

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ISABELLA MACÁRIO FERRO CAVALCANTI

**Preparação, Caracterização e Cinética de Liberação *in vitro* de
Lipossomas contendo β -lapachona e Complexos de Inclusão β -
lapachona:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina**

RECIFE

2010

ISABELLA MACÁRIO FERRO CAVALCANTI

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CINÉTICA DE
LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE LIPOSSOMAS CONTENDO β -
LAPACHONA E COMPLEXOS DE INCLUSÃO β -LAPACHONA:2-
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA**

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

RECIFE

2010

Cavalcanti, Isabella Macário Ferro

Preparação, caracterização e cinética de liberação *in vitro* de lipossomas contendo β -lapachona e complexos de inclusão β -lapachona:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina / Isabella Macário Ferro Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2010.

102 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Farmacologia 2. Câncer 3. Membrana celular I. Título.

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB – 2010- 103

Autorizo a divulgação apenas do resumo e abstract deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CAVALCANTI, Isabella Macário Ferro

Título: Preparação, caracterização e cinética de liberação *in vitro* de lipossomas contendo β - lapachona e complexos de inclusão β -lapachona:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 01/03/2010

Banca Examinadora

Profª. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: Nereide Stela Santos Magalhães

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: Ivan da Rocha Pitta

Profª. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco / Centro Acadêmico de Vitória (UFPE / CAV)

Assinatura: Noemia Pereira da Silva Santos

Dedico aos meus pais Jorge
Antônio e Cândida Elizabete e a
minha irmã Marcella Macário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos derramadas em minha vida, pela saúde e por me permitir realizar mais este sonho. Obrigada por todas as pessoas especiais que o Senhor colocou em meu caminho e que me fizeram crescer e alcançar os meus objetivos. Obrigada meu Deus por tudo.

Aos meus pais, Jorge e Cândida, pelo grande exemplo de esforço e dedicação. Obrigada por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Vocês são a base na minha vida e esta base é muito sólida, pois foi construída com muito amor. Espero ter dado muito orgulho a vocês, pois vocês são o maior orgulho da minha vida. Amo vocês incondicionalmente e eternamente.

A minha irmã Marcella, Cecel, por sempre estar ao meu lado e me apoiar em todos os momentos da minha vida.

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

À Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, primeiramente por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa SLC e também por sempre me incentivar durante toda a minha graduação e mestrado. Muito obrigada por acreditar no meu potencial e na minha competência.

À Doutoranda Elisângela Mendonça, Elis, pela atenção e amizade dedicada a mim durante toda a minha iniciação científica e mestrado. Obrigada por ser um exemplo de determinação e profissionalismo.

À Natália Gomes e a Wheverton Ricardo pela grande amizade dedicada a mim durante a graduação e mestrado, e se Deus quiser durante nossas vidas. Vocês são a família que escolhi aqui na terra. Obrigada por tudo!

À Paula Guimarães, Paula Rezende, Francisco Montenegro, Tereza Dias, Gabriela Salgueiro por serem meus amigos verdadeiros a mais de 15 anos e por todos os momentos bons vividos juntos.

A todos os meus amigos de escola por tudo que eles sempre representaram e representam na minha vida.

A Mateus Bittencourt por sempre me apoiar em todas as decisões da minha vida. Obrigada por me fazer seguir em frente e alcançar os meus objetivos.

À professora e acima de tudo amiga, Cleide Miranda pelos ensinamentos, compreensão, amizade e incentivo.

Aos amigos do SLC, Elisângela, Mariane, Islene, Mirela, Rafaela, Milena, Waldenice, Fábio, Taciana, Hywre, Rosana, Larissa, Jéssica, Marcileide, André, Rebeca e Vinícius pelo companheirismo e atenção dedicados a mim durante os momentos que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. Celso Amorim por nos fornecer gentilmente a β -lapachona.

Ao Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala e à Sara Braga Honrato pela imensa contribuição para a caracterização dos complexos e sistemas desenvolvidos.

