24 \pm 0,05$, para lipo-AF:HP β CD. As formulações lipo-AF:HP β CD mantiveram-se estáveis após 60 dias quando as suspensões são armazenadas a 4°C. Avaliando o perfil cinético de liberação *in vitro* do AF a partir dos complexos AF:HP β CD e lipo-AF:HP β CD observou-se uma liberação lenta e controlada entre 4 h e 12 h, respectivamente. Estes resultados demonstram que a complexação do AF a ciclodextrina, e sua incorporação em lipossomas, proporcionou uma melhoria na estabilidade e hidrossolubilidade do composto, viabilizando, portanto, seu uso terapêutico.

Palavras-chave: ácido fumarprotocetrárico; 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; lipossomas.

ABSTRACT

Isolated from *Cladonia verticillaris*, fumarprotocetraric acid (FA) has various biological properties. The therapeutic use is still limited due to its low hydrophilicity. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides which may form inclusion complexes with lipophilic drugs, allowing increased solubility. Liposomes have been highlighted in research by incorporating a variety of compounds with unfavorable physicochemical characteristics. The objective of this study was to develop and characterize inclusion complexes fumarprotocetraric acid:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and incorporate into liposomes. The validation parameters were studied according to the requirements of the International Standards for Human Use (ICH). Inclusion complexes were prepared by *freeze-drying* and physico-chemically

characterized. Liposomes containing the FA or inclusion complex FA:HP β CD were prepared by hydrating the lipid film, tested for stability and hence the evaluation of the *in vitro* kinetic profile. Linearity was determined using the straight-line equation $\text{Absorbance} = 0.1119 \times [\text{FA}] + 0.0071$ ($r^2 = 0.999$). The accuracy was attested in the recovery of FA in the inclusion complex. In assays of intermediate precision and robustness the coefficients of variation values were below 5%, the method was characterized as accurate and robust. The limits of detection and quantification of FA were 0.24 and 0.74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The method also proved to be reproducible, simple and specific. The solubility phase diagram FA:HP β CD showed a curve-type A_L , with $K_{1:1} = 58 \text{ M}^{-1}$. In the presence of 300 mM HP β CD, the solubility of FA increased 19 times. The inclusion complex FA:HP β CD presented changes in IR, ^1H NMR, X-ray diffraction, DSC and microscopy, suggesting the formation of inclusion complex. After the manufacturing process, the formulations of lipo-FA and lipo-FA:HP β CD were shown to be homogeneous with Tyndall effect. The average diameter and polydispersity of the vesicles were $85.8 \pm 4.5 \text{ nm}$ and 0.41 ± 0.14 for lipo-FA and $86.5 \pm 1.41 \text{ nm}$ and 0.24 ± 0.05 for lipo-FA:HP β CD. The formulations lipo-FA:HP β CD remained stable after 60 days when stored at 4°C. Evaluating the kinetic profile of *in vitro* release of FA from FA:HP β CD inclusion complex and lipo-FA:HP β CD there was a slow and controlled release of 4 hours and 12 hours, respectively. These results demonstrate that the complexation of FA to cyclodextrin and their incorporation into liposomes provided an improvement in the stability and solubility of the compound, thus enabling its therapeutic use.

Keywords: fumarprotocetraric acid; 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin; liposomes.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Devido ao alto custo na pesquisa de novos fármacos e à queda do retorno financeiro no desenvolvimento destes medicamentos em tempos de economia, a indústria farmacêutica, uma das principais responsáveis pela introdução destes produtos, se concentra em não desperdiçar recursos, buscando alternativas através da química medicinal (MENDES, 2009).

Atualmente, há uma diversidade de produtos naturais bioativos com potencial atividade farmacológica, muitos deles com atividade já comprovada (GARROS et al., 2006; RIBAS et al., 2006; SEGUNDO et al., 2007). Além destes compostos, os líquens, seres resultantes da simbiose de fungos (micobionte) e algas (fotobionte), produzem metabólitos secundários biologicamente ativos de particular interesse à pesquisa, em face de sua utilização na medicina popular desde a antiguidade (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999).

O ácido fumarprotocetrárico, metabólito secundário líquênico pertencente ao grupo das depsidonas, isolado de *Cladonia verticillaris*, possui relevantes propriedades biológicas, tais como: antibiótica, antiinflamatória, antiproliferativa e antitumoral (NASCIMENTO et al., 1994; SANTOS, 1996; GUDJÓNSDÓTTIR; INGOLFSDÓTTIR, 1997; MULLER, 2001). Contudo, apresenta uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, propriedades físico-químicas desfavoráveis, tornando-se um composto com relevante toxicidade e difícil interação com as barreiras biológicas. Uma forma de utilizar compostos insolúveis em água é aumentando sua solubilidade através de métodos como: ajuste de pH, utilização de co-solventes, de surfactantes, além da complexação com ciclodextrinas.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, úteis farmaceuticamente porque podem interagir com as moléculas de baixa hidrofília formando complexos de inclusão (STELLA; HE, 2008). O complexo obtido exibe novas características físico-químicas proporcionando uma melhoria na estabilidade, maior hidrossolubilidade, maior

biodisponibilidade e redução dos efeitos tóxicos (DEL VALLE, 2004; DEVARAKONDA et al., 2005).

Ao longo da história, o uso de alguns fármacos convencionais (quimioterápicos) tem sido limitado devido à impossibilidade do aumento da sua concentração no sangue. O tempo de permanência do princípio ativo na circulação, a baixa solubilidade, os efeitos colaterais perniciosos inerentes às terapias com doses elevadas, podem dificultar a utilização da concentração necessária para o sucesso farmacoterapêutico. Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido alvo de novas pesquisas (BATISTA et al., 2007).

Estudados por mais de quatro décadas, entre as várias formas de sistema de liberação controlada de fármacos, os lipossomas são vesículas nanométricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios, que apresentam capacidade de incorporar uma diversidade de compostos, sejam eles hidrofílicos ou hidrofóbicos (ALLEN et al., 1995; VOINEA; SIMIONESCU, 2002).

A complexação de substâncias lipofílicas a ciclodextrina, e sua incorporação em sistemas de liberação controlada tais quais os lipossomas, é uma alternativa a ser adotada com objetivo de superar as limitações relacionadas à solubilidade bem como biodisponibilidade destes fármacos. A utilização destes sistemas favorece a manipulação de fármacos lábeis e/ou tóxicos, pois a complexação promove uma proteção do composto frente a fatores externos como luz e oxigênio. Além de melhorar a hidrossolubilidade, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química e diminuição da toxicidade (DEVAREKONDA et al., 2005).

A utilização de sistemas de liberação controlada surge, portanto, como alternativa para o desenvolvimento de lipossomas contendo o ácido fumarprotocetrárico complexado a ciclodextrina.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Desenvolver e caracterizar complexos de inclusão ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina e incorporar em lipossomas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico por espectrofotometria UV para determinação do ácido fumarprotocetrárico;
 - Obter complexos de inclusão formados por ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (AF:HPβCD);
 - Caracterizar os complexos de inclusão (AF:HPβCD) por métodos físico-químicos (IV, RMN ¹H, difração de raios-X, microscopia e DSC);
 - Preparar lipossomas contendo ácido fumarprotocetrárico e/ou o complexo de inclusão ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina;
 - Realizar estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo das formulações obtidas;
 - Avaliar e comparar o perfil de liberação *in vitro* do ácido fumarprotocetrárico a partir dos complexos de inclusão livre e dos nanoencapsulados.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Líquens

Os líquens são organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte). A sua distribuição ecológica nos mais variados habitats e micro-habitats depende de fatores físicos e climáticos, os quais favorecem as condições necessárias para seu desenvolvimento. Cada região apresenta uma comunidade liquênica com componentes específicos próprios em resposta às condições ambientais, estimando cerca de 17.000 espécies conhecidas, sendo a cada ano descobertas novas espécies (HONDA; VILEGAS, 1998; COCCHIETTO et al., 2002; WENSSEN, 2007).

As substâncias químicas produzidas pelos líquens durante o seu desenvolvimento são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos intracelulares (carboidratos, carotenóides e vitaminas, aminoácidos e proteínas) estão ligados na parede celular, no protoplasto e são frequentemente solúveis em água, conhecidos como metabólitos primários (HUNECK, 1999; COCCHIETTO et al., 2002; WESSEN, 2007).

Os produtos extracelulares não essenciais, frequentemente chamados metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex do líquen, raramente em ambas as camadas, onde são produzidos por diversas rotas biológicas. São conhecidos aproximadamente 630 compostos e classificados em quatro grupos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos. Outros produtos liquênicos como ácidos alifáticos, *meta*- e *para*-depsídeos, ésteres benzílicos, xantonas, antraquinonas, terpenos e alguns derivados do ácido pulvínico, são também metabolizados por alguns fungos de vida livre e plantas superiores (SANTOS et al., 2004; WESSEN, 2007; MENDES, 2009).

Alguns produtos extracelulares têm sido utilizados com vários propósitos, como corantes, perfumes e remédios. Os medicamentos, ao longo do tempo vem sendo bastante estudado por apresentar um considerável valor medicinal (MÜLLER, 2001; SHUKLA et al., 2005).

As propriedades biológicas das substâncias liquênicas começaram a ser observadas no Egito Antigo, quando utilizavam extratos liquênicos na cicatrização de feridas cutâneas

(MÜLLER, 2001), e as primeiras publicações foram no período pós Segunda Guerra Mundial. A partir de então, a síntese desses metabólitos secundários de líquens é estudada e utilizada por vários países para fins farmacológicos (MENDES, 2009).

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 sp.* eram utilizados para o tratamento da tuberculose (GUPTA et al., 2007).

Os liquenologistas verificaram que os ácidos liquênicos, componentes insolúveis em água, apresentaram importantes atividades biológicas (SIMONETTI, 2004), como antimicrobiana (majoritariamente contra bactérias Gram positivas) e anti-herbicida (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).

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).

Entre as substâncias ativas de origem liquênica, o ácido úsnico tem sido o mais extensivamente estudado por apresentar diversas propriedades biológicas (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Muitos outros compostos liquênicos de natureza fenólica vêm se destacando devido ao potencial farmacológico que apresentam, como a atranorina, o ácido barbático, o ácido lobárico, o ácido fumarprotocetrárico, o ácido difractáico, dentre outros (MÜLLER, 2001).

1.3.2 Ácido fumarprotocetrárico

1.3.2.1 Generalidades

O ácido fumarprotocetrárico é um derivado aldeído do grupo das depsídonas, da série meta do tipo β-orcinol, presentes na medula do talo liquênico da espécie *Cladonia verticillaris* (YANO-MELO, 1999; EDWARDS et al., 2003).

A ocorrência natural do líquen *Cladonia verticillaris* como populações ensolaradas e protegidas da luz implica mudanças no conteúdo do pigmento. Entretanto, líquens que crescem em localizações ensolaradas contêm mais carboxilato metil β-orcinol, orcinol e ácido fumarprotocetrárico do que aqueles encontrados em regiões de baixa intensidade de luz (SIMONETTI, 2007). Esta espécie que possui aproximadamente de 7 a 12 cm de altura,

é endêmica da costa leste do Brasil, encontrada desde Rio Grande do Sul à Paraíba (AHTI et al., 1993; SILVA, 2002).

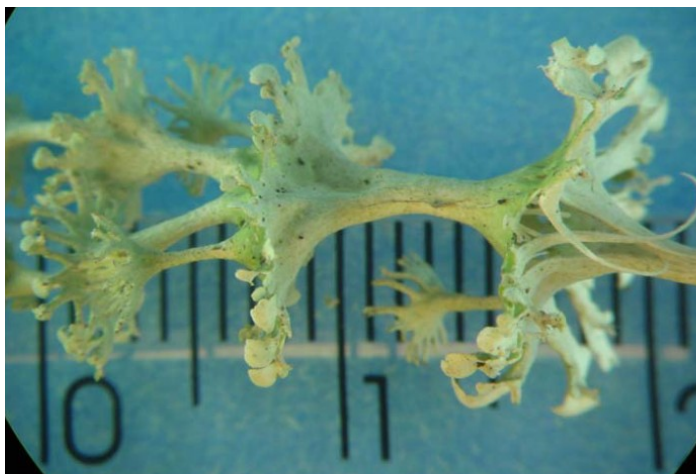


Figura 1.1 Líquen *Cladonia verticillaris* (Fonte: WESSEN, 2007).

O ácido fumarprotocetrárico, molécula de estrutura química ($C_{22}H_{16}O_{12}$), é um éster aromático contendo grupo carboxílico em seu anel terminal, titulado como ácido dibásico. Este metabólito secundário com massa molecular de 472,37 g/mol, apresenta baixo grau de dissociação (pK_{a1} em metanol de 2,8) e uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em acetona hidratada (80-90%). Sua morfologia microscópica apresenta cristais em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão em torno de $250^{\circ}C$ (EDWARDS et al., 2003; HAUCK et al., 2010).

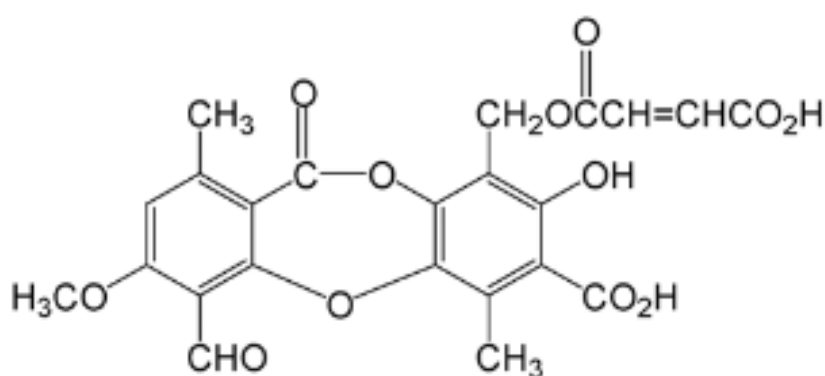


Figura 1.2 Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico (EDWARDS et al., 2003).

1.3.2.2 Atividades biológicas

Pouco se conhece sobre as propriedades biológicas do ácido fumarprotocetrárico devido ao escasso número de referências bibliográficas. As pesquisas encontradas relatam sobre as depsídonas grupo que o ácido fumarprotocetrárico se classifica. E estas por sua vez, são produzidas como metabólitos secundários pela via biossintética do acetil-polimalonil, a mesma rota de biossíntese que precede a formação de antraquinonas e derivados do ácido úsnico. Portanto, diferem dos depsídeos no fato de terem uma função éter cíclico, com atividade similar desses compostos contra bactérias e na inibição de neoplasias (WESSEN, 2007; MENDES, 2009).

Além de alta atividade anti-retroviral, como inibidores da integrase do HIV-1, as depsídonas têm a capacidade de absorção de luz UV, com potencial para uso de formulações de filtros solares e como inibidores da lipoxigenase-5, desempenhando uma importante função em uma variedade de processos patofisiológicos em humanos, particularmente em inflamatórios (INGÓFLSDÓTTIR et al., 1996; WESSEN, 2007; MENDES, 2009).

Em ensaios de citotoxicidade frente a células do adenocarcinoma prostático (PC), bem como células da leucemia murina (P388 e LI210), observou-se que os extratos etéreos e acetônicos obtidos de *Cladina dendroides* apresentou uma IC₅₀ (concentração inibitória mínima de 50% do crescimento) inferior a 50 µg/mL, sugerindo através de testes cromatográficos que o ácido fumarprotocetrárico seja o princípio ativo desta espécie (NASCIMENTO et al., 1996).

Nos ensaios *in vivo* de toxicidade identificou-se que o ácido fumarprotocetrárico apresentou uma DL₅₀ aproximadamente de 110mg/Kg (SANTOS et al., 1996), via intraperitoneal em camundongos.

Segundo estudos realizados por Oliveira (2003), o ácido fumarprotocetrárico exerceu atividade analgésica e parte dos efeitos antinoceptivos poderia ser devido às suas propriedades antiinflamatórias. Também foram observadas neste trabalho, as atividades edematogênica, antipirética, antiinflamatória aguda e crônica, frente ao modelo experimental de inflamação, sugerindo a ação sobre o bloqueio de mediadores de inflamação.

A atividade antibacteriana também foi atribuída ao ácido fumarprotocetrárico, embora não tenha apresentado atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* segundo a literatura (INGÓFLSDÓTTIR, 2002). Assim como os ensaios antiparasitários sobre a forma promastigota da *Leishmania sp.* apresentaram inibição do crescimento a 100 µg/ml (URDAPILLETA, 2006).

Recentemente, Wessen (2007) mostrou que o ácido fumarprotocetrárico e o extrato acetônico do mesmo demonstraram-se eficazes como agente mucolítico em camundongos, na dose de 80 mg/kg, permitindo a ação expectorante.

Mesmo que os metabólitos liquênicos, especificamente o ácido fumarprotocetrárico, apresentem uma variedade de atividades biológicas, sua utilização como agente terapêutico ainda é limitada, por apresentar características desfavoráveis, tais como baixa hidrofiliabilidade e elevada toxicidade (Edwards et al. 2003). Deste modo, a utilização do ácido fumarprotocetrárico em sua forma livre torna-se bastante restrita, sendo necessárias alternativas para contornar suas características físico-químicas indesejáveis e manter suas atividades biológicas.

1.3.3 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que vem sendo estudados nos últimos 100 anos, citados pela primeira vez em 1891 por Villiers, através do estudo sobre a digestão do amido pelo *Bacillus amylobacter*, denominando celulosina. No início do século XX, Franz Schardinger identificou as ciclodextrinas como produtos resultantes da degradação do amido pela ação da enzima amilase ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), produzida pelo micro-organismo *Bacillus macerans*, capaz de romper um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento numa única molécula cíclica, ou seja, demonstrando a sua estrutura cíclica (SINGH et al., 2002).

Em 1938 Freudenberg e colaboradores descobriram que as CDs apresentam uma cavidade central e com isso foi determinado seu peso molecular. Após 15 anos, Freudenberg, French e Plieninger obtiveram uma patente, retratando da formação de complexos de inclusão, pela interação das ciclodextrinas com moléculas hidrofóbicas, permitindo o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, proteção de substâncias que poderiam ser facilmente oxidadas e a redução da volatilidade de algumas substâncias (CONNORS, 1997).

As ciclodextrinas (CDs) são formadas por unidades de glicopirranose unidas por ligações α (1-4), possuindo uma estrutura rígida em forma de um cone truncado (Figura 1.3), 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 (CHALLA et al., 2005).

Esta conformação faz com que cavidade central apresente características menos hidrofílicas e uma superfície externa hidrofílica, favorecendo a disposição espacial dos grupamentos químicos, permitindo, desta forma, o processo de complexação molecular. A presença da cavidade interna hidrofóbica faz com que a ciclodextrina tenha a capacidade de alojar uma molécula hóspede, formando complexos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (DEL VALLE, 2004).

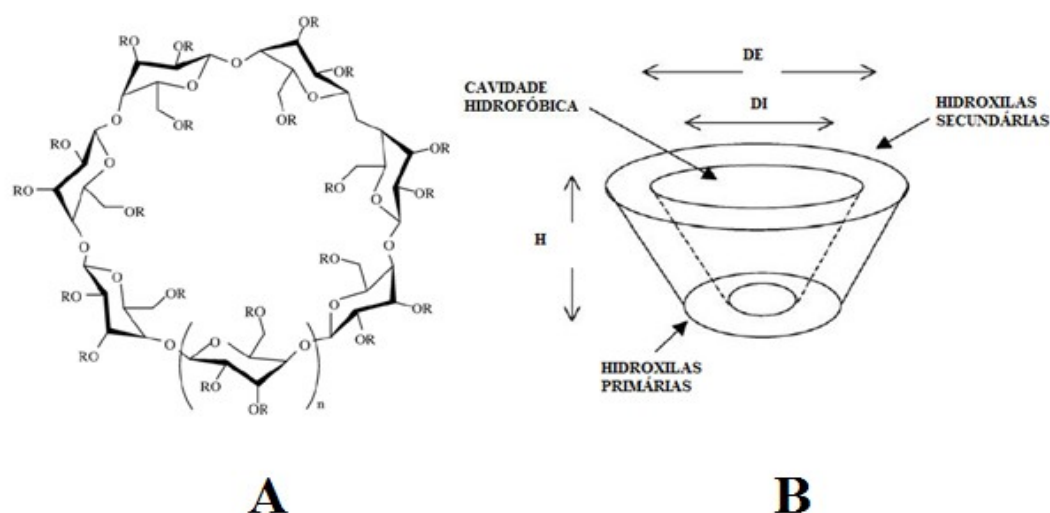


Figura 1.3 Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

1.3.3.1 Classificação das ciclodextrinas

Conhecidas também como cicloamiloses, ciclomaltoses e Schardinger dextrinas (DEL VALLE, 2004), as ciclodextrinas são 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 (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Contudo, as CDs naturais 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).