Ao Prof. Dr. Marcello Zaldini e a Marcelo Rabello pela contribuição na modelagem molecular dos complexos de inclusão.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro na realização dessa pesquisa.

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

Aos funcionários do Departamento de Química Fundamental (DQF), representados por

Ricardo Oliveira, e do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), representados por Edwin Milet, da Universidade Federal de Pernambuco pela colaboração e contribuição nas análises das amostras.

A todos os outros colegas e amigos que passaram pela minha vida e contribuíram para a realização desta dissertação.

RESUMO

CAVALCANTI, I. M. F. Preparação, caracterização e cinética de liberação *in vitro* de lipossomas contendo β -lapachona e complexos de inclusão β -lapachona:2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O presente estudo objetivou a preparação e caracterização de lipossomas contendo β -lapachona (β -lap) ou complexo de inclusão β -lap:2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (β -lap:HP β -CD) visando aumentar a solubilidade da β -lap e obter um sistema de liberação controlada. Inicialmente ensaios de solubilidade de fases de β -lap em HP β -CD foram realizados. O complexo de inclusão β -lap:HP β -CD foi preparado pelo método de liofilização (*freeze-drying*) e caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN H^1), análise termogravimétrica (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho (IV) e espectroscopia Raman. A modelagem molecular dos complexos β -lap:HP β -CD também foi realizada. Os lipossomas foram preparados utilizando a técnica de hidratação do filme lipídico e as estabilidades acelerada e a longo prazo foram avaliadas. A cinética de liberação *in vitro* da β -lap a partir dos lipossomas foi avaliada pelo método de diálise. No estudo de solubilidade de fases um aumento de 302 vezes na solubilidade da β -lap em água foi alcançado na presença de HP β -CD e a constante de associação foi calculada ($K_{1:1} = 961 M^{-1}$). Os termogramas da TG e DSC de β -lap:HP β -CD mostraram a ausência do pico correspondente ao ponto de fusão do β -lap (128 °C). O perfil das bandas Raman demonstrou um indício de uma mudança no ambiente molecular da β -lap no complexo de inclusão. Sobre o RMN H^1 pode ser observado que os prótons Hc da β -lap interagem com os dois prótons da cavidade da HP β -CD (H₃ e H₅). A energia de interação do complexo de inclusão β -lap:HP β -CD foi -23,67 kJ.mol⁻¹. Estes resultados sugerem que a β -lap está incluída na cavidade da HP β -CD, resultado este confirmado por estudos de modelagem molecular, onde foram revelados os mais importantes aspectos moleculares envolvidos com a estabilidade do complexo de inclusão β -lap:HP β -CD. Os lipossomas contendo β -lap apresentaram tamanho de partícula de $104,35 \pm 2,33$ nm, potencial zeta de $+21,03 \pm 4,64$ mV e eficiência de encapsulação de $97,09 \pm 0,02$ %. Enquanto que, lipossomas contendo β -lap:HP β -CD apresentaram tamanho de partícula de $112,3 \pm 1,49$ nm, potencial zeta de $+23,22 \pm 1,90$ mV e eficiência de encapsulação $93,56 \pm 0,04$ %. Na cinética de liberação foi observado que os lipossomas contendo β -lap:HP β -CD apresentaram uma maior velocidade de liberação de β -lap ($216,25 \pm 2,34$ μ g/h) comparado aos lipossomas contendo apenas o fármaco ($183,95 \pm 1,82$ μ g/h). A encapsulação de β -lap e complexo de inclusão β -lap:HP β -CD em lipossomas pode ser uma alternativa para aumentar a solubilidade da β -lap e, em consequência, viabilizar sua utilização na terapêutica do câncer.

Palavras-chave: β -lapachona. Complexos de inclusão. Lipossomas.