A mais estudada por possuir baixo custo e ter afinidade com muitas moléculas hidrofóbicas devido a sua cavidade interna ser apropriada a moléculas com peso molecular entre 200 e 800 g/mol (ZIGONE; RUBESSA, 2004), a β CD tem uma menor solubilidade em água limitando o seu uso, pelo fato da ligação relativamente forte de suas moléculas em

estado sólido associada à diminuição da habilidade de formação de ligações de hidrogênio com água (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Tabela 1.1 Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (adaptado de MESSENER et al., 2010).

Propriedades	Ciclodextrina		
	A	B	γ
Unidades de glicopiranosose	6	7	8
Peso molecular anidro (Dalton)	973	1135	1297
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
Dimensões aproximadas (nm)			
Altura (h)	0.78	0.78	0,78
Diâmetro interno (di)	0.65	0.62	0.80
Diâmetro externo (do)	1.46	1.54	1.75
Solubilidade (água, 25°C) mg/ml	129.5	490	350

Por muitos anos, pesquisadores têm utilizado as ciclodextrinas como potentes agentes acentuadores da solubilidade, modificando a liberação e melhorando a biodisponibilidade de fármacos fracamente hidrossolúveis, com objetivo de obter uma melhoria na formação dos complexos de inclusão, através da síntese por aminações, esterificações ou eterificações das hidroxilas primárias e secundárias. Esses derivados semi-sintéticos de ciclodextrinas evidenciam que a substituição de qualquer um dos grupos hidroxila por grupamentos hidrofóbicos resulta em um aumento significativo da solubilidade aquosa (CALABRÒ et al., 2004; DAVIS; BREWSTER, 2004; DEL VALLE, 2004; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

A habilidade dos derivados de ciclodextrina em formar complexos solúveis em água depende do grau de substituição da ciclodextrina, quando modificado preserva as propriedades de solubilização. O grau de substituição da HPβCD 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).

Portanto, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) é um derivado obtido pelo tratamento de uma solução de βCD com propilenoóxido, resultando em uma mistura de isômeros devido à substituição randômica dos grupamentos hidroxílicos, que tem uma atenção especial pela sua alta solubilidade, baixa toxicidade e maior cavidade hidrofóbica em comparação com outras ciclodextrinas da mesma família, fazendo desta CD uma forte candidata para incorporação em formulações farmacêuticas (VEIGA, 1996; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

A tolerância da HPβCD em organismo humano depende da via de administração e da dose (FROMMING; SZEJTLI, 1996). Quando administrada intravenosamente a HPβCD é tolerada em camundongos, macacos, ratos e cachorros em dose única por 90 dias. Especificamente nos macacos do gênero *Cynomolgus* a dose única intravenosa que pode ser aplicada considerando não letal é de 10000 mg/Kg de HPβCD (BREWSTER et al., 1990).

Testes clínicos com humanos foram relatados que sob administração intravenosa a HPβCD nas doses de 0,5 / 1 / 1,5 / 2 / 2,5 ou 3g mostrou que o nível plasmático de HPβCD declinou rapidamente e esse declínio foi bifásico. Não havendo diferença entre homens e mulheres, nos parâmetros farmacocinéticos, bem como tempo de meia vida e depuração (SZATHMARY et al., 1990).

1.3.3.2 Aplicação das ciclodextrinas

Devido a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, as ciclodextrinas vêm sendo extensivamente utilizadas em diversos setores, destacando-se na indústria alimentícia, agrícola, cosmética, têxtil e principalmente na indústria farmacêutica. A indústria alimentícia utiliza as ciclodextrinas na produção de reagentes que reduzem odores e sabores indesejáveis. Na indústria cosmética, está ligada com a diminuição da irritação local, propiciando a ação prolongada e também a diminuição de odores (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). Os complexos de inclusão são encontrados também em produtos da agricultura, como é o caso dos herbicidas Isoproturon e Norflurazon (LIRA et al., 2009). E na indústria têxtil é utilizada na impregnação ou pulverização de tecidos (VYAS, 2008).

A primeira aplicação das ciclodextrinas na indústria farmacêutica foi em 1976 com a utilização de Prostaglandina E2/β-CD. Doze anos após foi utilizado o piroxicam/β-CD.

Porém, a primeira formulação desenvolvida foi uma solução oral de itraconazol/HPβ-CD em 1997 (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Depois da primeira utilização das CDs, estudos começaram a descrever a utilização da HPβCD no aumento da solubilidade de produtos de origem natural, em particular, substâncias liquênicas, como o ácido úsnico (LIRA et al., 2009), o ácido difractáico (SILVA et al., 2012), o ácido fumarprotocetrárico e a atranorina, como compostos padrão de baixa solubilidade em água (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2005).

Na literatura há uma diversidade de fármacos complexados a ciclodextrina, 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.

1.3.3.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas

Geralmente, substâncias químicas de baixa polaridade podem migrar para o interior da cavidade interna das CDs, fenômeno conhecido como complexação, formando complexos de inclusão dinâmicos em solução ou no estado sólido (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Isso se dá pela variedade de forças não-covalentes (química supramolecular), como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, que são responsáveis pela formação do complexo, não ocorrendo interações fortes como ligações covalentes (DEVARAKONDA et al., 2005). Contudo, devido à natureza destas ligações, o complexo ciclodextrina:fármaco está continuamente sendo formado e dissociado (DEL VALLE, 2004; LOFTSSON et al., 2005).

Os mecanismos de interação entre as CDs e o composto hidrofóbico estão envolvidos na formação de complexos de inclusão, de complexos de não-inclusão, de agregados e de soluções de fármacos supersaturadas estáveis (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). O complexo de inclusão obtido exibe novas características físico-químicas, comparadas às moléculas livres, aumentando a solubilidade de substâncias lipofílicas, aumentando a sua biodisponibilidade e diminuindo os efeitos indesejáveis do princípio ativo (DEVARAKONDA et al., 2005).

Nos estudos de estequiometria molecular, o complexo de inclusão pode ser formado por diferentes razões molares de CDs: fármaco (1:1, 1:2 e 2:1) (Figura 1.4). Para as moléculas de baixo peso molecular pode ocorrer a formação do complexo de inclusão por mais de uma molécula na cavidade, assim como, as moléculas de maior peso molecular

podem complexar com mais de uma molécula de ciclodextrina, dependendo da afinidade dos grupamentos e da estereoquímica da molécula (MARTIN DEL VALLE, 2004, LOFTSSON; DUCHENE, 2007).

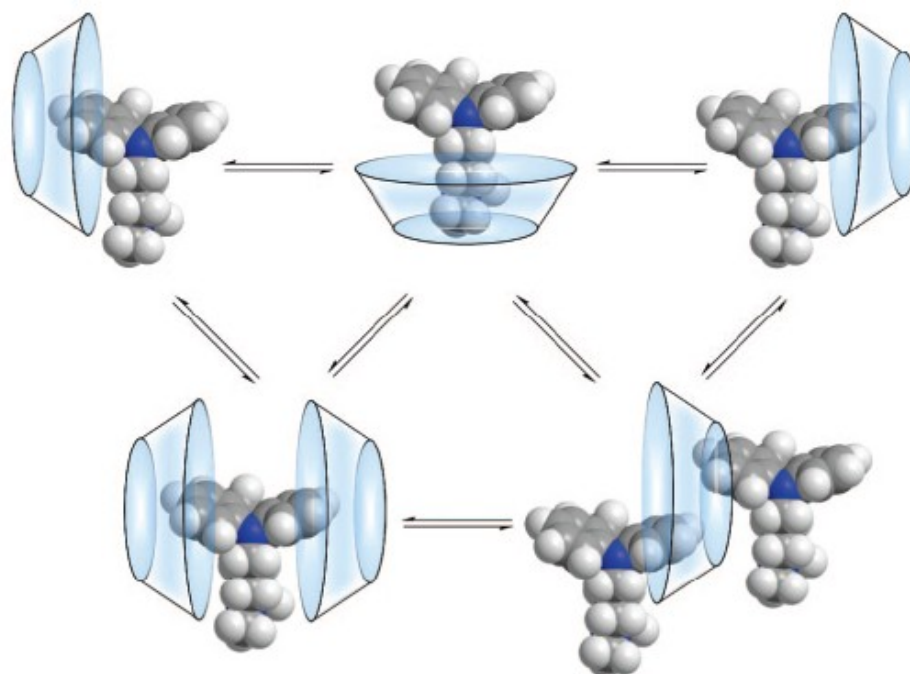


Figura 1.4 Ilustração da associação entre a ciclodextrina e o fármaco (complexos de inclusão 1:1, 1:2 e 2:1) (DE SOUSA et al., 2008).

A estabilidade dos complexos de inclusão é investigada pela constante de estabilidade (K_c). Designada também como constante de dissociação (K_d), é avaliada pela comparação dos complexos 1:1 que 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. 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 (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON et al., 2005).

1.3.3.4 Preparação de complexos de inclusão com ciclodextrinas

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.

No processo físico de misturas de substâncias puras (ciclodextrina e fármaco) pode haver interações entre elas, mas na literatura a mistura física é interpretada como padrão de não complexação. Outros relatos informam que ao macerar a mistura física e acrescentar solvente pode originar uma pasta uniforme que ao secar forma um pó. Essa técnica (pasta) pode permitir que haja interações entre os dois compostos, mas baseia-se na primeira metodologia. Aprimorando a técnica da pasta, a solução resultante da mistura com solvente miscível a água (etanol, por exemplo) pode levar a uma melhoria na interação quando submetidos ao rota-evaporador (co-evaporação). A co-precipitação é outra metodologia, realizada quando ocorre a solubilização da mistura dos constituintes do complexo de inclusão em solução, formando um precipitado. Esse método não pode ser aplicado em escala industrial pela grande quantidade de água utilizada (LIRA, 2007).

Para a obtenção de complexos de inclusão através do método *freeze-drying*, 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 (SILVA, 2011).

A escolha do método de preparo de complexação é importante não só para o produto final obtido, como também a simplicidade do método, baixo custo, rendimento alto, rapidez e principalmente facilidade na transposição de escala (LIRA, 2007). Além de que, cada molécula a ser complexada obtém características peculiares, levando a condições ideais de preparo com a ciclodextrina (MURA et al., 1999).

1.3.3.5 Caracterização físico-química de complexos de inclusão com ciclodextrinas

As substâncias lipofílicas que formam complexos de inclusão 1:1 CD/fármaco, onde uma molécula da CD se complexa com uma do fármaco, é analisada através do estudo de solubilidade de fases, cujo objetivo é relacionar o efeito do agente solubilizante (CDs) na solubilidade de um composto (LOFTSSON et al., 2005).

Os primeiros a descrever o estudo de solubilidade de fases foram Higuchi e Connors no ano de 1965, através do diagrama de solubilidade de fases, obtido pela relação da concentração molar entre o fármaco em relação a contração molar da ciclodextrina (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A curva da solubilidade de fases plotada a partir do diagrama é classificada em: curvas do tipo A, indicando que a molécula hóspede aumenta com incremento da concentração de CD, na formação de complexos de inclusão solúveis com razão estequiométrica molar de 1:1 fármaco:ciclodextrina; curvas do tipo B, as quais sugerem a formação de complexos de inclusão com pobre solubilidade, em alguns casos, inferior à da molécula hospedeira ocorrendo a precipitação à medida que há encapsulação. As curvas do tipo A são subtipadas 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 1.5) (MESSNER et al., 2010).

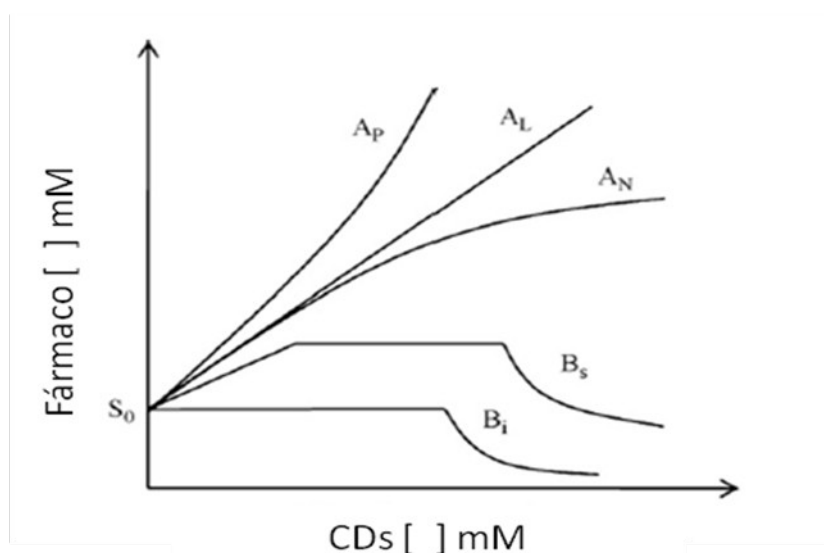


Figura 1.5 Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A (A_L , A_P e A_N) e B (B_S e B_I) (adaptado de MESSNER et al., 2010).

Estes dados do gráfico permitem calcular a estequiometria e a constante de associação ($K_{1:1}$) das curvas formadas, que são utilizadas para comparar as afinidades dos fármacos a diferentes CDs. Calcula-se a constante de associação para complexos de inclusão 1:1 a partir da lineariedade da curva de solubilidade de fases utilizando a equação $K_{1:1} = \text{Slope} / S_0(1 - \text{Slope})$, em que "Slope" é a inclinação da reta e S_0 é a solubilidade intrínseca do composto, assumindo como igual ao valor do Y-intercepto da curva linear (CHALLA et al., 2005).

Outra maneira de comparar os efeitos solubilizantes das CDs, com intenção de revelar a afinidade do composto hidrofóbico 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 (LOFTSSON et al., 2005).

Mesmo com muitas vantagens atribuídas à formação dos complexos de inclusão, o mecanismo de complexação molecular não é suficiente para promover a liberação controlada do agente terapêutico. A fim de melhorar a estabilidade de potentes compostos lipofílicos e obter um perfil de liberação controlada, estudos têm sido realizados na encapsulação de complexos de inclusão em nanosistemas (DE ROSA et al., 2005; FERNANDES et al., 2007).

Muitas são as metodologias que podem ser utilizadas para a investigação dos complexos de inclusão, que permitem não só detectar a formação do complexo de inclusão, como conhecer a sua estrutura química e interações que estabelecem entre os diferentes componentes. No entanto, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente para medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar estes complexos (MENDONÇA, 2011).

Para verificar a integridade da molécula hóspede no complexo de inclusão, os métodos que caracterizam físico-quimicamente essa associação CDs:fármaco são difração de raios-X (XRD), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H) e estudo de solubilidade de fases (LIRA et al., 2009).

Os padrões de difração de raio-X e a microscopia eletrônica de varredura, fundamentados na interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, determinam a cristografia e a topografia da molécula, respectivamente. Essas técnicas são adequadas para os estudos das substâncias purificadas e complexos moleculares (SOUZA; BITTENCOURT; 2008).

O IV é uma metodologia analítica que pode ser utilizada na avaliação da ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido. Sua aplicação limita-se a fármacos que apresentem bandas de absorção características, tais como as resultantes de grupos carbonilo (UEKAMA; OTAGIRI, 1987), que geralmente se apresentam separadas das bandas características das CDs e sofrem facilmente desvios devido à complexação (SZEJTLI, 1994).

Apesar da possibilidade do emprego de diversas técnicas para a investigação do processo de inclusão, apenas análises por ^1H RMN podem comprovar a estrutura do

complexo formado, a partir da observação de uma alteração sensível dos sinais obtidos tanto para a CD como para o substrato (CAVALCANTI et al., 2011).

1.3.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência em rápida expansão, que abrange o desenvolvimento de materiais no tamanho nanométrico. Nanômetro é sua unidade de medida, que correlaciona com a bilionésima parte do metro (10^{-9}). Dimensão essa muito superior aos padrões de moléculas orgânicas, porém com uma menor gama de abordagem de muitas proteínas e macromoléculas biológicas (Figura 1.6) (FARIJ; WIFP, 2009).

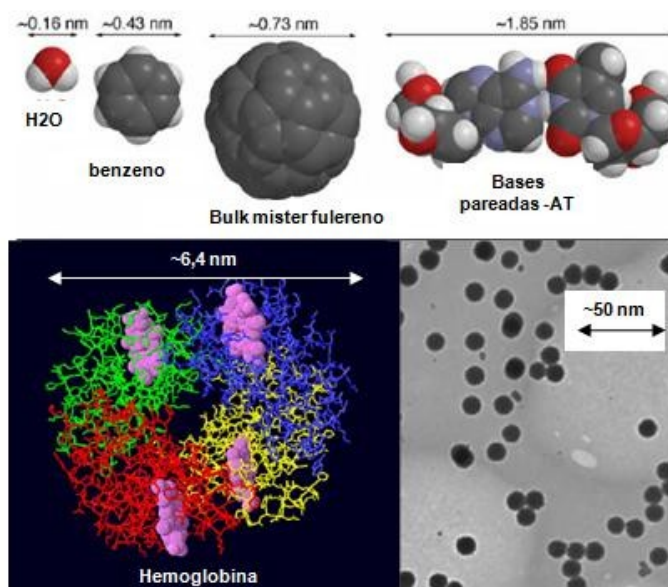


Figura 1.6 Tamanho de moléculas orgânicas e macromoléculas biológicas em relação às nanopartículas de sílica (adaptado de: FARIJ; WIFP, 2009).

No ano de 1959, o físico Richard Feynman ganhou o prêmio Nobel relatando sobre as possibilidades, vantagens e mudanças com a obtenção de materiais em nanoescala (FEYNMAN, 1959). Anos após, Eric Drexler começou a construção de máquinas em escala molecular, de apenas alguns nanômetros de tamanho como braços de robô, motores e computadores, muito menores que uma célula. Contudo, o significado da palavra mudou para nanotecnologia, a fim de abranger os tipos mais simples de tecnologia à escala nanométrica (DREXLER, 2006).

De acordo com Mendonça (2011), os nanotecnólogos têm estudado nos últimos anos as propriedades dos nanomateriais para diversas aplicabilidades biológicas, destacando-se: agentes de contraste para imagens de células e animais no diagnóstico, além da terapêutica no tratamento de doenças.

O enorme potencial de trazer a saúde humana, pesquisadores têm utilizado a nanotecnologia, principalmente na área de desenvolvimento de medicamentos. Os nanocarreadores promovem uma melhoria na liberação de fármacos, com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos com baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e alta toxicidade (SAHOO et al, 2006; SAKATA et al., 2007).

1.3.4.1 Sistemas de liberação controlada

A tecnologia de sistemas de liberação de fármacos surgiu na década de 80, na tentativa de retardar a liberação do princípio ativo, direcionando-o a sítios específicos, com a capacidade de agregar-se no órgão, ou tecido-alvo, de forma seletiva e quantitativa, independente do local e do método de sua administração. Desta forma, a concentração do fármaco em outros órgãos e tecidos não-alvo deve ser mínima ou nenhuma, evitando efeitos colaterais (TORCHILIN, 2005; STAMATIALIS et al., 2008).

Os nanosistemas são vetores medicamentosos que liberam o princípio ativo de forma controlada, mantendo a concentração adequada no plasma por um período de tempo duradouro. Essa vetorização está fundamentada nas características do veículo: tamanho, lipofilia, estabilidade e citopismo do composto, bem como o comportamento em fluidos biológicos (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

Há uma variedade de nanocarreadores que podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada, como micropartículas, nanopartículas, lipossomas, dendrímeros, nanotubos, 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 (FIGURA 1.7) (PETITTI et al., 2008).