ABSTRACT

CAVALCANTI, I. M. F. Preparação, caracterização e cinética de liberação *in vitro* de lipossomas contendo β -lapachona e complexos de inclusão β -lapachona:2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. 2010. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The present study aimed to prepare and characterize liposomes containing β -lapachone (β -lap) or β -lap:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (β -lap:HP β -CD) in order to increase the β -lap solubility and obtain a drug delivery system. Initially, a phase solubility study of β -lap in HP β -CD was performed at 25 °C. The β -lap:HP β -CD inclusion complex was prepared by the *freeze-drying* technique and characterized by proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TG), differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR) spectroscopy and Raman spectroscopy. The molecular modeling of the β -lap:HP β -CD inclusion complex was also performed. The liposomes were prepared using the lipid film hydration technique and the accelerated and long term stabilities were evaluated. The *in vitro* release kinetics of β -lap from the liposomes was evaluated by dialysis method. In the phase solubility study, an increase of 302-fold in β -lap solubility was achieved in the presence of HP β -CD and a constant of association was calculated ($K_{1:1} = 961 \text{ M}^{-1}$). TG and DSC thermograms of β -lap:HP β -CD complex showed the absence of the peak corresponding to the melting point of β -lap (128 °C). The Raman bands profile indicated a change in the molecular environment of β -lap in the inclusion complex. About $^1\text{H-NMR}$ it can be observed that the protons Hc of β -lap interact with the two protons of the HP β -CD cavity (H₃ and H₅). The interaction energy of β -lap:HP β -CD inclusion complex is $-23.67 \text{ kJ.mol}^{-1}$. These results suggest that β -lap would be trapped in the cavity of HP β -CD by replacing inside water, which is confirmed by molecular modeling studies, where was revealed the most important molecular aspects involved with the stability of the β -lap:HP β -CD inclusion complex. The molecular modeling confirmed the formation of β -lap:HP β -CD inclusion complex. The liposomes containing β -lap presented mean particle size of $104.35 \pm 2.33 \text{ nm}$, zeta potential of $+23.22 \pm 1.90 \text{ mV}$ and encapsulation efficiency of $97.09 \pm 0.02 \%$. However, the liposomes containing β -lap:HP β -CD presented mean particle size of $112.3 \pm 1.49 \text{ nm}$, zeta potential of $+21.03 \pm 4.64 \text{ mV}$ and the encapsulation efficiency of $93.56 \pm 0.04 \%$. In the release kinetics it was observed that the β -lap:HP β -CD-loaded liposomes offered a higher β -lap release velocity ($216.25 \pm 2.34 \text{ }\mu\text{g/h}$) than that of β -lap-loaded liposomes ($183.95 \pm 1.82 \text{ }\mu\text{g/h}$). The encapsulation of β -lap and β -lapachone:cyclodextrin inclusion complex into liposomes could provide an alternative to overcome β -lapachone low solubility and eventually its clinical use in cancer therapy.

Keywords: β -lapachone. Inclusion complex. Liposomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do lapachol (A) e da β -lapachona (B).....	20
Figura 2 – Crescimento do número de publicações referentes à β -lapachona.....	21
Figura 3 – Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) da β -lapachona.....	21
Figura 4 – Estrutura química geral das ciclodextrinas (A) e representação esquemática da estrutura tridimensional mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose (B).....	26
Figura 5 – Estrutura molecular e dimensões da cavidade das CDs α , β e γ	27
Figura 6 – Ilustração da associação entre a β -ciclodextrina e o fármaco.....	28
Figura 7 – Representação esquemática da formação do complexo de inclusão.....	29
Figura 8 – Perfis de solubilidade segundo a teoria de Higuchi e Connors.....	32
Figura 9 – Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada ou sustentada de fármacos.....	36
Figura 10 – Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma.....	38
Figura 11 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas.....	39
Figura 12 – Características estruturais de lipossomas: convencionais, furtivos ou de longa circulação (Stealth [®]), sítio-específicos e catiônicos.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da β -lapachona frente a diferentes linhagens de células cancerígenas humanas.....	24
Tabela 2: Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas.....	26

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina-glicosiltransferase
CE	Eficiência de complexao
CHOL	Colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D.P.	Desvio padrão
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
HP β -CD	2- hidroxipropil- β -ciclodextrina
IC ₅₀	Concentrao para inibir 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV/IR	Espectroscopia de absoro na região do infravermelho
K _{1:1}	Constante de associao
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares grandes
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1
OMS	Organizao Mundial de Saúde
PDI	ndice de polidispersibilidade
PEG	Polietilenoglicol
PM	Peso molecular
RMN H ¹ / ¹ H-NMR	Ressonância magnética nuclear de prótons
ROS	Espécies reativas de oxignio
SA	Estearilamina
SNC	Sistema nervoso central
SPC	Fosfatidilcolina de soja
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TG	Análise termogravimétrica

UV	Ultravioleta
α -CD	α -ciclodextrina
β -CD	β -ciclodextrina
β -lap	β -lapachona
β -lap:HP β -CD	Complexo de inclusão de β -lapachona em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina
γ -CD	γ -ciclodextrina

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	16
2.0 – OBJETIVOS.....	19
2.1 – Geral.....	19
2.2 – Específicos.....	19
3.0 – REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 – β -lapachona.....	20
3.1.1 – Síntese química e propriedades físico-químicas da β -lapachona.....	20
3.1.2 – Atividades farmacológicas da β -lapachona.....	21
3.1.2.1 – Atividade antitumoral.....	22
3.2 – Ciclodextrinas.....	24
3.2.1 – Características gerais.....	24
3.2.2 – Classificação das ciclodextrinas.....	26
3.2.3 – Complexos de inclusão com ciclodextrinas.....	28
3.2.4 – Métodos de preparação dos complexos de inclusão.....	30
3.2.5 – Métodos de caracterização dos complexos de inclusão.....	30
3.2.5.1 – Estudo de solubilidade de fases.....	31
3.2.5.2 – Eficiência de complexação.....	32
3.2.5.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN H^1).....	32
3.2.5.4 – Análise Termogravimétrica (TG).....	32
3.2.5.5 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	33
3.2.5.6 – Espectroscopia por Infravermelho (IV).....	33
3.2.5.7 – Espectroscopia Raman.....	34
3.2.6 – Aplicação das ciclodextrinas.....	34
3.3 – Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.....	35
3.3.1 – Lipossomas.....	36
3.3.2 – Classificação dos lipossomas.....	38
3.3.2.1 – Quanto ao número de lamelas e tamanho das vesículas.....	38
3.3.2.2 – Quanto à composição química.....	39

3.3.3 – Método de preparação dos lipossomas.....	40
3.3.4 – Câncer e aplicações farmacêuticas dos lipossomas.....	41
4.0 – METODOLOGIA.....	43
4.1 – Material.....	43
4.2 – Estudo de solubilidade de fases.....	43
4.3 – Obtenção e caracterização dos complexos de inclusão β -lap:HP β -CD.....	43
4.4 – Encapsulação da β -lapachona ou complexo de inclusão β -lap:HP β -CD em lipossomas.....	44
4.5 – Avaliação da estabilidade acelerada e a longo prazo das formulações.....	44
4.6 – Doseamento da β -lapachona nos lipossomas.....	45
4.7 – Determinação da eficiência de encapsulação.....	45
4.8 – Cinética de liberação <i>in vitro</i> da β -lapachona a partir dos lipossomas.....	45
5.0 – RESULTADOS.....	46
5.1 – ARTIGO 1: Enhancement of β -lapachone solubility in inclusion complex and liposomal formulations.....	46
6.0 – CONCLUSÕES.....	72
7.0 – PERSPECTIVAS.....	73
8.0 – REFERÊNCIAS.....	74
9.0 – ANEXOS.....	88
9.1 – ANEXO A.....	88
9.2 – ANEXO B.....	91