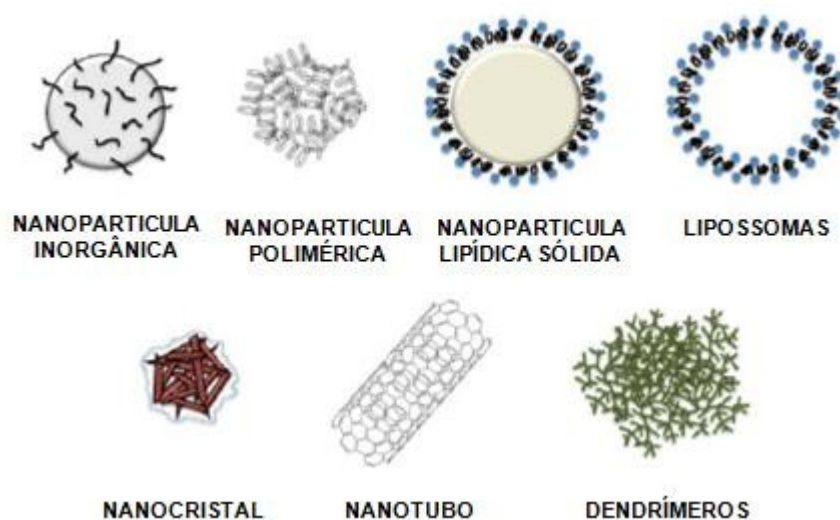


Figura 1.7 Ilustração de alguns tipos de nanosistemas (adaptado de: FARIJ; WIFP, 2009).

A administração desses sistemas de liberação controlada em relação às formas farmacêuticas convencionais apresenta vantagens, como: otimização do número de doses; liberação do fármaco por um tempo maior; direcionamento a alvos específicos; proteção do princípio ativo; redução dos efeitos adversos indesejáveis; maior conveniência para o paciente e redução dos custos na saúde (Figura 1.8) (BRANNON-PEPPAS, 1995; PETITTI et al., 2008).

Segundo Lira (2007), o objetivo principal da utilização de um sistema de liberação controlada é a manutenção constante da concentração plasmática do fármaco dentro da faixa terapêutica em função do tempo, evitando efeitos tóxicos (doses múltiplas) e a dose subterapêutica da substância ativa.

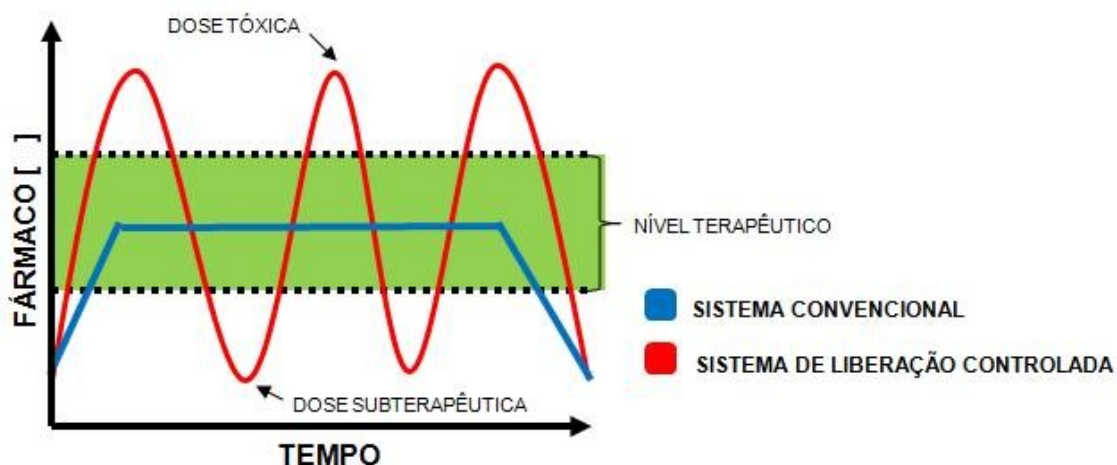


Figura 1.8 Comparação do perfil farmacocinético de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada (adaptado de LIRA, 2007).

1.3.4.2 Lipossomas

Dentre as várias formas de sistemas de liberação controlada, os lipossomas vêm sendo bastante estudados, pois ainda não obtiveram o impacto significativo na medicina (FARIJ; WIFP, 2009). Os primeiros estudos foram realizados por Alec Bangham (1963) através da hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de um frasco de vidro, observando que as moléculas lipídicas formavam estruturas vesiculares. Logo mais, Gregory Gregoriadis investigou o transporte e a liberação de fármacos por vesículas lipossomais, propondo pela primeira vez a utilização de lipossomas, como um veículo de compostos ativos. No ano de 1965 o termo lipossoma foi determinado por Weissman, que do grego quer dizer lipos=gordura + soma=corpo (ANDRADE, 2003; FRÉZARD et al., 2005).

Os lipossomas são nanovesículas esféricas constituídas por bicamadas lipídicas que encerram no seu interior um ou mais compartimentos aquosos (ALVES, 2008).

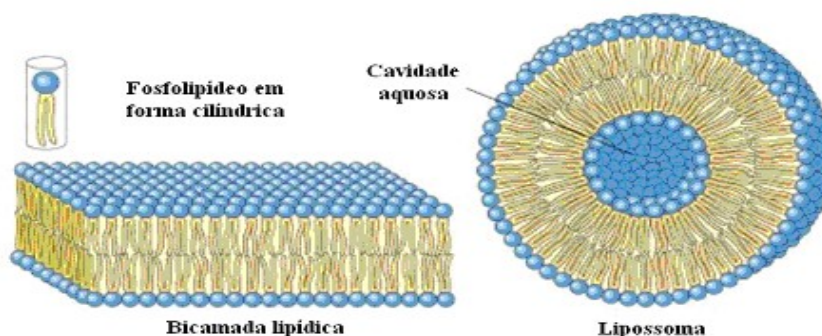


Figura 1.9 Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípídio, da bicamada lipídica e do lipossoma (Adaptado de: courses.cm.utexas.edu).

O grande interesse no estudo dos lipossomas é pelo fato de serem nanoestruturas carreadoras de moléculas hidrofílicas e lipofílicas (como quimioterápicos, hemoglobinas e co-fatores, antígenos, imunomoduladores e material genético), sendo considerados veículos biodegradáveis, biocompatíveis, não imunogênicos, flexíveis devido a sua composição, tamanho e fluidez da bicamada lipídica (TORCHILIN, 2005; EDWARDS; BAEUMNER; 2006; BATISTA et al, 2007).

Outro dado que corrobora a importância dos lipossomas é o fato de que os elementos constituintes da bicamada lipídica são idênticos a membrana natural das células. Essa similaridade pode ser aumentada com modificações químicas na membrana do lipossoma, permitindo o direcionamento de fármacos a células alvo. Contudo, a membrana celular é

pontilhada com uma miríade de receptores que vinculam o meio extracelular aos seus respectivos ligantes (lipossomas cuja superfície é funcionalizada com ligantes) na transdução de um sinal no espaço intracelular. Sinal este, que pode desencadear uma infinidade de caminhos bioquímicos, causando a internalização dos sistemas lipossomais, via endocitose (Figura 1.10) (ANDRADE, 2003; FARIJ; WIFP, 2009).

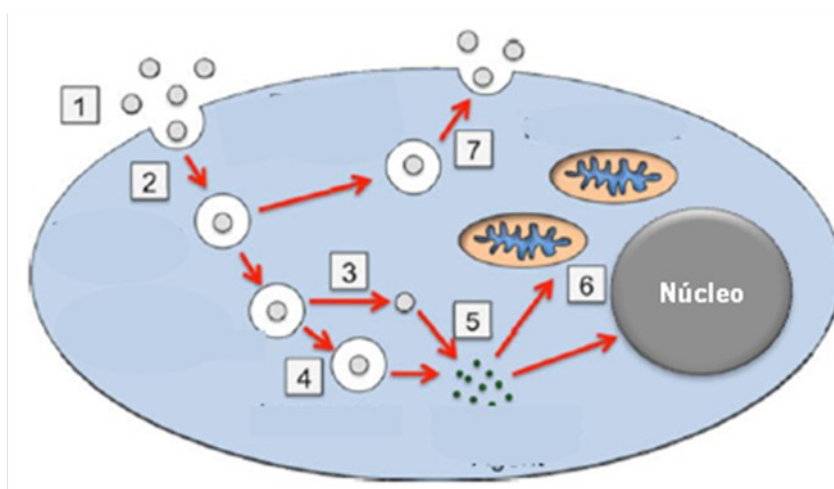


Figura 1.10 Ilustração das etapas de entrada citosólica do lipossoma. 1-Associação celular dos lipossomas; 2- Internalização dos lipossomas através de endocitose; 3-Escape endossomal dos lipossomas; 4- Degradação lisossomal; 5- Agente terapêutico livre e difuso no citoplasma; 6- Transporte citoplasmático do agente terapêutico para a organela alvo; 7- Exocitose de lipossomas (adaptado de: FARIJ; WIFP, 2009).

Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélin, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. Os fosfolipídeos (de origem sintética ou natural) são componentes essenciais nos sistemas lipossomais, sendo a fosfatidilcolina mais utilizada, devido ao alto grau de insaturação e sua ramificação na cadeia lipídica, conferindo uma maior fluidez, rigidez e uma diminuição na oxidação. Devido a sua anfifilia, os fosfolipídeos apresentam em sua estrutura molecular uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica (BATISTA et al., 2007; ALVES, 2008).

Há casos em que durante a preparação dos lipossomas, esteróides são incorporados na tentativa de aumentar a rigidez da membrana lipossomal, ocasionando consequentemente a estabilidade. Um tipo de esteróide é o colesterol, que melhora a estabilidade da vesícula na presença de fluidos biológicos como o sangue, através da redução da interação das proteínas plasmáticas com as membranas dos lipossomas,

diminuindo assim a desestrututurção dos mesmos. Outras formulações tendem a utilizar carga na superfície das membranas dos lipossomas, com a fosfatidilserina e o fosfatidilglicerol como carga negativa e a estearilamina como carga positiva, evitando assim precipitação e instabilidade (KIM, 2007; ALVES, 2008).

Na comunidade científica, os lipossomas são aplicáveis para diagnóstico de cânceres, encapsulando agentes de contrastes, índio e muramilpeptídeo (ativador de macrófagos tumorocidas). Também são empregados como veículos de agentes citostático, antivirais, antiparasitários, antifúngicos, hormônios, enzimas, vacinas e genes (ANDRADE, 2003; BATISTA et al., 2007; MACHADO et al., 2007).

Vários produtos a base de lipossomas foram estudados experimentalmente com interesse no mercado farmacêutico. Exemplos de moléculas como anfotericina B e a nistatina (antifúngicos), doxorubicina, daunorubicina, vincristina, citarabina, cisplatina e recentemente mitoxantrona (quimioterápicos), vidarabina (antiviral), e por último a gentamicina e ampicilina (antibióticos) (LIRA, 2007; MACHADO et al., 2007; LAPENDA, 2009).

1.3.4.2.1 Classificação dos lipossomas

Os lipossomas são classificados quanto às suas propriedades com os sistemas biológicos mediante a via de administração farmacêutica e método de preparo. Estas propriedades são: tamanho de vesícula, número de lamelas e composição química (TORCHILIN, 2005; BATISTA et al., 2007).

O tamanho do lipossoma e o número de suas lamelas classificam os lipossomas em: vesículas multilamelares grandes (MLV- multilamellar large vesicles), vesículas unilamelares grandes (LUV - large unilamellar vesicles), vesículas multivesiculares (MMV - multivesicles vesicles) e vesículas unilamelares pequenas (SUV - small unilamellar vesicles) (Figura 1.11). Os SUVs mostram um diâmetro de até 100 nm, diferenciando-se dos demais tipos que variam em escala micrométrica, possuindo um compartimento aquoso (LUV), ou com vários compartimentos intercalados (MLV), ou com diferentes tamanhos de lamela (MMV) (BATISTA et al., 2007).

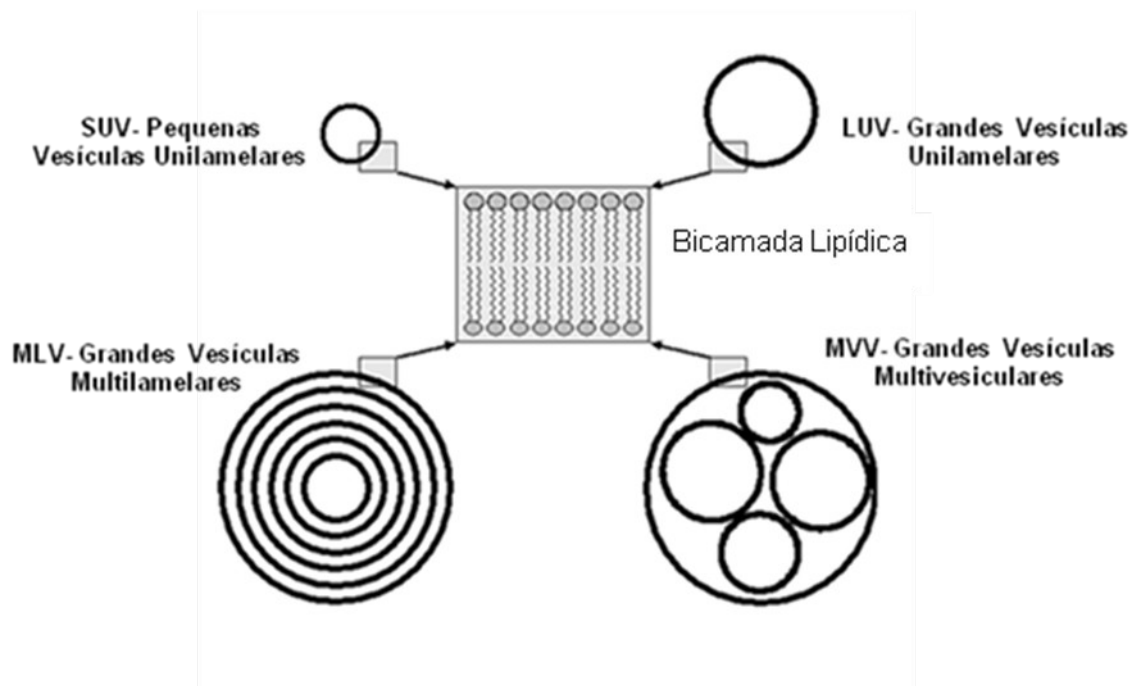


Figura 1.11 Ilustração esquemática dos diferentes tipos de lipossomas quanto ao tamanho. SUV- Pequenas Vesículas Unilamelares, LUV- Grandes Vesículas Unilamelares, MLV- Grandes Vesículas Multilamelares, MVV- Grandes Vesículas Multivesiculares. (adaptado de <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1243>).

Quanto à composição química, os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos, sítio-específicos e lipossomas polimórficos (Figura 1.12).

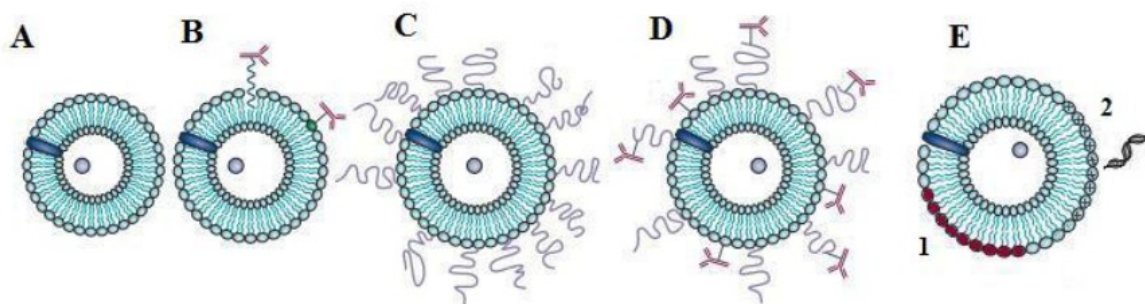


Figura 1.12 Ilustração esquemática dos tipos de lipossomas quanto à sua composição. **A-** Lipossomas convencionais. **B-** Lipossomas sítio-específicos. **C-** Lipossomas furtivos. **D-** Lipossomas direcionados de longa circulação. **E-** Lipossomas polimórficos: 1- lipossoma sensível ao pH ; 2- lipossoma catiônico (LAPENDA, 2010).

Conhecidos como lipossomas de primeira geração, os lipossomas convencionais são constituídos basicamente de fosfolipídios, colesterol e um lipídio de carga. Caracterizam-se

por uma rápida circulação sanguínea, pois tendem a se acumular nas células do sistema retículo-endotelial, ou sistema fagocitário mononuclear, devido ao reconhecimento por macrófagos. Lipossomas do tipo LUV e MLV são rapidamente reconhecidos e eliminados da circulação (através do baço, fígado e rins), enquanto que os SUVs têm meia-vida mais longa. Por conseguinte, essa captura dos lipossomas, limita a sua aplicação nos tratamentos de diversas patologias (KOO et al., 2005; IMMORDINO et al., 2006; BATISTA et al., 2007).

Alterações na superfície dos lipossomas é a alternativa para aumentar o tempo de permanência na corrente sanguínea. Os lipossomas furtivos apresentam na sua bicamada lipídica componentes como o gangliosídeo (GM1), fosfatidilinositol e polímeros hidrofílicos sintéticos inertes biocompatíveis, especificamente os polietilenoglicóis (PEGs), cuja finalidade é um revestimento que tenta o bloqueio da adsorção de opsoninas nos lipossomas, inibindo o processo de reconhecimento (TORCHILIN, 2005; IMMORDINO et al., 2006).

Na busca de aumentar o acúmulo dos lipossomas nos tecidos e órgãos alvos, o estudo de moléculas ligantes tem sido acentuado ultimamente. A incorporação de diversos ligantes (anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos e as lectinas) em lipossomas confere o direcionamento para receptores e determinantes antigênicos nas células alvo, proporcionando a distribuição específica do fármaco encapsulado (SIHORKAR; VYAS, 2001; EDWARDS; BAEUMNER, 2006; BATISTA et al., 2007). Os lipossomas sítio-específicos ou imunolipossomas, assim chamados por obterem moléculas ligantes em sua membrana através de ligações covalentes ou pela inserção de resíduos hidrofóbicos, combinam com as propriedades dos lipossomas furtivos, originando os lipossomas de longa duração (TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2006; IMMORDINO et al., 2006).

Os lipossomas polimórficos são aqueles que se tornam reativos, devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática. Quando se trata da ação antitumoral, o tecido neoplásico possui um pH menor que o fisiológico, conferindo aos lipossomas sensíveis de pH a sua utilização para liberar o fármaco no citoplasma. São também aplicáveis como: (a) transporte de sondas fluorescentes que permitem não somente avaliar a eficácia de diferentes composições de lipossomas, como também esclarecer os mecanismos envolvidos em seu tráfego intracelular; (b) a liberação eficiente de drogas antineoplásicas ou proteínas recombinantes; (c) transporte intracelular de antígenos; (d) transporte intracelular de material genético para aplicação nas terapias antisense e gênica (SIMÕES et al., 2004; BATISTA et al., 2007).

Outros tipos são os lipossomas termo-sensíveis, formados por uma mistura de lipídios que têm sua T_c um pouco acima da temperatura fisiológica, utilizados na hipertermia (tecidos com tumores, metástase, inflamações e infecções), havendo a liberação do conteúdo lipossomal (SANDIP et al., 2000). Os lipossomas catiônicos apresentam carga positiva na superfície sendo utilizado na terapia gênica para liberação de ácidos nucleicos dentro das células (TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2006; IMMORDINO et al., 2006; BATISTA et al., 2007; MAITANI et al., 2008).

1.3.4.2.2 Métodos de preparação e caracterização dos lipossomas

A fabricação de lipossomas não é apenas a formação aleatória das membranas, mas obter membranas formadoras de vesículas com estrutura e tamanho ideais com propósito de encapsular substâncias biologicamente ativas (ANDRADE et al., 2004). Há vários métodos de preparação de lipossomas (extrusão, ultrassom, microfluidição, evaporação em fase reversa e hidratação de filme lipídico), o mais clássico é o de hidratação do filme lipídico. Nesse, a fase orgânica é preparada com a solubilização dos lipídeos por solventes orgânicos, em seguida, forma-se o filme lipídico pela evaporação do(s) solvente(s) à pressão reduzida. Então, a fase aquosa é adicionada ao recipiente contendo o filme lipídico formando-se espontaneamente as vesículas (SANTOS; CASTANHO, 2002; FRÉZARD et al., 2005). Os lipossomas obtidos pelo método da hidratação do filme lipídico podem ser submetidos à ação de ultrassom com ajuda de uma sonda ou banho. A energia liberada promove a diminuição do raio dos MLVs tornando-os SUVs (ANDRADE et al., 2004; HATZI et al., 2007).