1.0 – INTRODUÇÃO

A β -lapachona (β -lap) é um composto que pode ser naturalmente extraído da casca de plantas da espécie *Tabebuia avellanedae*, conhecida popularmente como Ipê-roxo ou Pau d'arco, árvore nativa da América do Sul com alta frequência no Brasil (ALVES et al., 2008), porém ela também pode ser produzida através de semi-síntese química diretamente do lapachol, substância amarela também obtida das mesmas plantas (LI et al., 1993). Ela tem sido uma das naftoquinonas mais extensivamente estudada, pois apresenta diferentes atividades farmacológicas com potenciais terapêuticos tais como: antibacteriana (PESSOA-ANTUNES et al., 2006), antifúngica (GUIRAUD et al., 1994), tripanossomicida (GOULART et al., 1997; LOPES et al., 1978; MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2003), mas o principal potencial desta molécula é sua atividade antineoplásica contra linhagens celulares humanas (WOO; CHOI, 2005). As primeiras avaliações sobre sua ação antitumoral datam da década de 70 (DOCAMPO et al., 1979) e investigações recentes têm ampliado o conhecimento dessa *orto*-naftoquinona como agente antineoplásico (HUSSAIN et al., 2007).

Mesmo a β -lap apresentando uma atividade antitumoral relevante, sua aplicação terapêutica é limitada devido sua baixa solubilidade em água (0,038 mg/mL ou 0,16 mM) (NASONGKLA et al., 2003). Desta forma preparações farmacêuticas que visem aumentar sua solubilidade em água e direcionar o fármaco no sistema biológico podem ser uma alternativa para ultrapassar esta limitação. Neste contexto, as ciclodextrinas (CDs) podem ser utilizadas para a formação de complexos de inclusão com a β -lap.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; GRILLO et al., 2008) que podem ser utilizadas para a formação de complexos de inclusão com uma variedade de moléculas (DAVIS; BREWSTER, 2004). A formação deste complexo proporciona uma melhora na estabilidade, maior hidrossolubilidade e maior biodisponibilidade do composto utilizado como princípio ativo (BOUDAD et al., 2001; DUCHÊNE et al., 1999). Porém as ciclodextrinas não são consideradas sistemas de liberação controlada de fármacos (FERNANDES et al., 2007).

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

Sistemas de liberação controlada são concebidos para se obter uma concentração plasmática ou níveis de concentração tecidual de fármacos dentro da faixa terapêutica com liberação controlada (velocidade controlada), atingindo a dose terapêutica desejada e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto. Estes sistemas podem retardar a liberação do princípio ativo, sustentar a sua liberação e/ou direcioná-lo a sítios específicos de ação (células, órgãos, microorganismos) (LEE; ROBINSON, 2004).

Os lipossomas, descobertos em 1963, consistem de esferas microscópicas de tamanhos variados (em escalas de nm e μ m) com uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimento aquoso (TORCHILIN, 2005). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa e aplicações terapêuticas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Estes sistemas podem, assim, contribuir para a terapêutica do câncer, já que esta patologia ainda apresenta limitações quanto ao seu tratamento, como por exemplo, os efeitos colaterais e as repetidas administrações.

No Brasil, o câncer já figura como a segunda causa de morte na população, precedido apenas pelas doenças cardiovasculares. As estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorreram 466.730 novos casos de câncer. Nas últimas décadas, o câncer de próstata e o de mama têm emergido como uma das doenças mais comuns sendo consideradas as primeiras causas de morte por câncer em homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2009).

Apesar das melhorias no tratamento do câncer, os regimes quimioterapêuticos existentes apresentam limitações, como por exemplo, um índice terapêutico estreito que não permite a administração de uma quantidade adequada do fármaco visando uma eficácia farmacológica. Além disso, os tratamentos convencionais (radioterapia e quimioterapia) não garantem que as células normais não sejam atingidas pelos fármacos não seletivos (NISHIYAMA et al., 2009). Portanto o desenvolvimento de novas terapêuticas eficazes com efeitos colaterais mínimos dos quimioterápicos é o objetivo de estudo da comunidade científica na área de cancerologia.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta caráter multidisciplinar viabilizando, assim a ampliação dos estudos que caracterizam físico-quimicamente complexos de inclusão e lipossomas contendo β -lapachona ou os complexos β -lap:HP β -CD, utilizando conceitos da química supramolecular para aumentar a solubilidade da β -

lap e da nanotecnologia farmacêutica para obter sistemas de liberação controlada. Desta forma, a β -lapachona e os complexos β -lap:HP β -CD serão encapsulados em lipossomas, os quais podem contribuir como uma alternativa em potencial no avanço da terapêutica do câncer.

2.0 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

O objetivo do presente trabalho consiste em preparar, caracterizar e avaliar a cinética de liberação *in vitro* de lipossomas contendo β -lapachona e complexos de inclusão β -lap:HP β -CD para o tratamento do câncer.

2.2 – Específicos

- Preparar complexos de inclusão da β -lapachona em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (β -lap:HP β -CD);
- Realizar a caracterização físico-química dos complexos β -lap:HP β -CD através de RMN H^1 , DSC, TG, IV e Raman;
- Realizar a modelagem molecular dos complexos β -lap:HP β -CD;
- Obter lipossomas contendo β -lapachona e complexos β -lap:HP β -CD;
- Avaliar a estabilidade acelerada e a longo prazo das formulações;
- Determinar a taxa de encapsulação da β -lapachona em lipossomas;
- Realizar ensaios de cinética de liberação *in vitro* da β -lapachona a partir dos lipossomas.

3.0 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – β -lapachona

3.1.1 Síntese química e propriedades físico-químicas da β -lapachona

A β -lapachona [3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol (1,2-b)pirano-5,6-diona ($C_{15}H_{14}O_3$, PM 242,3)] é uma *orto*-naftoquinona que pode ser obtida naturalmente da casca de plantas da espécie *Tabebuia avellanedae*, conhecida popularmente como Ipê-roxo ou Pau d'arco, árvore nativa da América do Sul com alta frequência no Brasil (ALVES et al., 2008). Porém, em larga escala, a β -lapachona (β -lap) é produzida através de semi-síntese química pelo simples tratamento do lapachol, substância amarela também obtida das mesmas plantas, com ácido sulfúrico (LI et al., 1993).

Na metade do século passado, as naftoquinonas do Ipê-roxo foram estudadas pioneiramente pelo Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com destaque para o lapachol, antigamente comercializado como medicamento pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (SILVA et al., 2003). As estruturas químicas do lapachol e da β -lap estão apresentadas na Figura 1.

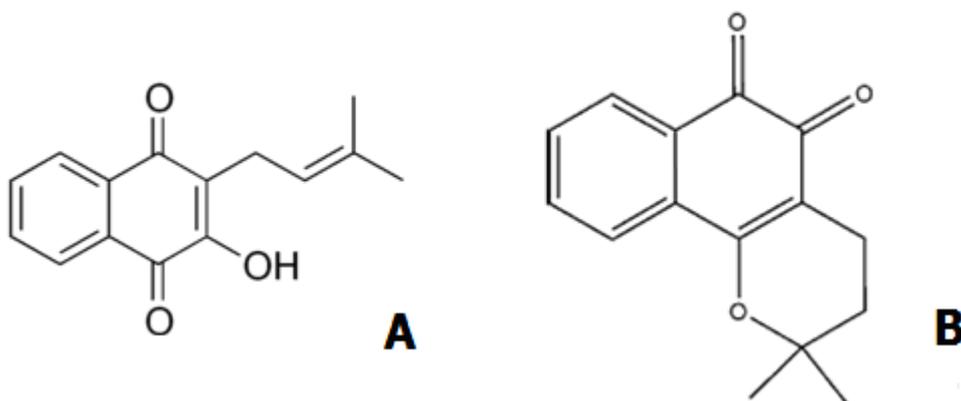


Figura 1 – Estruturas químicas do lapachol (A) e da β -lapachona (B).