Os lipossomas podem ser caracterizados quanto aos estudos de estabilidade (acelerada e a longo prazo), determinando o diâmetro e a distribuição do tamanho de partícula, variações de pH, aspecto macroscópico e microscópico das vesículas, além da cinética de liberação controlada.

Para selecionar a melhor formulação presumindo a otimização do processo, os estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo são bastante utilizados.

As formulações são submetidas a condições críticas através de ensaios de centrifugação e estresse mecânico, avaliados pelo estudo de estabilidade acelerada. Já no estudo de estabilidade a longo prazo é avaliada a durabilidade das formulações. Os parâmetros avaliados neste estudo são: eficiência de encapsulação, diâmetro da partícula e o índice de polidispersão, potencial zeta e o pH das formulações ao longo do tempo. Outros pontos relevantes neste estudo são os aspectos macroscópicos e microscópicos, de acordo

com a presença de aglomerados, precipitados e cristais do fármaco nas suspensões lipossomais. A morfologia dos lipossomas pode ser determinada através da microscopia óptica e eletrônica de varredura e de transmissão (ANDRADE et al., 2004).

O método de difusão em saco de diálise tem sido utilizado para verificar a combinação de processos de difusão e erosão do fármaco estudado (SCHAFFAZICK et al., 2003). Assim, traçando o perfil cinético de liberação controlada da substância ativa no nanosistema.

1.3.4.3 Aplicação de substâncias liquênicas na nanotecnologia

Estudos pioneiros com a encapsulação de substâncias liquênicas oferecem novas perspectivas para sua utilização no tratamento do câncer. Nestes estudos, foram comprovados que a encapsulação do ácido úsnico de *Cladonia substellata* reduziu a proliferação *in vitro* de células NCI-H292 (câncer de pulmão), e potencializou a ação antitumoral frente ao tumor experimental sarcoma-180 (RIBEIRO-COSTA, et al., 2004; SANTOS et al., 2005; 2006). Nos ensaios de toxicidade crônica *in vivo* foi evidenciada uma significativa redução dos efeitos hepatotóxicos nos animais tratados com o ácido úsnico encapsulado (SANTOS et al., 2006; FERRAZ, et al., 2008, 2009). Análises do perfil farmacocinético do ácido úsnico nanoencapsulado em ratos utilizando a via intravenosa e intraperitoneal revelaram que a concentração sistêmica desta droga praticamente duplicou quando este foi administrado sob a forma nanoencapsulada. Sua biodisponibilidade aumentou em torno de 20% quando comparado à forma livre (SANTOS et al., 2009).

A nanoencapsulação do ácido fumarprotocetrárico utilizando uma microemulsão óleo/água (o/a) com Cremophor® e incorporado como fase interna oleosa de nanocápsulas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) foi realizada, evidenciando nos ensaios *in vivo* uma potencialização de ação antitumoral em torno de 20%. Em contraste, foi observada uma alta toxicidade nos estudos *in vitro* frente às células HEp-2, e nos testes *in vivo* uma toxicidade crônica em ratos, quando tratados com a microemulsão o/a ou nanocápsulas contendo ácido fumarprotocetrárico incorporado a microemulsão o/a (SIMONETTI et al., 2009).

Diante desses resultados que precisam ser melhorados, quanto a toxicidade e aumento da solubilidade do fármaco, o desenvolvimento de complexos de inclusão entre o ácido fumarprotocetrárico e a ciclodextrina poderão ser uma alternativa para eficácia terapêutica.

Kristmundsdóttir e colaboradores (2002; 2005) utilizaram o ácido úsnico como um protótipo de droga insolúvel e tentaram obter um solvente que fosse capaz de solubilizar o

ácido, não sendo capaz de interferir nos testes de atividade bactericida. Na pesquisa, foram utilizados co-solventes (glicofurol 75, propilenoglicol, polietinoglicol 400), surfactantes (polissorbato 20 e cremofor RH40), o agente complexante 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina e diferentes pHs. Os resultados demonstraram que somente a ciclodextrina foi capaz de solubilizar o ácido úsnico e não interferir diretamente nos testes realizados nas células, satisfazendo assim os critérios de solubilidade e baixa toxicidade necessários para realização de testes de atividade biológica nas células

Recentes estudos provaram que a nanoencapsulação de complexos de inclusão entre o ácido úsnico e a β-ciclodextrina em lipossomas tornou-se uma excelente alternativa para superar as limitações relacionadas à solubilidade bem como biodisponibilidade do ácido úsnico (LIRA et al., 2009).

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico UV para determinação do ácido fumarprotocetrárico de *Cladonia verticillaris* (líquen) em complexos de inclusão com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

Thiers Araújo Campos^{1,2,4}, Camilla Vila Nova Soares Silva^{2,4}, 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 fumarprotocetrário (AF), isolado de *Cladonia verticillaris* é uma depsidona β-orcinal que apresenta diversas propriedades biológicas, tais como: antibiótica, antiproliferativa, anti-inflamatória e antitumoral. No entanto, seu uso terapêutico é limitado devido sua baixa hidrofiliabilidade e alta toxidez. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que podem formar complexos de inclusão com várias substâncias hidrofóbicas, promovendo um aumento da solubilidade e biodisponibilidade. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método espectrofotométrico UV para dosagem e quantificação do ácido fumarprotocetrário em complexos de inclusão com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (AF-HPβCD). Os parâmetros de validação foram estudados segundo as exigências da Conferência Internacional de Padronização de Uso Humano (ICH). Na determinação da linearidade foram realizadas três curvas padrões de AF (0,5-8,0 μg.mL⁻¹). O coeficiente de correlação foi 0,999, significando que 99% da variação total em torno da média explicam-se pela regressão linear com equação da reta dada por Absorvância = 0,1119x[AF] + 0,0071. A exatidão atesta a recuperação do ácido fumarprotocetrário em 90,97%, 99,29% e 98,43% para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente, obtidas do complexo de inclusão (AF-HPβCD). Os coeficientes de variação intra-dia e inter-dia apresentaram valores inferiores a 5% (p < 0.05). Não foram evidenciadas interferências da HPβCD nos complexos de inclusão obtidos, caracterizando o método como preciso e robusto. Os limites de detecção e quantificação do ácido fumarprotocetrário foram de 0,24 e 0,74 μg.mL⁻¹, respectivamente. A metodologia proposta demonstrou ser simples, precisa, robusta e reprodutível.

Palavras-chave: líquens, ácido fumarprotocetrário; método espectrofotométrico UV.

2.2 Abstract

Fumarprotocetrárico acid (HF), isolated from *Cladonia verticillaris* is a β -depsidona orcinol which has biological properties such as: antibiotics, anti-proliferative, anti-inflammatory and antitumor activities. However, its therapeutic use is limited due to its low toxicity and high hydrophilicity. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides which may form inclusion complexes with various hydrophobic substances, providing an increased solubility and bioavailability. The aim of this study was to develop and validate a UV spectrophotometric method for determination and quantification of the acid in fumarprotocetrárico inclusion complexes with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD-AF). The validation parameters were studied according to the requirements of the International Standards for Human Use (ICH). In determining the linearity curves were three patterns of AF (0.5 to 8.0 μ g.mL⁻¹). The correlation coefficient was 0.999, meaning that 99% of total variation about the mean explained by the linear regression equation of the line given by Absorbance = 0.1119 x [AF] + 0.0071. The accuracy attests to the recovery of hydrogen in fumarprotocetrárico 90.97%, 99.29% and 98.43% for concentrations low, medium and high, respectively, obtained from the inclusion complex (AF-HP β CD). The coefficients of variation intra-day and inter-day were below 5% ($p < 0.05$). There was no evidence of interference in HP β CD inclusion complexes obtained, characterizing the method as accurate and robust. The limits of detection and quantification of fumarprotocetrárico acid were 0.24 and 0.74 μ g.mL⁻¹, respectively. The proposed methodology proved to be simple, accurate, robust and reproducible.

Key-words: lichen; fumarprotocetraric acid; UV spectrophotometric method.

2.3 Introdução

Os líquens são organismos de uma complexa simbiose entre fungos e algas, cujos metabólitos secundários têm sido utilizados para diversos fins, principalmente na medicina popular (Muller, 2001). Muitos destes compostos incluem depsidós, depsidonas, dibenzofuranos, antraquinonas, xantonas, derivados de ácido pulvínico e ácido alifático, mostrando interessantes atividades biológicas e farmacológicas (Muller, 2001; Huneck, 2001).

As depsidonas, conhecidas como potentes anticancerígenos, são formadas pela esterificação de dois ácidos carboxílicos aromáticos ligados por uma unidade intramolecular de oxigênio (Russo et al., 2006). Além de relevante atividade anti-retroviral, como inibidores da integrase do HIV-1, as depsidonas têm a capacidade de absorção de luz UV, com potencial para uso em formulações de filtros solares e como inibidores da lipoxigenase-5, desempenhando uma importante função em uma variedade de processos patofisiológicos em humanos, particularmente em reações inflamatórias (Ingólfssdóttir et al., 1996).

Titulado por ser um ácido dibásico, o ácido fumarprotocetrárico (Figura 2.1) é uma depsidona da série meta do tipo β-orcinol, isolado de *Cladonia verticillares* (Honda; Vilegas, 1998; Edwards et al., 2003; Hauck et al., 2010).

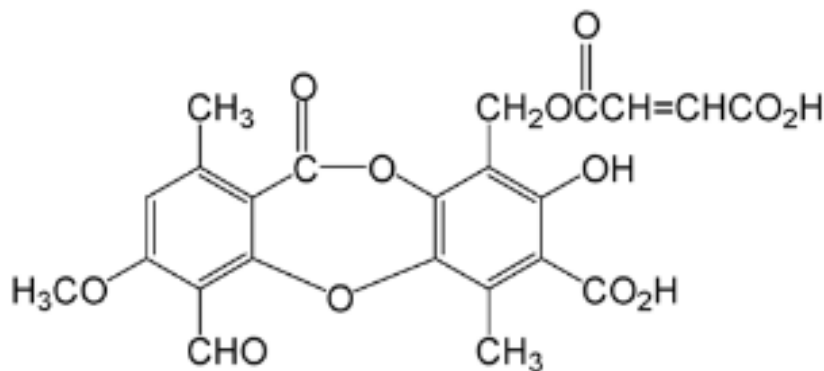


Figura 2.1 Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico ($C_{22}H_{16}O_{12}$) (Santos et al., 2004).

O ácido fumarprotocetrárico apresenta diversas atividades biológicas a citar: antibiótica (Ingólfssdóttir, 2002), antiinflamatória, antinoceptiva, antipirética (Maia et al., 2002), antiproliferativa (Nascimento et al., 1994) e antitumoral (Santos et al., 1996). Contudo, suas características físico-químicas tornam as propriedades biológicas limitantes, por apresentar um baixo grau de ionização (pK_a : em metanol de 2,8), por conseguinte baixa solubilidade e um ponto de fusão aproximado de 250 °C (Edwards et al. 2003; Hauck et al., 2010).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos conhecidos por sua habilidade principalmente de incorporar moléculas apolares. O complexo obtido exibe novas características físico-químicas quando comparadas às moléculas livres. A complexação proporciona uma melhoria na estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade (Del Valle, 2004; Devarakonda et al., 2005).

Para garantir a qualidade final de um produto biotecnológico é necessário entre outros parâmetros, o doseamento do princípio ativo. Das inúmeras técnicas de quantificação, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência, mas sua aplicação é restrita por ser onerosa, com tempo de análise relativamente longo e requerer experiência no manuseio do equipamento para processamento das amostras. Já a espectroscopia ultravioleta (UV) é uma técnica de baixo custo e de fácil manipulação no controle de qualidade de produtos naturais (Siqueira-Moura et al., 2008).

Visando validar o método de quantificação do ácido fumarprotocetrárico, para futuros estudos do entendimento, não apenas do princípio ativo em questão, como também de moléculas com alto potencial biológico, é necessário o desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV.

2.4 Metodologia

2.4.1 Materiais

O ácido fumarprotocetrárico (AF) foi isolado e purificado pela Dra. Neli Kika Honda, do Laboratório de Química de Produtos Naturais/UFMS. O metanol, diclorometano, clorofórmio e a acetonitrila foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico. A 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina foi fornecida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). As análises de quantificação do ácido fumarprotocetrárico foram realizadas no 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 analítico, o metanol foi escolhido como solvente referência, pelo fato de não apresentar absorção na faixa de 200 a 400nm em espectroscopia UV-Vis. Inicialmente uma concentração conhecida AF foi solubilizada em três diferentes solventes orgânicos (diclorometano, clorofórmio e acetonitrila), no intuito de

se escolher o melhor diluente. Em seguida foi realizada uma varredura no espectrofotômetro UV-Vis, de cada solvente, no intuito de se averiguar a presença de interferentes em relação ao solvente referência. Após a escolha do solvente diluente, foi determinado o comprimento de onda de maior absorbância para o ácido fumarprotocetrárico na variação de 200 a 400 nm.

2.4.3 Solução padrão

Na preparação da solução padrão, foram pesados 2,5 mg de ácido fumarprotocetrárico e transferido a um balão volumétrico de 25 mL. Consecutivamente foi adicionado metanol e acetonitrila, na proporção 4:1, resultando numa concentração final de 100 µg/ml.

2.4.4 Validação do método analítico

No intuito de se validar o método espectrofotométrico UV para determinação do ácido fumarprotocetrárico, os parâmetros de validação (linearidade, exatidão, precisão, robustez, especificidade, limite de quantificação e limite de detecção) foram baseados 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) e pela Farmacopéia Americana (USP, 2003).

2.4.4.1 Linearidade

A linearidade foi verificada, utilizando-se três curvas padrões, derivadas de cada solução padrão, verificando a reprodutibilidade autêntica (0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 µg.mL⁻¹). Nessa investigação, foi plotando um gráfico da média das nove curvas, analisando a regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados quanto ao desvio padrão relativo e o coeficiente de determinação (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 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Através da equação da reta calculou-se, o desvio padrão residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular). Determinando assim, o limite de detecção e quantificação (Equações 2 e 3, respectivamente).

$$LD = (D.P./I) \times 3,3 \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = (D.P./I) \times 10,0 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde LD é o limite de detecção e LQ é o limite de quantificação; D.P. é o desvio padrão da inclinação da reta das três curvas analisadas, com relação aos eixos dos Y e I é o coeficiente angular de calibração.

2.4.4.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através da recuperação do ácido fumarprotocetrárico a partir de complexo de inclusão AF-HPβCD, em três níveis de concentrações: concentração baixa, média e alta (respectivamente, 0,5; 2 e 8 µg.mL⁻¹). O teste de recuperação foi realizado em triplicata, para cada nível de recuperação e a percentagem de recuperação foi calculada a partir da curva de calibração (Equação 4).

$$E(\%) = CME/CT \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

O E (%) representa a exatidão, o CME é a concentração média experimental, e o CT é a concentração teórica.

2.4.4.4 Precisão

Na análise de precisão foram considerados os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária. Objetivando avaliar a repetibilidade do método, foram preparadas seis amostras de 2 µg.mL⁻¹ e dosadas em dias diferentes e analistas diferentes. A precisão intermediária foi estudada a partir de três amostras de diferentes concentrações (0,5, 4 e 8 µg.mL⁻¹), no mesmo dia (intra-dia) e no outro dia (inter-dia), manipulados por dois analistas. As análises foram averiguadas pelo teste *t* de *Student* (teste bilateral, $p < 0,05$).

2.4.4.5 Robustez

A robustez foi avaliada ao submeter uma solução do ácido fumarprotocetrário ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a variação de temperatura (25°C e 37°C) e pela mudança de fabricante do solvente (Merck e Vetec). A concentração de ácido fumarprotocetrário foi determinada utilizando seis ensaios diferentes. A robustez foi verificada utilizando análises de coeficientes de variação obtidas entre as médias, utilizando o teste *t* de *Student* (teste bilateral, $p < 0,05$).

2.4.4.6 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de varreduras entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm do ácido fumarprotocetrário, a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina e o complexo de inclusão. O princípio do método consiste em investigar a presença de picos de interferência (ICH, 2005) entre o princípio ativo e os excipientes utilizados na preparação farmacêutica.

2.4.5 Aplicação farmacêutica do método

2.4.5.1 Preparação do complexo de inclusão contendo ácido fumarprotocetrário: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

Os complexos de inclusão (AF-HPβCD) foram preparados através da técnica freeze-drying, conforme Lira et al., 2009. O ácido fumarprotocetrário foi pesado e acondicionado no tubo tipo de penicilina, para posterior adição da solução de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, pesado na razão equimolar 1:1 do analito. Os constituintes da solução permaneceram sob agitação por 48 horas, a temperatura ambiente (25°C), até verificar a formação de uma solução homogênea. Consecutivamente, os frascos contendo os complexos de inclusão foram congelados a -80°C e submetidos ao processo de liofilização.

2.4.5.2 Determinação do teor do ácido fumarprotocetrário nos complexos de inclusão

A partir do complexo de inclusão (AF-HPβCD), foi retirado a massa equivalente ao ácido fumarprotocetrário (1mg), para obter uma solução padrão ($100 \mu\text{g/ml}$). A análise

espectroscópica do teor do ácido fumarprotocetrárico foi através da diluição da solução padrão, na concentração de 4 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Desenvolvimento da metodologia analítica

A análise comparativa da varredura em espectroscopia UV dos diferentes solventes testes em relação ao solvente referência (metanol), demonstrou que o clorofórmio e diclorometano apresentaram interferência, quando comparados a acetonitrila (Figura 2.2).

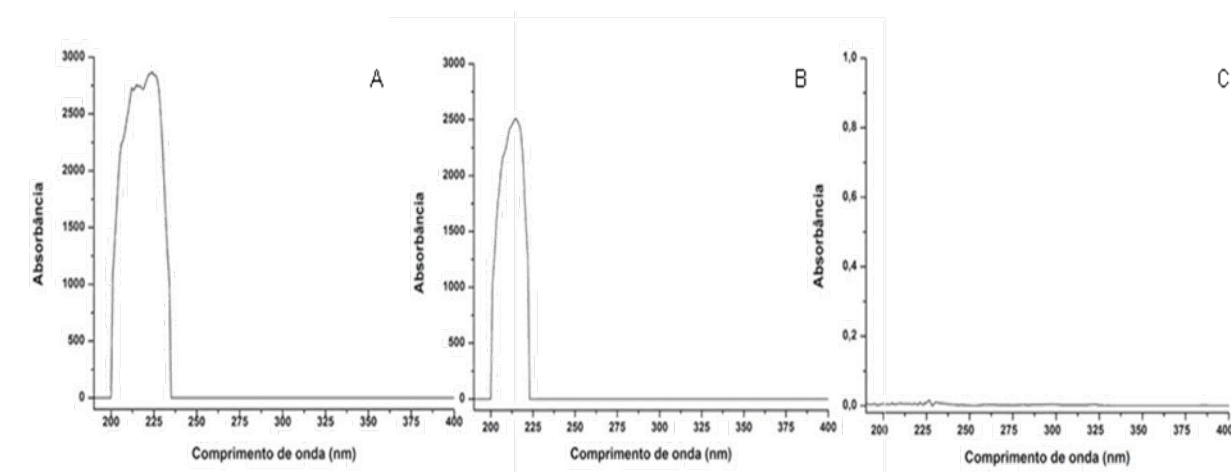


Figura 2.2 Espectro de varredura dos solventes: (A) Clorofórmio; (B) Diclorometano; (C) Acetonitrila.

O solvente de escolha para solubilização do ácido fumarprotocetrárico foi a acetonitrila e metanol numa proporção 4:1. O espectro de varredura do ácido fumarprotocetrárico na faixa de 200 a 400 nm demonstrou um pico de absorbância máxima no comprimento de onda de 203 nm, todavia, em maiores concentrações (4, 6 e 8 µg/ml) observa-se um leve deslocamento para 210 nm (Figura 2.3).

Segundo Gudjónsdóttir e colaboradores (1997), a detecção do ácido fumarprotocetrárico utilizando uma curva de 0,2 a 1,1 µg/ml, através de cromatografia líquida de alta eficiência foi de 210 nm. Dessa forma, os resultados obtidos confirmam que em métodos analíticos para quantificação do ácido fumarprotocetrárico, sua maior absorbância ocorre em uma baixa faixa de comprimento de onda (203 a 210 nm).