Ao longo dos anos, houve um aumento significativo do interesse científico pela avaliação das atividades e propriedades da β -lap como pode ser observado na Figura 2. A β -lap tem sido, desde a década de 70 (DOCAMPO et al., 1979), alvo de estudos no mundo todo devido ao excelente potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 1999; LI et al., 2002).

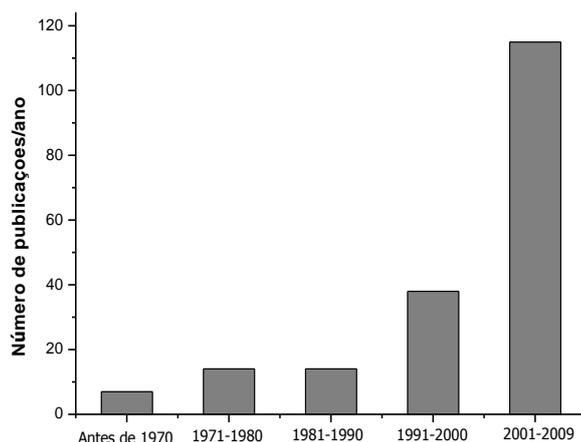


Figura 2 – Crescimento do número de publicações referentes à β -lapachona (Dados adquiridos do ScopusTM; 2009).

A β -lapachona caracteriza-se por ser uma substância de caráter hidrofóbico, sendo pouco solúvel em água (0,16 mM ou 0,038 mg/mL) (NASONGKLA et al., 2003), porém muito solúvel na maioria dos solventes orgânicos. A β -lapachona possui uma forma bem definida de cristais aciculares, laranja-avermelhado, visíveis a olho nu (Fig. 3) (ALVES et al., 2008). O ponto de fusão da β -lap varia entre 154 e 156 °C e seu peso molecular é 242,3 (ALVES et al., 2008).

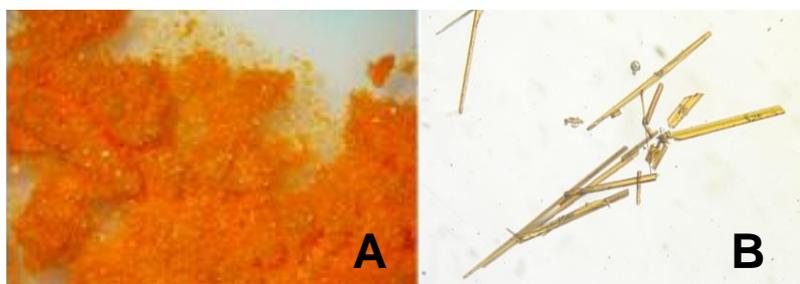


Figura 3 – Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) dos cristais da β -lapachona.

3.1.2 – Atividades farmacológicas da β -lapachona

A β -lapachona tem sido uma das naftoquinonas mais extensivamente estudada, pois apresenta diferentes atividades farmacológicas com potencial terapêutico tais como: antibacteriana (PESSOA-ANTUNES et al., 2006), antifúngica (GUIRAUD et al., 1994), tripanossomicida (LOPES et al., 1978; GOULART et al., 1997; MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2003), antiviral (SCHUERCH; WEHRLI, 1978; SCAFFBER-SABBA et al., 1984) e antiinflamatória (MOON et al., 2007), mas o principal potencial desta molécula é sua atividade antineoplásica (WOO; CHOI, 2005).

3.1.2.1 – Atividade Antitumoral

A β -lapachona atua contra diversos tipos de células tumorais, especialmente em células de próstata (LI et al., 1999; BLANCO et al., 2007), mama (SIEGEL; ROSS, 2000), ovário (LI et al., 1999; WOO; CHOI, 2005), fígado (LAI et al., 1998), pâncreas (OUGH et al., 2005), pulmão (BLANCO et al., 2007) e células de mieloma múltiplo (LI et al., 2000).