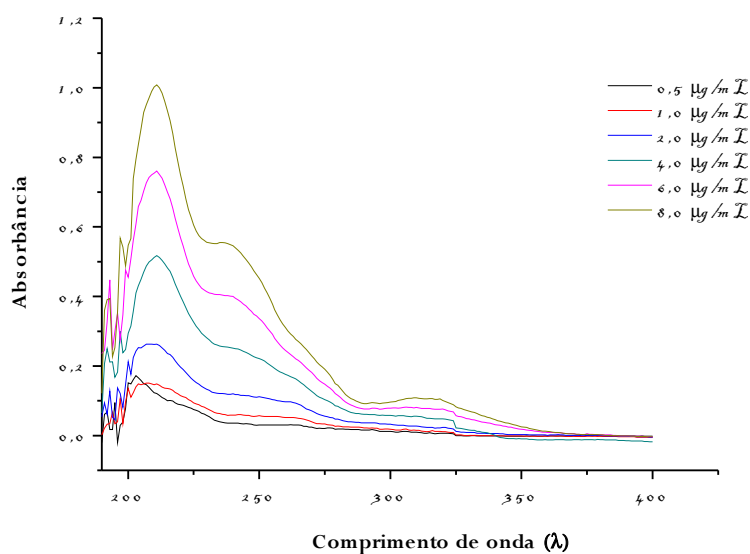


Figura 2.3 Espectro de varredura do ácido fumarprotocetrário em diferentes concentrações (0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 μg/mL) em metanol ($\gamma_{\text{máx}}$ 210 nm).

2.5.2 Validação do método analítico

2.5.2.1 Linearidade

Na análise da regressão linear observou-se um coeficiente de correlação de 0,9999, determinado nas diferentes concentrações obtidas a partir da solução padrão do ácido fumarprotocetrário, ou seja, 99,99% de que o método é exequível, comprovado pelo método dos mínimos quadrados. A equação obtida foi $y = 0,119x + 0,007$, em que y é a absorbância (nm) e x a concentração (μg/mL), equivalentes ao ácido fumarprotocetrário (Figura 2.4).

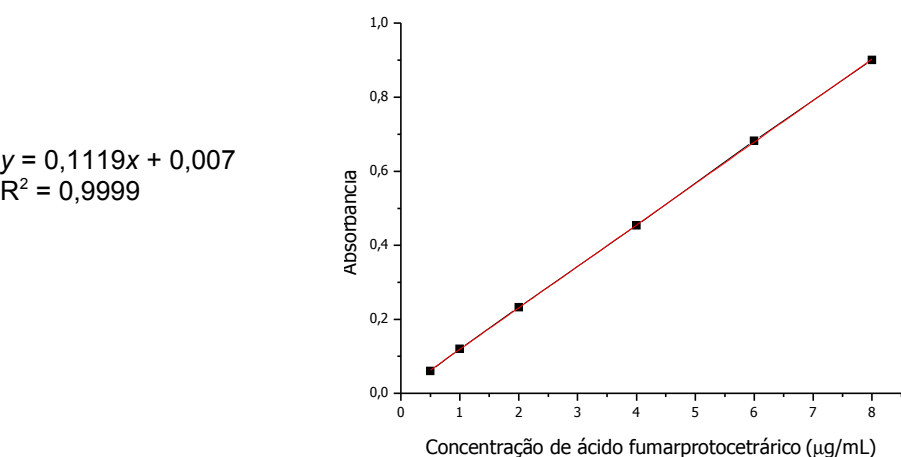


Figura 2.4 Curva padrão de ácido fumarprotocetrário (0,5 - 8 µg/mL) a 210 nm.

A linearidade foi comprovada nos dados referentes à curva analítica do ácido fumarprotocetrário. O método analítico desenvolvido possui faixa de linearidade entre as concentrações de ácido fumarprotocetrário de 0,5 a 8 µg/mL⁻¹ (Tabela 2.1.). O ICH preconiza que os valores do desvio padrão relativo (DPR) devem ser inferiores a 5%. O maior desvio padrão relativo foi de 4,72%, portanto, menor do que o valor máximo exigido.

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

CT (µg/ml)	ABS ± DP	CM ± DP	DPR (%)
0,5	0,060 ± 0,002	0,47 ± 0,014	2,98
1	0,120 ± 0,002	1,01 ± 0,009	2,20
2	0,233 ± 0,005	2,02 ± 0,041	2,03
4	0,453 ± 0,021	3,99 ± 0,009	4,72
6	0,682 ± 0,031	6,03 ± 0,023	4,54
8	0,900 ± 0,009	7,98 ± 0,076	0,95

CT = Concentração Teórica (µg.mL⁻¹); CM = Concentração Média (µg.mL⁻¹) de três determinações; ABS = Absorbância média de três determinações; DP = Desvio Padrão; DPR (%) = Desvio Padrão Relativo; E (%) = Exatidão.

2.5.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados pelas equações 2 e 3, foram 0,24 e 0,74 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente. De acordo com esses resultados, verifica-se que o método possui relevante sensibilidade para detectar e quantificar o ácido fumarprotocetrárico, sem sofrer interferências de fatores intrínsecos do equipamento.

2.5.2.3 Exatidão

A exatidão foi verificada nos três níveis de concentrações estudados: baixa, média e alta. Conforme os resultados apresentados (Tabela 2.2), a exatidão encontra-se dentro dos limites especificados. A recuperação do ácido fumarprotocetrárico a partir dos complexos de inclusão (AF-HP β CD) nas concentrações de 0,5, 2 e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram 90,97%, 99,29% e 98,43%, respectivamente. De acordo com o ICH, os resultados de exatidão não devem ser inferiores a 95% e o desvio padrão relativo não deve ultrapassar 5%. Dessa forma, estes dados encontram-se dentro dos padrões solicitados pelo ICH, o qual pode ser considerado suficientemente exato.

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

Concentração de ácido fumarprotocetrárico ($\mu\text{g/mL}$)				Dados estatísticos		
Teórica	Experimental			Média	DP	DPR (%)
0,5	0,45	0,46	0,47	0,45	0,009	1,96
2	1,97	1,99	2,00	1,98	0,019	0,93
8	7,88	7,88	7,86	7,87	0,010	0,13

DP = Desvio Padrão; DPR = Desvio Padrão Relativo.

2.5.2.3 Precisão

Os estudos de precisão intracorrida propõem a repetibilidade do método. Ao observar os resultados do desvio padrão relativo, obtidos na absorvância e concentração da amostra escolhida (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), observa-se que os mesmos apresentam valores menores que o valor máximo exigido de 5% (tabela 2.3).

Tabela 2.3 Estudo de precisão intracorrida (repetibilidade).

Parâmetros estatísticos	Absorvância	Concentração
-------------------------	-------------	--------------

	(210 nm)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$
	0,233	2,02
	0,224	1,94
	0,238	2,06
	0,223	1,93
	0,241	2,09
	0,222	1,92
MÉDIA	0,230	1,993
D.P	0,008	0,074
D.P.R	3,598	3,712

DP = Desvio Padrão; DPR = Desvio Padrão Relativo

A precisão intermediária não revelou variação significativa em nos estudos de precisão intermediária realizados em dias diferentes e com analistas diferentes (Tabela 2.3).

Tabela 2.4 Precisão intermediária do método espectrofotométrico para o doseamento do ácido fumarprotocetrárico.

Intra-dia						
Concentração	Analista 1		Analista 2		$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$
teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CM $\pm$ DP	DPR (%)	CM $\pm$ DP	DPR (%)		
0,5	0,46 $\pm$ 0,01	1,92	0,47 $\pm$ 0,01	2,71	0,37	
4	3,83 $\pm$ 0,10	2,69	4,19 $\pm$ 0,01	0,42	0,01	6,96
8	7,88 $\pm$ 0,02	0,28	8,03 $\pm$ 0,04	0,51	0,01	
Inter-dia						
Concentração	Dia 1		Dia 2		$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}^*$
teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CM $\pm$ DP	DPR (%)	CM $\pm$ DP	DPR (%)		
0,5	0,45 $\pm$ 0,01	2,63	0,47 $\pm$ 0,01	2,71	1,47	
4	3,92 $\pm$ 0,07	1,80	4,19 $\pm$ 0,01	0,42	5,37	6,96
8	8,00 $\pm$ 0,02	0,25	7,88 $\pm$ 0,02	0,28	0,01	

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

Neste ensaio observa-se que todos os desvios padrão relativo foram inferiores a 5%, indicando a precisão do método. Corroborando esses dados, é visto que o t calculado indica número inferior ao t crítico, demonstrando não existir diferença significativa entre as médias e comprovando que as hipóteses não assumem diferenças quando a significância tem um $p < 0,05$.

2.5.2.4 Robustez

As soluções preparadas e mantidas por 24 horas nas temperaturas de 25°C e 37°C não sofreram variações na absorbância do ácido fumarprotocetrário (Tabela 2.5). Vale salientar que não foram evidenciadas diferenças significativas nos desvios padrões relativos ($p < 0.05$), quando foram analisadas diferentes temperaturas e fontes fornecedoras de solventes. Ou seja, as variações dos parâmetros analisados não influenciam a quantificação do ácido fumarprotocetrário. O método foi confiável à 95%, definindo a robustez, quando utilizou-se solventes de diferentes marcas na preparação das amostras.

Tabela 2.5 Teste *t* de *Student* aplicado aos parâmetros analisados para robustez do método de dosagem do ácido fumarprotocetrário em espectroscopia UV.

Parâmetros	Ácido Fumarprotocetrário		t_{cal}^b
	(µg/mL)		
	Teórica	Experimental ± DP ^a	
25 °C	2	2,06 ± 0,10	2,20
37 °C	2	1,83 ± 1,14	
Solvente A	2	2,11 ± 0,01	1,39
Solvente B	2	2,06 ± 0,04	

^a Valores representam a média de 6 determinações. ^b t_{cal} é o valor calculado. O valor teórico de $t_{crit} = 2,91$ ($p < 0,05$).

2.5.2.5 Especificidade

No estudo da especificidade o pico de absorção do ácido fumarprotocetrário não apresentou interferentes em relação aos excipientes presentes no complexo de inclusão (AF-HPβCD)

2.5.3 Aplicação biotecnológica do método

A utilização de complexo de inclusão (AF-HPβCD) propõe que substâncias altamente hidrofóbicas melhorem sua hidrofiliabilidade e aumentem sua biodisponibilidade.

O doseamento do ácido fumarprotocetrário nos complexos de inclusão AF-HPβCD foi determinado através de espectrofotometria UV em comprimento de onda de 210 nm,

utilizando-se a equação da curva padrão: Absorbância = $0,1119 \times [\text{ácido fumarprotocetrárico}] (\mu\text{g.mL}^{-1}) + 0,0071$. Os complexos de inclusão entre o ácido fumarprotocetrárico e a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina apresentaram um rendimento médio de 97,86%, $\pm 0,07$. Estes resultados também encontram-se de acordo com os descritos na literatura quando validou e avaliou o complexo de inclusão com substância líquênica obtendo alto rendimento (Siqueira-Moura et al., 2008).

2.6 Conclusões

O método analítico espectrofotométrico proposto para doseamento do ácido fumarprotocetrárico em complexos de inclusão com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina demonstrou ser simples, rápido, acessível, preciso, exato e reprodutível. Os resultados apontaram perceptível sensibilidade na quantificação do ácido fumarprotocetrárico por espectrofotômetro UV em rotina de laboratórios no controle de qualidade.

Agradecimentos

Campos, agradece à CAPES pelo auxílio financeiro, concedido como bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado e a FACEPE e CNPq pelo financiamento do projeto.

2.7 Referências Bibliográficas

BATISTA, C.M; CARVALHO, C.M.B; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.2, 2007.

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

CAVALCANTI, I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; HONRATO, S.B.; CAMARA, C.A; AMORIM, R.V.S.; FILHO, J.M.; RABELLO, M.M.; HERNANDEZ, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 44. 332–340, 2011.

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.

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

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

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

EDWARDS, H.G.M.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, **Journal of Molecular Structure**, 651-653, 2003.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p.1432-1441, 2006

EID, E.E.M.; ABDUL, A.B.; SULIMAN, F.E.O.; SUKARI, M.A.; RASEEDE, A.; FATAH, S.S. Characterization of the inclusion complex of zerumbone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**. 83, 1707–1714, 2011.

FARAJI, A.H.; PETER WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg. Med. Chem.** v.17, p. 2950–2962, 2009.

GARCÍA-ZEBIRI, I.X.; GONZÁLEZ-GAITANO, G.; SÁNCHEZ, M.; ISAISI, J.R. FTIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin. **Vibrat. Spectrosc.**, 2003;33:205-213

HAUCK, M.; JÜRGENS, S.; LEUSCHNER, C. Norstictic acid: Correlations between its physico-chemical characteristics and ecological preferences of lichens producing this depsidone. **Environmental and Experimental Botany**. 68 .309–313.2010

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

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

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

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

MAGENHEIM, B. & BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharm. Scie.** v. 1: 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.

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.

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.

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-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.C.O.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carries for benzantine penicillin G: nanoencapsulation and nanocapsules. **Int J Pharm.**, 208: 71-80, 2000.

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

SIQUEIRA-MOURA, M.P.; LIRA, M.C.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica*. vol. 44, n. 4, 2008.

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

CAPÍTULO 3

Complexo de inclusão contendo ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e incorporação em lipossomas

Thiers Araújo Campos ^{1,2,5}, Camilla Vila Nova Soares Silva ^{2,5}, 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

Artigo a ser submetido ao Journal of Biological Macromolecules

3.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar complexos de inclusão ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina e nanoencapsular em lipossomas. Um estudo de solubilidade de fase foi realizado no intuito de se analisar quanto o AF é solúvel em presença da HPβCD. Os complexos de inclusão foram preparados por liofilização e caracterizados físico-quimicamente. Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico contendo o AF ou complexo de inclusão AF:HPβCD, sendo posteriormente submetidos a estudos de estabilidades e avaliado o perfil cinético de liberação *in vitro*. O diagrama de solubilidade de fases de AF:HPβCD apresentou uma curva do tipo A_L, com $K_{1:1} = 58 \text{ M}^{-1}$. Na presença de 300 mM de HPβCD, a solubilidade do AF aumentou 19 vezes. O complexo de inclusão AF:HPβCD apresentou modificações no IV,

RMN ^1H , difração de raios-X e MEV, sugerindo a formação do complexo de inclusão. Após preparação diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foram $85,8 \pm 4,5\text{nm}$ e $0,41 \pm 0,14$; $86,5 \pm 1,41\text{ nm}$ e $0,24 \pm 0,05$, respectivamente para lipo-AF e lipo-AF:HP β CD. As suspensões lipossomais contendo AF exibiram instabilidade após testes de centrifugação e agitação mecânica. No entanto as formulações lipo-AF:HP β CD mantiveram-se estáveis após 60 dias. O perfil cinético de liberação dos complexos de inclusão AF:HP β CD e de lipo-AF:HP β CD apresentou uma liberação controlada até 4hs e 12hs, respectivamente, seguida de uma liberação gradual constante, atingindo um máximo de fármaco liberado para AF:HP β CD de 50,10% e para lipo-AF:HP β CD de 44,14% dentro de 120 h. A complexação do ácido fumarprotocetrárico na hidroxipropil-β-ciclodextrina, e sua incorporação em lipossomas é, portanto uma tentativa para superar as limitações relacionadas à solubilidade, garantindo maior segurança e eficácia terapêutica.

Palavras-chave: ácido fumarprotocetrárico; complexos de inclusão; hidroxipropil-β-ciclodextrinas; lipossomas.

3.2 Abstract

The objective of this study was to develop and characterize inclusion complexes fumarprotocetraric acid :2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin and nanoencapsulate in liposomes. A solubility phase study was performed in the intention of analyze how much the FA is soluble em presence of HP β CD. Inclusion complexes were prepared by lyophilization and characterized physico-chemically. Liposomes were prepared by the technique of hydration of lipid film containing the FA or inclusion complex FA:HP β CD, being later submitted to studies of stabilities and kinetic profile in vitro release. The solubility diagram of stages of FA: HP β CD presented a curve of the A_L type, with $K_{1:1} = 58\text{ M}^{-1}$. In the presence of 300 mM HP β CD, the solubility of FA increased by 19 times. The inclusion complex FA: HP β CD presented some modifications in IR, NMR ^1H , X-ray diffraction

and SEM, suggesting the formation of inclusion complex. After manufacturing average diameter and polydispersity of the vesicles were 85.8 ± 4.5 nm and 0.41 ± 0.14 , 86.5 ± 1.41 nm and 0.24 ± 0.05 , respectively, for lipo-FA and lipo-FA: HPβCD. The suspensions liposomal containing FA exhibited signs of instability after tests of centrifugation and mechanical agitation. However the formulations lipo-FA: HPβCD remained stable after 60 days. The kinetic profile release of inclusion complexes FA: HPβCD and lipo-FA: HPβCD presented a controlled liberation until 4hs and 12hs, respectively, followed by a gradual release constant, reaching a maximum drug released for FA:HPβCD 50.10% of and lipo-FA:HPβCD of 44.14% within 120 hours. The complexation of fumarprotocetraric acid with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and its incorporation in liposomes is therefore an attempt to overcome the limitations related to solubility, ensuring greater safety and therapeutic efficacy.

Key-words: fumarprotocetraric acid; inclusion complex; hydroxypropyl-β-cyclodextrin; liposomes.

3.3 Introdução

O ácido fumarprotocetrárico (AF) é um metabólito secundário que pode ser isolado de *Cladonia verticillares*, que apresenta éster aromático contendo o grupo carboxílico em seu anel terminal (Hauck et al., 2010). A literatura relata diversas propriedades biológicas, destacando a atividade antinoceptiva frente ao modelo experimental de inflamação aguda e crônica (Maia et al., 2002) e atividade antibacteriana (Ingóflsdóttir, 2002). O uso terapêutico do AF é limitado por apresentar um baixo grau de ionização (pKa em metanol 2,8), solúvel em poucos solventes orgânicos e um ponto de fusão 205°C (Edwards et al., 2003; Hauck et al., 2010). Deste modo, a utilização do ácido fumarprotocetrárico em sua forma livre torna-se bastante restrito, sendo necessárias alternativas para contornar suas características físico-químicas indesejáveis e manter suas atividades biológicas.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicopirranose unidas por ligações α (1-4) (CHALLA et al., 2005). Esta conformação faz da ciclodextrinas um estrutura rígida em forma de um cone truncado com uma cavidade central que apresenta características lipofílicas e uma superfície externa hidrofílica. A presença da cavidade interna hidrofóbica faz com que a ciclodextrina tenha a capacidade de alojar uma molécula hóspede, formando complexos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (Del Valle, 2004; Loftsson e Duchêne, 2007).

A 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) é um derivado sintético da ciclodextrina natural β -ciclodextrina, bastante utilizada por apresentar alta solubilidade, baixa toxicidade e maior cavidade hidrofóbica em comparação com outras ciclodextrinas da mesma família, fazendo desta CD uma forte candidata para incorporação em formulações farmacêuticas (Loftsson e Duchêne, 2007). 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 destes compostos associados (Schwingel et al., 2008).

No intuito de se 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).

Dentre os vários tipos de sistemas de liberação controlada, os lipossomas vêm sendo bastante estudado, devido seu significativo impacto na medicina (Farij; Wifp, 2009). Essas nanosistemas são carreadoras de moléculas hidrofílica e lipofílica (como quimioterápicos, hemoglobinas e co-fatores, antígenos, imunomoduladores e material genético), sendo considerados veículos biodegradáveis, biocompatíveis, não imunogênicos, flexíveis, devido a sua composição, tamanho e fluidez da bicamada lipídica (Torchilin, 2005; Edwards; Baeumner; 2006; Batista et al, 2007).

Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a possibilidade de formação de complexo de inclusão entre o AF e a HP β CD, caracterizar físico-quimicamente os complexos e incorporá-los em lipossomas, avaliando o perfil de liberação *in vitro*.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Reagentes e amostras

O ácido fumarprotocetrárico (AF) foi fornecido pela Dra. Nely Kika Honda, do Laboratório de Química de Produtos Naturais/UFMS. O colesterol (CHO), esterealamina (SA) e a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A fosfatidilcolina de soja foi obtida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O metanol, clorofórmio e a acetonitrila foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas com água purificada. As análises para a determinação do ácido fumarprotocetrárico 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 fumarprotocetrárico em HPβCD

De acordo com a metodologia descrita por Higuchi e Connors (1965), foi realizado o ensaio de solubilidade de fases do ácido fumarprotocetrárico em soluções aquosas de HPβCD. Uma quantidade em excesso de ácido fumarprotocetrárico (3 mg) foi condicionada a microtubo contendo 1 mL de água deionizada ou soluções aquosas de HPβCD em diferentes concentrações (0 a 300 mM), sendo submetidos a uma agitação vigorosa na temperatura de 25°C. Após 72 horas de agitação, uma alíquota da mistura foi retirada, centrifugada (15.000 rpm/15min), e o sobrenadante analisado para quantificação do ácido fumarprotocetrárico através de espectrofotometria UV a 210 nm. Definindo a formação de um complexo de inclusão, na razão estequiométrica 1:1, a constante de solubilidade ($K_{1:1}$) foi calculada pela relação linear entre a concentração molar do ácido fumarprotocetrárico na solução pela concentração molar da HPβCD, de acordo com a equação 1, onde S_0 é a solubilidade do ácido fumarprotocetrárico na ausência da HPβCD. Outro parâmetro estudado a partir dos dados da curva linear do estudo de solubilidade de fases é a eficiência de complexação (equação 2) (Loftsson et al., 2005).

$$K_{1:1} = \text{slope} / [S_0(1 - \text{slope})] \text{ (Equação 1)}$$

$$CE = \text{slope} / 1 - \text{slope} \text{ (Equação 2)}$$

3.4.3 Preparação de complexo de inclusão ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (AF:HPβCD)

Os complexos de inclusão AF:HPβCD foram obtidos pelo método de liofilização, técnica de *freeze-drying* (Lira et al., 2009). Inicialmente a HPβCD (57,96 mg) foi solubilizada

em água e em seguida o AF (20 mg) foi adicionado, sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após atingir as condições de equilíbrio (72 h), a solução aquosa de AF:HPβCD foi imediatamente congelada a - 80 °C para o processo de liofilização. Os complexos liofilizados foram armazenados em um dessecador à temperatura ambiente.

3.4.4 Caracterização dos complexos de inclusão AF:HPβCD

A caracterização físico-química tem como objetivo relacionar o efeito da ciclodextrina (agente solubilizante) na solubilidade de um composto teste, assim avaliando a interação entre as moléculas. Os complexos de inclusão AF:HPβCD foram caracterizados através das técnicas de infravermelho, difração de raios-X, ressonância magnética nuclear de prótons e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Lira et al., 2007; Cavalcanti et al., 2011).

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos através do método do disco de KBr (brometo de potássio), onde os pellets foram preparados pela prensa de cada amostra (ácido fumarprotocetrárico, HPβCD, complexo de inclusão e mistura física) em um disco de KBr. A análise foi realizada em um espectrômetro IV-TF Bruker IFS66 (Bruker Optics, Alemanha), na faixa de 4000-400 cm⁻¹. Os padrões de difração de raios-X foram realizados em um aparelho Geiger-Flex 2073 (Rigaku, Japão), utilizando-se tubo de cobre com radiação CuKα (λ = 1.50405 nm). A ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ¹H) foi adquirida através do espectrômetro Unity Plus 300 MHz (Varian, EUA), com as amostras diluídas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆).

O estudo da morfologia do ácido fumarprotocetrárico, HPβCD, complexo de inclusão e mistura física, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio Quanta 200F (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA). As amostras foram fixadas em um stub de alumínio usando fita de dupla face, submetidas ao vácuo e analisadas nas seguintes condições: tensão de aceleração 20 kV, sob pressão 450 P.a. e uma ampliação de 2000. Complementando a caracterização, as amostras foram submetidas aos ensaios de calorimetria por DSC-60 Shimadzu (Differential Scanning Calorimeter).

A quantificação do ácido fumarprotocetrárico nos complexos de inclusão foi através da dissolução de quantidades equimolares do AF e da HPβCD, em acetonitrila e metanol (1:4) no balão de 25 mL. Depois de 20 minutos de sonicação, uma alíquota referente a 2 µg/mL, foi retirada e adicionada em outro balão (10 mL) completando com metanol. As análises foram realizadas por espectrofotometria UV a 210 nm. Uma curva padrão de ácido fumarprotocetrárico foi preparada em metanol, nas concentrações de 0,5 a 8 µg.mL⁻¹,

obtendo a equação: absorbância = $0,1119 \times [AF] (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) + 0,007$, $r = 0,9999$. Conforme o método validado previamente.

3.4.5 Preparação de lipossomas contendo ácido fumarprotocetrárico ou complexo de inclusão AF:HPβCD

Os lipossomas foram preparados utilizando-se a técnica de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação (Cavalcanti et al., 2011). A fosfatidilcolina de soja (PC), o colesterol (CH) e a esterealamina (SA) (7:2:1) foram pesados e solubilizados em 30 mL da mistura de solventes orgânicos clorofórmio/metanol (3:1), sob placa agitadora magnética (fase orgânica). Uma solução do ácido fumarprotocetrárico (5mg) em metanol e acetonitrila (4:1) foi preparada em um balão de 10 mL a fim de adicionar a mistura. A mistura foi transportada para um balão volumétrico e submetida à evaporação a vácuo para completa eliminação total do solvente orgânico. Após a formação do filme lipídico seco foi realizada a hidratação com 10 mL de tampão fosfato em pH 7,4, para obtenção de lipossomas multilamelares (MLV). Para adquirir lipossomas unilamelares (SUV) as suspensões de MLV foram sonicadas (Vibra cell, BRANSON, USA) a 200W e 40Hz por 300s. A formulação contendo o complexo de inclusão foi preparada de maneira semelhante substituindo a adição da solução do ácido fumarprotocetrárico na fase orgânica pelo complexo AF:HPβCD dissolvido na fase aquosa.

A quantidade de AF encapsulada foi determinada através da técnica de ultrafiltração-centrifugação. As amostras de lipossomas foram filtradas, utilizando unidades ultrafree® (Millipore, USA), sob centrifugação a 10.000 rpm por 1 hora à 4°C. Em seguida foi retirada uma alíquota do filtrado em relação a concentração média da curva ($4\mu\text{g/mL}$) e quantificado por espectrofotometria UV no $\lambda = 210 \text{ nm}$. O percentual de AF encapsulado foi obtido pela diferença entre a quantidade total teórica e aquele no filtrado obtido após centrifugação (Santos et al., 2005).

3.4.6 Caracterização dos lipossomas contendo AF ou AF:HPβCD

Os lipossomas foram avaliados através de estudos de estabilidade acelerada e a longo-prazo (Santos et al., 2000).

3.4.6.1 Teste de estabilidade acelerada

O teste de estabilidade acelerada tem como objetivo submeter às preparações obtidas a condições de estresse para simular processos como transporte e armazenamento (Santos-Magalhães et al., 2000). As formulações preparadas foram analisadas quanto a:

- a) **Resistência à centrifugação:** (6.000 rpm/ 1 h a $4 \pm 1^\circ\text{C}$) para simular a passagem acelerada do tempo;
- b) **Resistência às vibrações mecânicas:** as amostras são colocadas em microtubos de ensaio em seguida imersas em banho-maria, com temperatura controlada de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação horizontal (180 vibrações/ min por 48 h) para simular condições de transporte.

3.4.6.2 Teste de estabilidade a longo prazo

A finalidade desse estudo é estabelecer a durabilidade dos lipossomas (Santos-Magalhães et al., 2000). Nestes testes foram avaliados as condições das formulações logo após a fabricação e a intervalos de tempos regulares (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Este ensaio foi averiguado quanto a:

a) **Aspectos macroscópicos:** foi observado o surgimento de alterações no aspecto geral das preparações (homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases).

b) **Aspectos microscópicos:** foi investigado se ocorreu o surgimento de alterações no aspecto microscópico dos lipossomas como mudanças bruscas em sua estrutura ou agregações lipídicas.

d) **Variações de pH:** As formulações foram analisadas por um potenciômetro digital contendo eletrodo de vidro e um sensor de temperatura, os testes foram realizados a 25°C .

e) **Tamanho de partícula e índice de polidispersão:** Foram determinados pela técnica de difração a laser através de um analisador de partículas (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, Reino Unido).

3.4.7 Cinética de liberação *in vitro*

O perfil da cinética de liberação *in vitro* do AF no lipossoma contendo AF: HPβCD (Lipo- AF:HPβCD) foi avaliado usando a técnica de diálise (Lira et al., 2009) em comparação ao complexo de inclusão (AF: HPβCD). Uma alíquota (1mL) da formulação (Lipo- AF:HPβCD) ou da solução do complexo de inclusão (AF: HPβCD), diluídos em água

ultrapura foi inserido em uma membrana de diálise (MW, Cut-off 12.400). Posteriormente, a membrana de diálise foi selado e inserida ao meio doador (500mL) com um peso em uma de suas extremidades, contendo tampão fosfato (pH 7,4). O material (sistema), em triplicata, foi incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação magnética controlada. Em tempos pré-determinados, alíquotas de 1 mL do meio doador foram retiradas e congeladas com reposição do mesmo volume de meio por solução tampão de fosfato (pH 7,4).

A quantificação do AF presente no meio de dissolução foi através da espectrofotometria UV. Uma curva padrão do AF (0,5 a 8 µg/mL) foi realizada com objetivo de determinar as concentrações das amostras analisadas. A partir desses dados da cinética houve o ajuste ao modelo exponencial utilizando a seguinte equação:

$$M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t}) \text{ (Equação 3)}$$

Onde M_t e M_∞ são a quantidade absoluta do AF liberado em um determinado tempo (t) e em um tempo infinito (t_∞) do processo cinético respectivamente; k_1 é a constante adaptação e k_2 é constante de velocidade.

3.4.8 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 fumarprotocetrárico em HPβCD

O diagrama de solubilidade de fases do ácido fumarprotocetrárico (AF) em diferentes diluições da solução aquosa de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) definiu um perfil do tipo AL (Figura 3.1). Segundo o estudo realizado por Higuchi e Cornnrs (1965), o tipo de curva obtida no diagrama de solubilidade de fases determina a estequiometria para formação do complexo de inclusão. Portanto, indicando neste estudo a relação molar de 1:1

(AF:HPβCD). Os dados obtidos da solução de AF com HPβCD (<300 mM) resultaram em uma equação calculada pela regressão linear: $[AF] = 0,0014 [HP\beta CD] + 0,0333$ ($r^2 = 0,9991$).

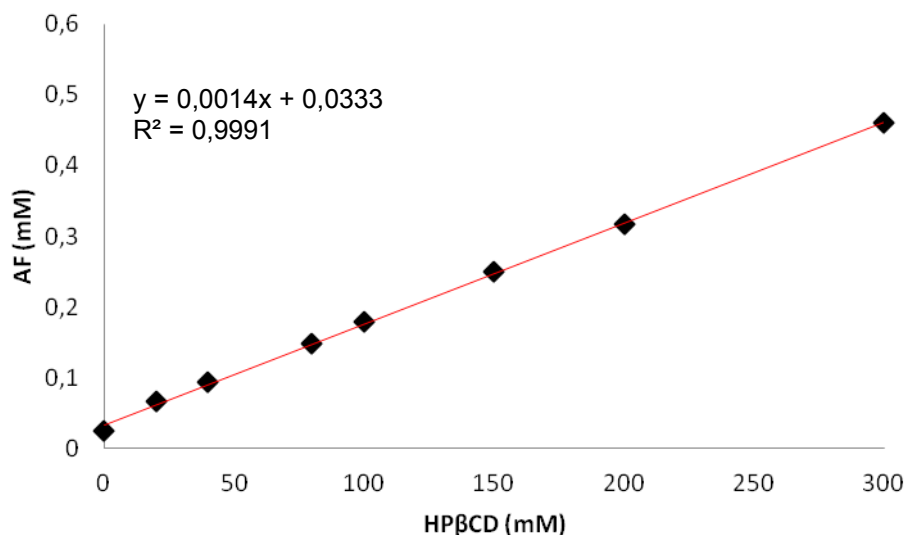


Figura 3.1 Diagrama de solubilidade de fases do ácido fumarprotocetrárico (AF) e HPβCD a 25°C.

A partir dessa equação foi possível calcular a concentração do AF na solução de HPβCD. A solubilidade do AF em água foi encontrada de 0,024 mM, ocasionando um aumento de 19 vezes ao adicionar a solução de HPβCD (300mM). Este aumento de solubilidade pode ser comprovado na literatura quando utilizaram as ciclodextrinas como agente solubilizante para metabólitos secundários liquênicos como ácido difractáico, atranorina, ácido fumarprotocetrárico utilizando a HPβCD (Kristmundsdóttir et al. 2005; Silva et al., 2011) e ácido úsnico tratando a solubilidade com ciclodextrina natural (βCD) (Lira et al., 2009). O aumento da solubilidade do AF em presença a HPβCD pode ser interpretado como uma suposta interação molecular acarretando na formação de uma espécie química distinta. (Higuchi e Connors, 1965).

A relação linear do AF na solução de HPβCD através do slope (0,0014) revelou uma constante de associação ($K_{1:1} = 58 \text{ M}^{-1}$) dentro dos padrões conforme os estudos de solubilidade realizado por Loftsson e colaboradores (2005). Nos recentes artigos publicados as pesquisas que envolveram a HPβCD no aumento de substância pouco solúvel em água relataram desde a mais baixa constante de associação ($K_{1:1} = 12 \text{ M}^{-1}$) para acetato de celulose (Panichpakdee; Supaphol, 2011) até a mais alta constante de associação com o efavirenz, um agente antiretroviral, que obteve valor de $K_{1:1}$ de 1.073 M^{-1} (Shatigari et al., 2009).

Ainda considerando o valor do slope determinado pela equação da reta no estudo de solubilidade de fases, foi calculada a eficiência de complexação (EC) do AF frente a HPβCD. Obtendo uma eficiência de complexação de 0,001, pode-se calcular a razão molar fármaco:ciclodextrina pela fórmula da razão molar = $1: (EC+1)/EC$. Com isso, pode-se supor que cada molécula de AF há interação com 713 moléculas de HPβCD (Brewster e Loftsson, 2007).

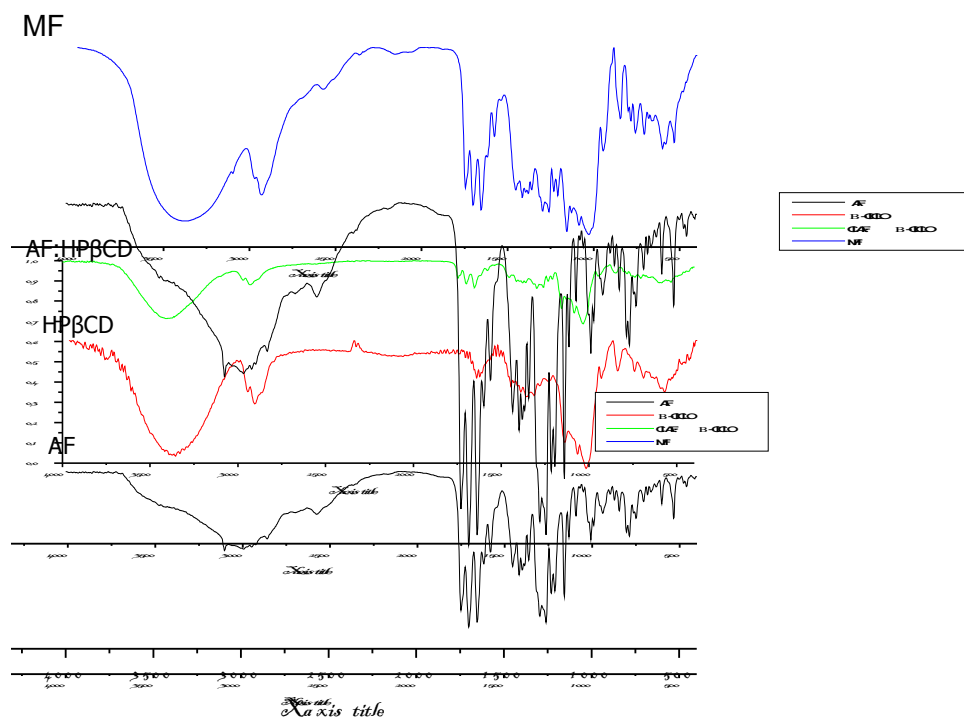
3.5.2 Caracterização dos complexos de inclusão AF:HPβCD

Os complexos de inclusão obtidos pela técnica *freeze-drying* demonstraram um rendimento aproximado de $97,94 \pm 0,08\%$. Considerando esse percentual bom para a análise físico-química, o AF apresentou um teor no AF:HPβCD de $90,60 \pm 2,20\%$. Diante dessa informação os complexos foram submetidos à caracterização para análise das interações entre o AF e HPβCD no fenômeno de complexação.

3.5.2.1 Infravermelho

O espectrograma de infravermelho do ácido fumarprotocetrárico, da HPβCD, do complexo de inclusão AF:HPβCD e da mistura física estão apresentados na Figura 3.2.

No comprimento de onda analisado ($4000-500\text{ cm}^{-1}$) apresentaram vários espectros de infravermelho para o ácido fumarprotocetrárico, destacando picos que sofreram encurtamento de suas bandas na presença da HPβCD estão compreendidos entre 1230 a 1259 cm^{-1} , 1400 a 1415 cm^{-1} e 1653 a 1745 cm^{-1} . Essas bandas são comuns entre as substâncias liquênicas devido a similaridade entre as moléculas nos agrupamentos funcionais (Edwards et al., 2003). Segundo Lira e colaboradores (2009) os diversos estiramentos que representam C=O no estudo dos espectros do ácido úsnico está entre 1716 a 1776 cm^{-1} , sendo encontrado também no AF. A análise do espectro do ácido difractáico evidenciou que o grupo da carboxila e grupo éster do composto está no comprimento de onda aproximado de 1760 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} respectivamente (Silva et al., 2011). Ocorrendo o mesmo para o composto em estudo (AF).



Comprimento de onda cm^{-1}

Figura 3.2 Espectros de infravermelho para a mistura física (MF), complexo de inclusão (AF:HPβCD), 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) e o ácido fumarprotocetrário (AF).

As bandas que assumem o grupo da hidroxila são evidentes nos complexo de inclusão, nos picos entre 3700 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} . (Lira et al., 2009), como característica específica da HPβCD, pelo número de OH na molécula. Além da diminuição da intensidade das bandas típicas do AF, o desaparecimento da banda em torno de 3094 cm^{-1} , sugere que houve interação com HPβCD, quando comparado aos espectros de mistura física e HPβCD. Considerando a formação de complexo de inclusão (Nalawade et al., 2010).

Outras interações moleculares podem ter ocorrido entre AF e HPβCD, promovendo a inclusão do princípio ativo na cavidade interna da HPβCD. Contudo, algumas bandas apresentadas no infravermelho da molécula hóspede podem ser mal interpretadas, devido 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 (AF e HP β CD) e no complexo de inclusão AF:HP β CD (Tabelas 1 e 2). Para o ácido fumarprotocetrárico, foram observados singletos em 10.58, 6.844, 6.642 e 5.306 ppm, bem como singletos em 2.506 e 2.495 ppm, nos grupamentos metila. Um deslocamento significativo nos grupamentos CH e H ($\Delta\delta = 0.097$ e 0.178 ppm) do ácido fumarprotocetrárico foi observado para o complexo de inclusão AF:HP β CD (Tabela 1).

Na presença do AF, os prótons H1 e H5 da HP β CD sofreram deslocamento ($\Delta\delta = 0.175$ e 0.066 ppm, respectivamente) (Tabela 2). Devido a esses prótons serem localizados na cavidade hidrofóbica da HP β CD, estas mudanças sugerem que o ácido fumarprotocetrárico formou um complexo 1:1 através de sua inclusão dentro da cavidade da ciclodextrina (Nasongkla et al., 2003), pois, uma vez que os prótons H1 e H5 são os que encontram-se mais livres e com menos interações, eles estão mais predispostos a reagir com o composto. Os deslocamentos dos grupamentos CH ($\Delta\delta = 0.097$ e 0.055 ppm) do ácido fumarprotocetrárico, pode-se sugerir uma interação com a HP β CD ocorrendo através dos grupamentos metil por meio de ligações de hidrogênio (Dotsikas; Loukas, 2002).

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

AF	δ AF (ppm)	δ AF:HP β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
CH	10.580 (s)	10.483	0.097
CH	6.844 (s)	6.789	0.055
H	6.642 (s)	6.464	0.178
CH ₂	5.306 (s)	5.314	0.008
CH ₃	2.506 (s)	2.506	0.000
CH ₃	2.495 (s)	2.495	0.000

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

HP β CD	δ HP β CD (ppm)	δ AF:HP β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	3.882	4.057	0.175
H2	3.635	3.603	0.032
H3	3.456	3.456	0
H4	3.242	3.242	0
H5	3.635	3.569	0.066
H6	3.334	3.344	0.001

3.5.2.3 Difração de raios-X

A difratometria de raio-x em pó foi determinada para analisar a formação do complexo de inclusão, elucidados no difractograma descritos na Figura 3.3.

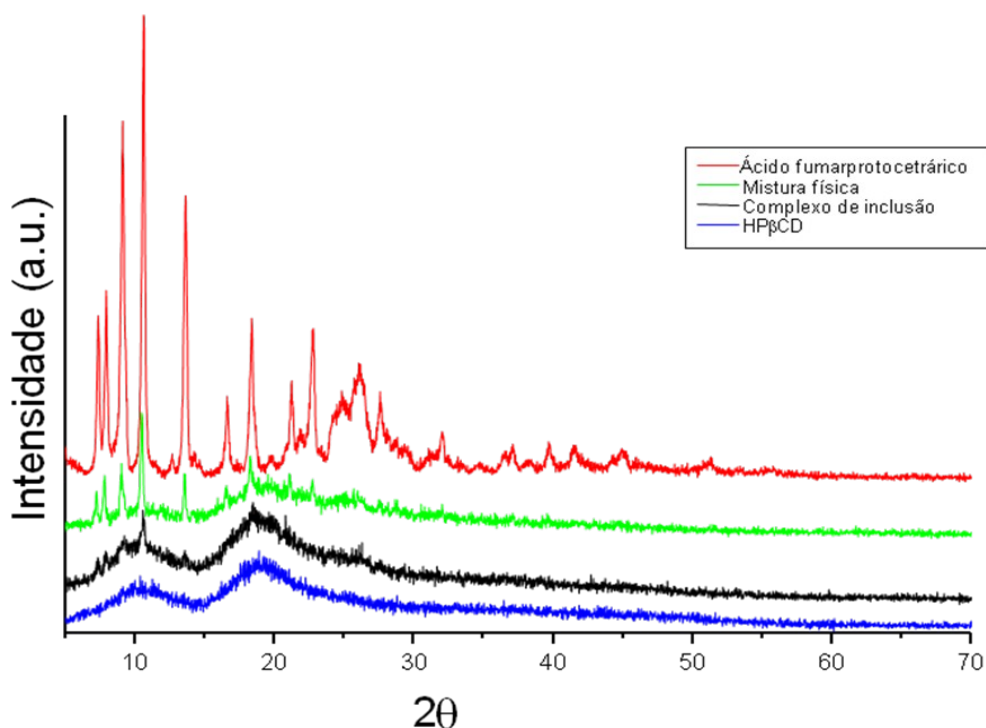


Figura 3.3 Padrões de difração de raios-X para o complexo de inclusão (AF:HPβCD), 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD), mistura física (MF) e o ácido fumarprotocetrário (AF).

A natureza cristalina do ácido fumarprotocetrário é evidenciada através de picos afiados no estudo de difração de raios-X em pó. Esses picos também são revelados na mistura física, porém com menos intensidade. Em contraste, a HPβCD possui ausência de picos de difração, caracterizando seu amorfismo no ângulo 2θ de espalhamento.

Analisando o padrão de difração de raios-X do complexo de inclusão (AF:HPβCD), os picos se apresentaram mais largos, não sendo possível observar os picos específicos do

AF. A falta de cristalinidade é um ponto adicional para supor a formação do complexo de inclusão (Eid et al., 2011).

É importante observar que na mistura física não há formação de complexo de inclusão, pois os picos são próprios dos compostos analisados em combinação.

Este comportamento amorfo do complexo de inclusão pode indicar a interação do AF com HPβCD levando a formação de uma nova fase sólida relatado também na literatura com outras substâncias liquênicas hidrofóbicas como é o caso da antronorina (Melo et al., 2008), ácido úsnico (Lira et al., 2009) e ácido difractáico (Silva et al., 2011).

3.5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O produto liofilizado a partir da preparação de uma mistura equimolar, do AF com HPβCD obteve um pó branco. Esse pó foi analisado por fotos micrográficas realizadas a partir do microscópio eletrônico de varredura (MEV), comparado com morfologia microscópica do AF, da HPβCD e da mistura física preparadas das substâncias puras (Figura 3.4).

O aspecto de pequenas de agulhas do AF visualizadas na microscopia (Figura 3.4-A) confirma o que Edwards e demais pesquisadores (2003) declararam. A HPβCD com peso três vezes maior que o AF, indica através da fotomicrografia uma aparência esférica (Mendonça et al., 2012)(Figura 3.4-B). Por outro lado, a imagem relacionada ao complexo de inclusão (Figura 3.4-C) caracterizou uma alteração na morfologia do AF, revelando uma estrutura sem forma definida, quando comparado a amostra da mistura física (Figura 3.4-D).

Os resultados apresentados nestas imagens, juntamente com os dados do infravermelho, do RMN e da difração de raio-X, sugerem a formação de complexo de inclusão do AF com HPβCD.

A microscopia é uma ferramenta que pode ser usada para mostrar a interação das moléculas, uma vez que, as mudanças ocorridas na estrutura do composto complexado a ciclodextrina pode ser um dado a mais no entendimento do fenômeno de complexação (Cavalcanti et al., 2011).

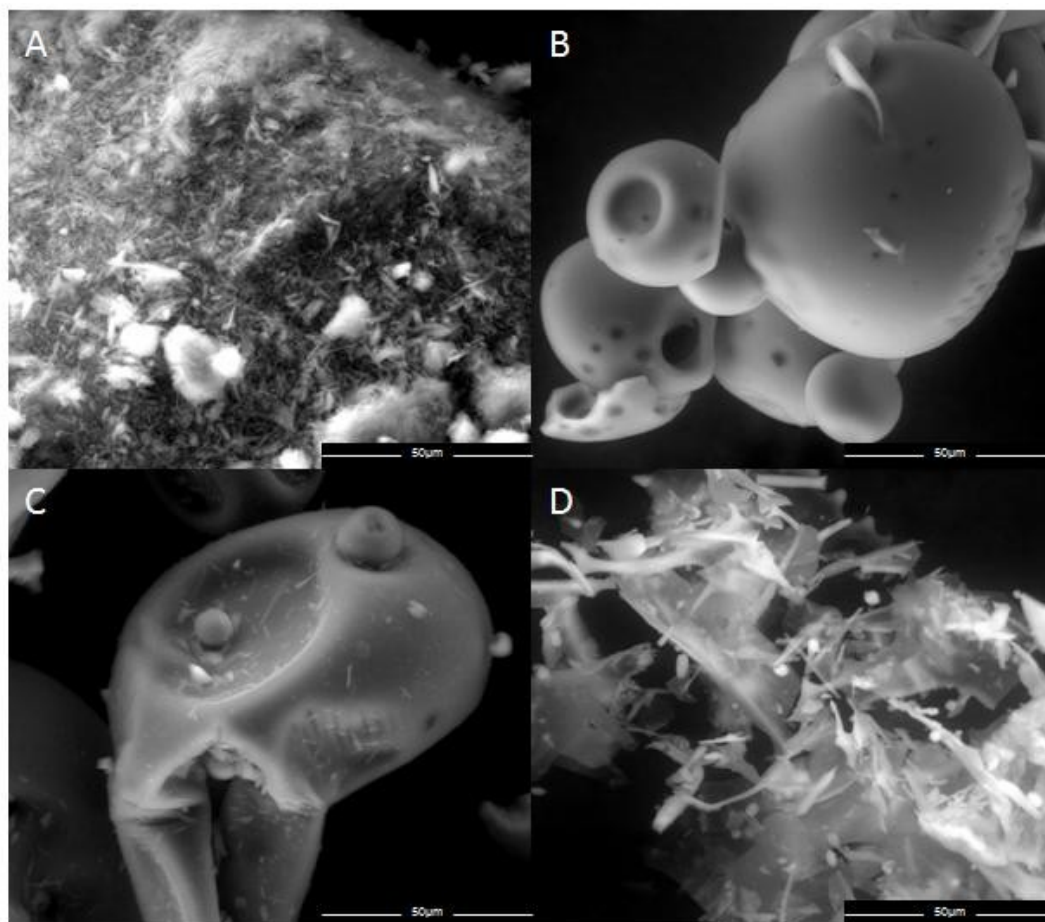


Figura 3.4 Microscopia eletrônica de varredura do ácido fumarprotocetrário (A), 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (B), complexo de inclusão (C) e mistura física (D).

3.5.2.4 Varredura diferencial calorimétrica (DSC)

O termograma das amostras apresenta uma análise de 0 à 450°C (Figura 3.5). Neste ensaio é verificado conforme a literatura que o ácido fumarprotocetrário apresenta ponto de fusão de aproximadamente 250°C (Asahina, Y.; Shibata, S., 1954) quando observado na figura o pico. A HPβCD apresentou um pico endotérmico em torno de 350°C seguido de um pico exotérmico devido ao fenômeno de decomposição (Chao et al., 2012). A mistura física evidencia os mesmo picos (endo e exo) da HPβCD.

Por outro lado, o complexo de inclusão caracteriza-se com uma curva larga entre 280 e 360°C, não evidenciando picos endotérmicos similares do AF e HPβCD. Isto pode sugerir a interação decorrente do fenômeno de complexação.

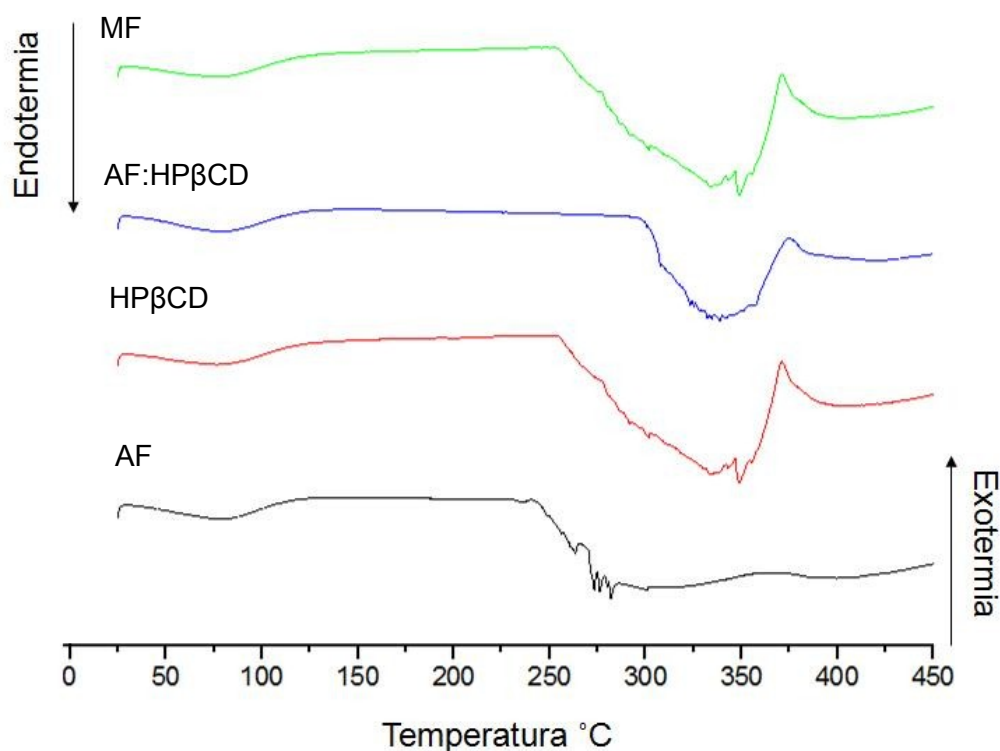


Figura 3.5 Varredura diferencial calorimétrica (DSC) do ácido fumarprotocetrário (AF), 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD), complexo de inclusão (AF:HPβCD) e mistura física (MF).

3.5.3 Caracterização dos lipossomas contendo AF ou AF:HPβCD

Para obtenção de pequenas vesículas unilamelares (SUV) foram utilizados lipídios (42 mM) com 5mg do AF livre ou nos complexos de inclusão. Os lipossomas após preparação, apresentaram aspecto leitoso, homogêneos, amarelado, com efeito *tyndall* evidente (características de vesículas unilamelar pequenas (SUV)). O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foram $85,8 \pm 4,50\text{nm}$ e $0,41 \pm 0,14$; $86,5 \pm 1,41\text{ nm}$ e $0,24 \pm 0,05$, para os Lipo-AF e Lipo-AF:HPβCD, respectivamente.

Foi realizado o estudo de estabilidade para analisar o comportamento do AF nas formulações lipossomais. Os parâmetros do estudo de estabilidade acelerada (Tabela 3.3) determinaram se as formulações mantiveram-se estáveis durante o processo de centrifugação e estresse mecânico.

Presença de efeito *tyndall*, o tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) conforme a literatura preconiza (Batista et al., 2007) é observado no Lipo-AF:HPβCD que permaneceu estável durante a centrifugação e estresse mecânico. Sofrendo decréscimo apenas nas leituras do pH, quando simulou as condições de estresse e armazenamento. Possivelmente, cristais do AF foi liberado do complexo de inclusão após a libertação do lipossoma acarretando o aumento da acidez do meio. Esse processo pode ser comparado aos lipossomas com AF livre que apresentaram um pH ainda menor.

Outro dado que corrobora com a instabilidade dos lipo-AF é a coloração avermelhada das suspensões. Supõe-se que os cristais do ácido fumarprotocetrárico interferem na estabilidade das membranas lipídicas dos lipossomas, pelo motivo de apresentar uma cor avermelhada na degradação do AF em solução tampão (Kristmundsdóttir et al., 2005). Fato atribuído também na instabilidade das formulações com β-lapachona, na detecção de cristais avaliados pela macroaprência das formulações (Cavalcanti et al., 2011).

Tabela 3.3 Estudo de estabilidade acelerada dos lipossomas em suspensão contendo AF (LIPO-AF) ou complexo de inclusão (LIPO-AF:HPβCD).

PARÂMETROS	LIPO-AF	LIPO-AF:HPβCD
Características iniciais	Ø: 85.8 ± 4.50 nm	Ø: 86.5 ± 1.41 nm
	PDI: 0.41 ± 0.14	PDI: 0.246 ± 0.05
	pH: 7.42 ± 0.07	pH: 7.49 ± 0.12
	Análise micro e macroscópica: estável	Análise micro e macroscópica: estável
Estresse mecânico (180 vibrações/min, por 48h a 37°C)	Ø: 165.2 ± 3.71 nm	Ø: 124 ± 2.66 nm
	PDI: 0.27 ± 0.04	PDI: 0.41 ± 0.11
	pH: 7.41 ± 0.45	pH: 7.47 ± 0.11
	Análise micro e macroscópica: instável	Análise micro e macroscópica: estável
Centrifugação (6000 rpm, por 1h a 4°C)	Ø: 176.2 ± 3.72 nm	Ø: 145.53 ± 3.86 nm
	PDI: 0.342 ± 0.157	PDI: 0.45 ± 0.152
	pH: 7.32 ± 0.38	pH: 7.39 ± 0.27
	Análise micro e macroscópica: instável	Análise micro e macroscópica: estável

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; Análise micro e macroscópica: homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases.

O reflexo azulado, determinante para ser considerado um colóide, foi visualizado durante os 60 dias de análise nos lipossomas contendo complexo de inclusão. A validade dos sistemas lipossomais foi averiguado pelo ensaio de estabilidade à longo prazo (Tabela 3.5).

Os parâmetros do estudo da estabilidade a longo prazo quanto ao aspecto visual da formulação que possui o AF livre, ficou evidente além aumento da intensidade da cor vermelha, durante os 60 dias como também a formação de grumos.

De acordo com a tabela 3.5, a média do tamanho de partícula e a média do índice de polidispersão, nos dois tipos de lipossomas estudados, não apresentaram diferenças significativas. Portanto, o tamanho de partícula do lipo-AF aos 15 e 30 dias apresentaram um desvio padrão acima de 1, quando comparado ao lipo-AF:HPβCD no mesmo período.

Estes dados estão de comum acordo ao trabalho científico realizado com ácido úsnico no complexo de inclusão (ácido úsnico: ciclodextrina) encapsulados em lipossomas (Lira et al., 2009).

Tabela 3.4 Ensaio de estabilidade a longo prazo das suspensões de lipossomas contendo AF livre ou AF:HPβCD.

PARÂMETROS		LIPO-AF			LIPO-AF:HPβCD		
Tempo (dias)	pH	Ø (nm)	PDI		pH	Ø (nm)	PDI
0	7.42 ± 0.07	85.8 ± 4.50	0.41 ± 0.14		7.49 ± 0.12	86.5 ± 0.41	0.246 ± 0.05
15	7.39 ± 1.51	142.3 ± 1.01	0.283 ± 0.12		7.49 ± 0.45	110.6 ± 0.12	0.272 ± 0.01
30	7.34 ± 2.86	145.1 ± 2.28	0.307 ± 0.02		7.48 ± 0.89	144.8 ± 0.01	0.297 ± 0.02
60	6.95 ± 2.11	205.1 ± 0.01	0.342 ± 0.04		7.39 ± 1.10	149.8 ± 0.23	0.328 ± 0.12

Ø: Tamanho de partícula

PDI: Índice de polidispersão

A taxa de encapsulação para lipossomas obtidos lipo-AF e lipo-AF:HPβCD foram e 95,00 ± 3,80% e 97,24 ± 0,36% respectivamente.

Sabendo que 11 mg consiste na dose efetiva do ácido fumarprotocetrárico para atividade antiproliferativa (Santos et al., 1997), foram preparados lipossomas contendo 10 mg nos complexos de inclusão, no intuito de se planejar ensaios biológicos destas formulações. Estas formulações apresentaram-se estáveis no testes de estabilidade acelerada e sua taxa de encapsulação ficou em torno de $92,33 \pm 0,12\%$. Estudos de estabilidade a longo termo e caracterização físico-química estão sendo desenvolvidos e consequentemente estudos *in vivo* de reparo tecidual em ratos Wistar.

3.5.4 Cinética de liberação *in vitro*

A análise do perfil de liberação *in vitro* do AF a partir do lipossoma contendo complexo de inclusão (AF:HPβCD) e do AF no complexo de inclusão AF:HPβCD, no período de 120 hs em tampão de fosfato (pH 7,4) a 37 °C, os resultados revelaram que os perfis cinéticos são diferentes (Figura 3.6). Os símbolos do gráfico representam os dados relativos ao percentual da concentração de AF liberado no meio doador e as curvas representam o ajuste do modelo matemático de Fick ($M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$).

O efeito *burst* do complexo de inclusão atestou uma velocidade de 57,29 µg/hora, representando uma liberação total do AF de $14,31 \pm 0,69\%$ nos primeiros 45 minutos. Ao contrário, os lipossomas contendo o complexo de inclusão (AF:HPβCD) apresentaram o efeito *burst* na primeira hora de análise, com uma maior liberação de AF ($19,01 \pm 1,44\%$) e uma maior velocidade (86,97 µg/hora). Portanto, correlacionando os 45 minutos iniciais de liberação do AF no Lipo-AF:HPβCD pela liberação do AF no complexo de inclusão, identifica-se um menor percentual de liberação em lipossomas ($12,85 \pm 0,86\%$). Atribuem-se esses dados, devido o complexo de inclusão ter a fácil liberação do AF pela HPβCD e sua rápida passagem na membrana de diálise em relação a liberação no lipossoma. Permitindo com isso ao lipossoma uma liberação do fármaco em maior tempo.

O perfil da cinética de liberação controlada dos lipossomas contendo complexo de inclusão (AF:HPβCD) caracterizou em 12 horas de liberação (44,14% de AF liberado) em relação aos dados do estudo de lipossoma contendo ácido úsnico (AU) complexado a βCD (Lira et al., 2007), que obteve uma menor liberação (32,5 %) em um maior tempo (24 horas). Isso pode ser explicado pelo fato que βCD é menos solúvel que a HPβCD, logo acarretando a diminuição da taxa de liberação do fármaco por um tempo prolongado.

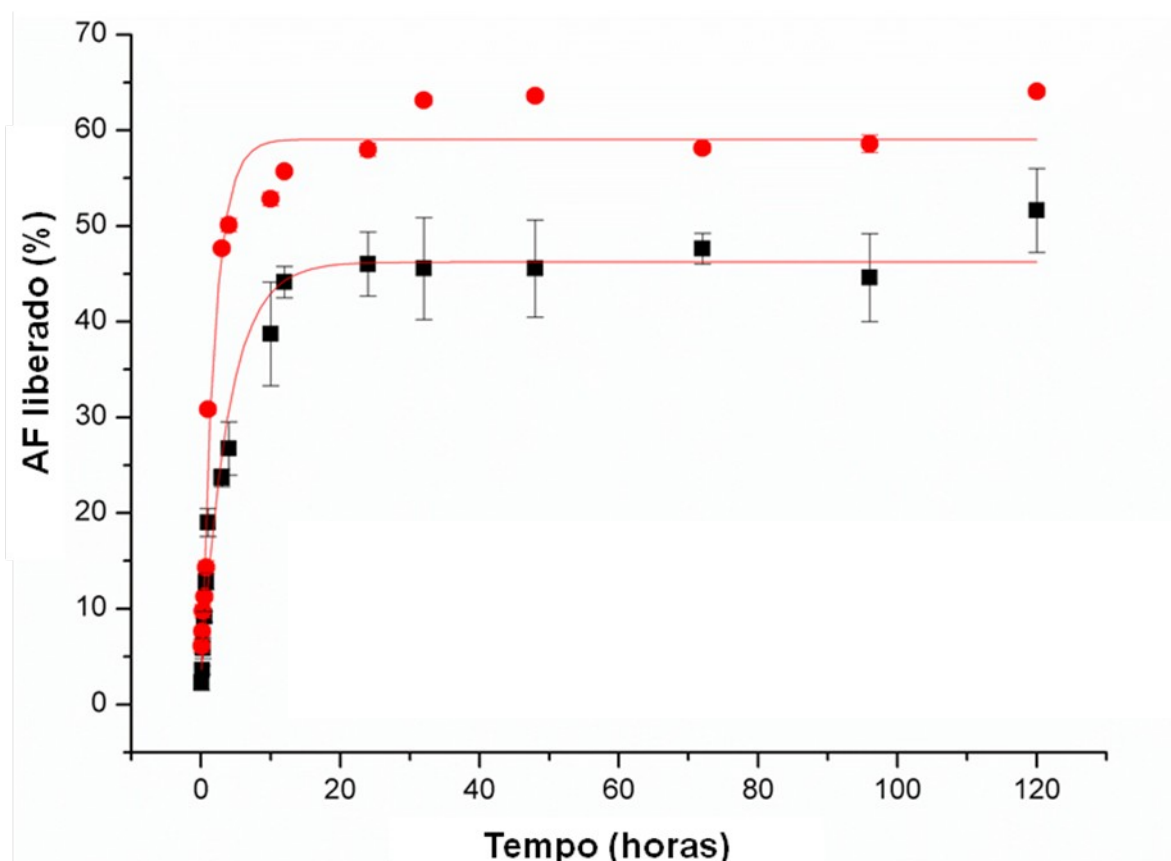


Figura 3.6 Cinética de liberação *in vitro* do lipossoma contendo AF:HPβCD (■) e do complexo de inclusão AF:HPβCD (●), em tampão pH 7,4 a 37 °C. Cada ponto representa a média de três diferentes experimentos ± D.P. As linhas representam o ajuste ao modelo de difusão não linear Fickiano.

A máxima liberação do AF no complexo de inclusão (AF:HPβCD) e no lipossomas contendo AF:HPβCD foi de $50,10 \pm 0,48 \%$ e $44,14 \pm 2,67\%$ respectivamente. Confirmando diferença significativa quanto aos dados estatísticos ($p < 0,05$; $t_{cal} = 9,69$).

Os parâmetros cinéticos baseados no modelo exponencial estão resumidos na tabela 3.5, onde os perfis cinéticos apresentaram um mesmo coeficiente de correlação de 0,97. Demonstrando $M_{\infty} = 220,70 \pm 8,17 \mu\text{g}$ para o AF complexado a HPβCD encapsulado no lipossoma e para o AF no complexo de inclusão $M_{\infty} = 250,53 \pm 3,47 \mu\text{g}$. A interação do complexo de inclusão com a cavidade aquosa dos lipossomas indicam uma menor mobilidade do fármaco, quando é analisado o valor da constante de associação (k_2).

Tabela 3.5 Efeito *burst* e parâmetros cinéticos de liberação (k_1 e k_2) para complexos de inclusão AF:HPβCD e lipossomas contendo complexo de inclusão AF:HPβCD.

Formulações	Efeito <i>burst</i> (%)	Modelo exponencial $M_t/M_\infty = (1 - k_1 e^{-k_2 t})$		Percentual total de AF liberado (%)
		k_1	$k_2 (h^{-1})$	
AF:HPβCD	14,31 ± 0,69	0,966 ± 0,05	0,528 ± 0,08	50,10 ± 0,48
Lipo-AF:HPβCD	19,01 ± 1,44	0,940 ± 0,01	0,248 ± 0,03	44,14 ± 2,67

Diante destes dados, pode-se sugerir que o Lipo-AF:HPβCD obteve uma maior eficácia na etapa de liberação controlada em relação ao complexo de inclusão, onde a mesma permaneceu em liberação controlada por um período mais longo. Além de que as ciclodextrinas melhoram a estabilidade dos lipossomas, segundo a literatura (Lira et al., 2009).

3.6 Conclusões

A 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina foi capaz de aumentar em mais de 19 vezes a hidrossolubilidade do ácido fumarprotocetrárico. Foram obtidos complexos de inclusão ácido fumarprotocetrárico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina através da técnica de liofilização, o que pode ser sugerido através dos resultados das análises de IV, RMN ¹H, difração de raios-X e microscopia.

Os lipossomas contendo ácido fumarprotocetrárico ou complexo de inclusão AF:HPβCD após a preparação apresentaram diâmetro médio e o índice de polidispersão de 85,8 ± 4,50 nm e 0,41 ± 0,14; 86,5 ± 1,41 nm e 0,24 ± 0,05, respectivamente.

Todavia nos ensaios de estabilidade, verificou-se que os lipossomas contendo AF demonstraram-se instáveis, enquanto os lipossomas contendo AF:HPβCD mantiveram-se estáveis após 60 dias quando armazenadas a 4°C.

O perfil cinético de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos lipossomas contendo AF:HPβCD apresentou um liberação controlada por um período mais prolongado, comparados aos complexos de inclusão.

Os dados apresentados nesse estudo determinaram que o uso de complexo de inclusão (AF:HPβCD) aumentou a solubilidade do fármaco, bem como perdurando a sua liberação quando encapsulados em lipossomas.

Agradecimentos

Campos agradece à CAPES pelo auxílio financeiro, concedido como bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado e ao FACEPE (Processo APQ-0661-2.01/10) e CNPq pelo financiamento da pesquisa

3.7 Referências Bibliográficas

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of lichens substances. **Tokyo: Society for the Promotion of Science**, 1954. 20p.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.2, 2007.

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

CAVALCANTI, I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; HONRATO, S.B.; CAMARA, C.A.; AMORIM, R.V.S.; FILHO, J.M.; RABELLO, M.M.; HERNANDEZ, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 44. 332–340, 2011.

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.

CHAO, J.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZANG, M.; ZANG, L.; Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Biological Macromolecules**. 50 (2012) 277– 282.

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

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

EDWARDS, H.G.M.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, **Journal of Molecular Structure**, 651-653, 2003.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p.1432-1441, 2006

EID, E.E.M.; ABDUL, A.B.; SULIMAN, F.E.O.; SUKARI, M.A.; RASEEDE, A.; FATAH, S.S. Characterization of the inclusion complex of zerumbone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**. 83, 1707–1714, 2011.

FARAJI, A.H.; PETER WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg. Med. Chem.** v.17, p. 2950–2962, 2009.

GARCÍA-ZEBIRI, I.X.; GONZÁLEZ-GAITANO, G.; SÁNCHEZ, M.; ISAISI, J.R. FTIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin. **Vibrat. Spectrosc.**, 2003;33:205-213

HAUCK, M.; JÜRGENS, S.; LEUSCHNER, C. Norstictic acid: Correlations between its physico-chemical characteristics and ecological preferences of lichens producing this depsidone. **Environmental and Experimental Botany**. 68 .309–313.2010

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

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

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

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

MAGENHEIM, B. & BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharm. Scie**. v. 1: 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 *Cladonia dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**, v.21, p.259-264, 2002.

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.

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.

SANTOS, N. P. S. ; PEREIRA, E. C. ; LIMA, R. C. ; HONDA, Neli Kika ; SILVA, Maria da Paz C da ; SILVA, Nicácio H da . Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris*(liquen). **Revista da Universidade do Amazonas**. Série Ciências Agrárias, Brasil, v. 1, n. 2, p. 23-43, 1997.

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-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.C.O.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carries for benzantine penicillin G: nanoencapsulation and nanocapsules. **Int J Pharm.**, 208: 71-80, 2000.

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

SIQUEIRA-MOURA, M.P; LIRA, M.C.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica*. vol. 44, n. 4, 2008.

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

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No presente estudo foi desenvolvido um método de espectrofotometria UV exato, preciso e reprodutível para a quantificação do ácido fumarprotocetrárico em matéria-prima e em microesferas de PCL, onde os parâmetros de validação foram determinados segundo diretrizes internacionais de padronização.

Foi evidenciado que a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina aumentou a solubilidade do ácido fumarprotocetrárico. O fenômeno da complexação do ácido fumarprotocetrárico com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina foi sugerido através das técnicas de análises como Infravermelho, RMN ^1H , difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura.

Os lipossomas contendo ácido fumarprotocetrárico ou complexo de inclusão AF:HPβCD, preparadas através da técnica de de hidratação de filme lipídico apresentaram estabilidade após formulação. Contudo, nos ensaios de estabilidade acelerada e a longo prazo os lipossomas contendo AF apresentaram instáveis, quanto ao aspecto macroscópico.

O perfil da cinética de liberação dos lipossomas contendo AF:HPβCD apresentou uma liberação controlada por um período mais prolongado, comparados aos complexos de inclusão.

REFERÊNCIAS

AHTI, T.; STENROOS, S.; XAXIER-FILHO, L.. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, ortheast Brazil. **Tropical Bryology**, 7: 55-70, 1993.

ALLEN, T.M.; HANSEN, C.B.; LOPES DE MENEZES, D.D. **Adv Drug Deliv Rev.** 16:267-284, 1995.

ALVES, G.M.C.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.L.; LEITE, A.C.L.; BRONDANI, D.J.; MEDEIROS, F.P.M.; BIEBER, L.W.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. Purificação e caracterização da β-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v.31, p.413-416, 2008.

ANDRADE, C.A.S. Avidade antitumoral de lectina de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int J Pharm.**, 278: 435-445, 2004.

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of lichens substances. **Tokyo: Society for the Promotion of Science**, 1954. 20p.

AZONANO.COM The A to Z of nanotechnology. Disponível em: <<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1243>> Acessado em 22 de janeiro de 2012.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.2, 2007.

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.; ESTES, K.S. ; BODOR, N. An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys. **International journal of pharmaceutics**, v.59, p.231-243, 1990

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.

CAVALCANTI, I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; HONRATO, S.B.; CAMARA, C.A.; AMORIM, R.V.S.; FILHO, J.M.; RABELLO, M.M.; HERNANDEZ, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 44. 332–340, 2011.

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.

CHAO, J.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZANG, M.; ZANG, L.; Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Biological Macromolecules**. 50 (2012) 277– 282.

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.

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

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

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 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.

Description of membranes: Lipid Bilayers. Adaptado de: <<http://courses.cm.utexas.edu>>.

Acesso em: 24 de Junho de 2010.

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.

DREXLER, E. K. Revolutionizing the Future of Technology (Revised 2006) Disponível em:<<http://www.eurekalert.org/context.php?context=nano&show=essays>> Acesso em: 10 Novembro 2010.

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

Duchêne, D. New Trends in Cyclodextrins and Derivatives. **Editions de Santé**, Paris, 1999.

EDWARDS, H.G.M.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, **Journal of Molecular Structure**, 651-653, 2003.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p.1432-1441, 2006

EID, E.E.M.; ABDUL, A.B.; SULIMAN, F.E.O.; SUKARI, M.A.; RASEEDE, A.; FATAH, S.S. Characterization of the inclusion complex of zerumbone with hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**. 83, 1707–1714, 2011.

FARAJI, A.H.; PETER WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg. Med. Chem.** v.17, p. 2950–2962, 2009.

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.

FERRAZ, M. S. **Avaliação da toxicidade oral do ácido úsnico microencapsulado**, Tese de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 85p. 2008.

FERRAZ, M. S.; SANTOS, N. P.S.; ALMEIDA, F. J. F.; SILVA, B. S.; PEIXOTO, C. A., GILLES P.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 00:00-00, 2009, (no prelo).

FEYNMAN, R., *There's plenty of room at the bottom*. **American Physical Society**. California Institute of Technology, Pasadena, CA.1959

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

FROMMING, K.H.; SZEJTLI, J. Pharmacokinetics and toxicology of cyclodextrins. In: Szejtli, J., Szenté, L. (Eds.), *Proc. of the 8th Int. Symposium on Cyclodextrins*. p.33-45, 1996

GARCÍA-ZEBIRI, I.X.; GONZÁLEZ-GAITANO, G.; SÁNCHEZ, M.; ISAISI, J.R. FTIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β-cyclodextrin. **Vibrat.Spectrosc.**, 2003;33:205-213

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 Cirurg. Bras.**, v.21, p.56-65, 2006.

GUNDJÓNSDÓTTIR, G. A.; INGÓLFSDÓTTIR, K. **Journal of Chromatography A**, 757:303-306, 1997.

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.

HATZI, P.; MOURTAS, S.; KLEPETSANIS, P.G.; ANTIMISIARIS, S.G. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. **Int. J. Pharm.**, v. 333, p. 167–176, 2007.

HAUCK, M.; JÜRGENS, S.; LEUSCHNER, C. Norstictic acid: Correlations between its physico-chemical characteristics and ecological preferences of lichens producing this depsidone. **Environmental and Experimental Botany**. 68 .309–313.2010.

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.

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

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

HUNECK, S. New results on the chemistry of lichen substances. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 81, 1–276, 2001.

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.

IMMORDINO, M.L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **Int. J. Nanomed.**, v.1, p. 297–315, 2006.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; GISSURARSON, S.R.; MULLER, B.B.; WAGNER, H. Inhibitory effects of lichen metabolic lobaric acid on arachidontate metabolism in vitro. **Phytomedicine**, v.2, p.243-246, 1996.

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

KIM, K.Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. **Nanomed.: Nanotech. Biol. Med.**, v. 3, p. 103–110, 2007.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomed.: Nanotech. Biol. Med.**, v. 1, p. 193– 212 , 2005.

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.

LAPENDA, T.L.S. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo desidrocrotina e avaliação da atividade antitumoral. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

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.

MACHADO, L.C.; GNOATTO, S.A.; KLUPPEL, M.L.W. Lipossomas aplicados em Farmacologia: uma revisão da literatura. **Estud. Biol.**, 29(67):215-224, abr/jun, 2007.

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 *Cladonia dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**, v.21, p.259-264, 2002.

MAITANI, Y.; ASO, Y.; YAMADA, A.; YOSHIOKA, S. Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency. **Int. J. Pharm.**, v. 356, p. 69–75, 2008.

MENDES, C.S.M. Estudo computacional e espectroscópico do ácido úsnico. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

MENDONÇA, E.A.M. Preparação, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de lipossomas contendo LPSF/AC04 complexos de inclusão com ciclodextrinas. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

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.

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.

NASCIMENTO, S. LK. PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M. SILVA, N. H.; BOITARD, M. ; BERIEL, H. **Acta Botânica brasílica**, 8:97-108, 1995

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.

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.

OLIVEIRA, M.S. Atividade antinoceptiva, antipirética e antiinflamatória do extrato bruto e do ácido fumarprotocetrárico isolado da *Cladonia verticillaris* (Líquens). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

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.

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 cytotoxic activity of New Zealand 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.

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

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 reparo 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.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomed.: Nanotech. Biol. Med.**, v 3, p. 20– 31, 2007.

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

SANDIP, B. T.; UDUPA, N.; RAO, B. S. S.; DEVI, P. U. Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management. **Ind. J. Pharmacol.**, v. 32, p. 214-220, 2000.

SANTOS, N. P. S. ; PEREIRA, E. C. ; LIMA, R. C. ; HONDA, Neli Kika ; SILVA, Maria da Paz C da ; SILVA, Nicácio H da . Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris*(liquen). **Revista da Universidade do Amazonas**. Série Ciências Agrárias, Brasil, v. 1, n. 2, p. 23-43, 1997.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quim Nova**;25:1181-5. 2002.

SANTOS, N. P. S. **Estudo comparativo da ação antitumoral dos extratos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris* (liquens) contra diferentes tumores sólidos experimentais.** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 112p. 1996.

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.C.O.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carries for benzantine penicillin G: nanoencapsulation and nanocapsules. **Int J Pharm.**, 208: 71-80, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POLHMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 26, n. 5, 726-737, 2003.

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.

SHUKLA, S.; PRISCILLA, A.; BANERJEE, M.; BHONDE, R.R.; GHATAK, J.; SATYAM, P.V.; SASTRY, M. Porous gold nanospheres by controlled transmetalation reaction: anovel material for application in cell imaging, **Chem. Mater.** 17 (2005) 5000–5005.

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.2, pp. 138-158, 2001.

SILVA, C.V.N.S.; BARBOSA, J.A.P.; FERRAZ, M.S.; DA SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SANTOS, N.P.S.S. Microesferas de Poli-ε-caprolactona contendo ácido difractáico e complexos de inclusão ácido difractáico:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina: caracterização e avaliação da citotoxicidade. **Journal of Microencapsulation**. 0:00-00 (NO PRELO), 2012.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p. 947-965, 2004.

SIMONETTI, A.C. Determinação das características: físico-químicas, antitumoral e de biodisponibilidade das nanocápsulas, contendo ácido fumarprotocetrárico extraído da *Cladonia verticillaris* (Raddi)Fr. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

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

SILVA, C.V.N.S. Desenvolvimento de microsferas contendo complexos de inclusão ácido difractáico: 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina e avaliação da atividade biológica. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SIQUEIRA-MOURA, M.P; LIRA, M.C.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica*. vol. 44, n. 4, 2008.

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.

SOUZA, A.A; BITTENCOURT, M.A. A contribuição da difração de raios-x para configuração molecular. *Ensino e pesquisa*.v1.2008.

STAMATIALIS, D.F.; PAPENBURG, B.J.; GIRONÉS, M.; SAIFUL, S.; BETTAHALLI, 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.

STELLA, V.J; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**., 36:30-48, 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.

SZATHMARY, S.C.; SEILLER, K.U.; LUCHMANN, I.; HUSS, H.J. Pharmacokinetic behaviour and absolute bioavailability of HP-β-CD after increasing doses in volunteers. In: Duchene, D. (Ed.), **Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins**. Editions de Sante, Paris. p. 535–540, 1990.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**. v.98, pp.1743–53, 1998.

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

TORCHILIN, V.P. Multifunctional nanocarriers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 58, p. 1532– 1555, 2006.

URDAPILLETA, A.A.A. Atividade de substância isolada de líquens sobre formas promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

UNITED States Pharmacopoeia. 26. ed. Rockville: **United States Pharmacopoeial Convention**, 2003. p.2439-2442.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. Ciclodextrinas e seus complexos de inclusão. In: **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, p.19, 2006.

VOINEA, M.; SIMIONESCU, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs **J Cell Mol Med.**, 6(4): 456-474, 2002.

VYAS, S. P.; SHAMA, Q.; SWATI, G.; JAGANATHAN, K.S. Aerosolized liposome-based delivery of amphotericin B to alveolar macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v.296, p.12–25, 2005.

WESSEN, C.K. Ivestigação de ação expectorantedo extrato acêtonico e do ácido fumarprotocetrárico de *Cladonia verticillaris* (líquen) em camundongos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

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.

YANO-MELO, A.M; VICENTE, C; XAVIER-FILHO, L; Allelopathic effect of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlingsin *Allium cepa* L. **Tropycal Bryology**. 17:133-139, 1999.

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