A β -lapachona apresenta efeito citotóxico significativamente reforçado pela presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato):quinona oxidoreductase 1 (NQO1), uma proteína altamente expressa em uma variedade de cânceres humanos, incluindo os de pulmão (BELINSKY; JAISWAL, 1993), próstata (LOGSDON et al., 2003), pâncreas (LEWIS et al., 2005) e mama (SIEGEL; ROSS, 2000). NQO1 catalisa a redução de dois elétrons das quinonas usando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) como doador resultando na forma hidroquinona (PLANCHON et al., 2001). A β -lap reduzida em dois elétrons é instável e oxida de volta à forma original de β -lap, que é novamente reduzida pela NQO1. Esse ciclo entre as formas de quinona e hidroquinona da β -lap provoca grave redução de NAD(P)H e NADH, resultando na depleção de adenosina tri-fosfato (ATP), liberação de citocromo C da mitocôndria e um aumento na Ca^{2+} citosólico (SUZUKI et al., 2006). Estes distúrbios metabólicos intracelulares resultam em morte celular por apoptose (PINK et al., 2000). A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a redução e oxidação de β -lap, também foi relatada como causadora de morte celular (PINK et al., 2000; PARDEE et al., 2002). Siegel e Ross (2000) observaram que as células tumorais possuem teores mais elevados de NQO1 que células normais. Pink e colaboradores (2000) mostraram evidências que indicam a participação da enzima NQO1 no processo de ativação da β -lapachona na apoptose, aumentando a citotoxicidade. Eles constataram que ao adicionar nas culturas celulares um inibidor de NQO1 (dicoumarol) a apoptose era bloqueada. Ough e colaboradores (2005) observaram que a β -lapachona diminui a viabilidade em células cancerígenas de pâncreas, pois estas células apresentam alta expressão de NQO1. Planchon e colaboradores (2001) observaram que a expressão dessa enzima em células prostáticas cancerígenas é o ponto chave determinante para a apoptose e letalidade após exposição a β -lap. Em seus experimentos estas células foram mais sensíveis a β -lap que as células normais.

A β -lapachona também age como inibidora das topoisomerasas I e II. A incubação direta desta substância com a topoisomerase I, antes da adição de DNA como substrato, aumenta drasticamente o efeito inibitório, sugerindo a interação direta da β -lap com a topoisomerase I. Este modo de atuação difere em relação ao de outras substâncias inibidoras das topoisomerasas, como, por exemplo, a Camptotecina que é DNA dependente (LI et al., 1993; SILVA et al., 2003). A β -lap pode também agir diretamente na topoisomerase II (CHOI et al., 2003; SILVA et al., 2003) inibindo sua atividade, que resulta em citotoxicidade, devido ao fato desta enzima ser crítica para o funcionamento normal de qualquer célula, pois ela mantém a integridade do DNA, reparando-o quando danificado (WHITACRE et al., 1997).

A β -lapachona combinada com outras substâncias que atuam em diferentes mecanismos celulares pode ser uma alternativa quimioterápica. Li e colaboradores (1999), em experimentos *in vivo*, observaram que a β -lap combinada com o taxol constitui-se em uma associação efetiva contra tumores humanos do ovário e da próstata, implantados em ratos, sugerindo uma possível quimioterapia em humanos baseada na combinação destes dois fármacos. Recentemente, Kumi-Diaka (2002) mostrou que o tratamento combinado da β -lap com a isoflavona genisteína (metabólito obtido da soja) é mais potente contra células de câncer de próstata PC3 e LNCaP que ambas isoladamente. Como a β -lap atua nos pontos de checagem G1 e G2 no ciclo celular, enquanto a genisteína atua nos pontos G2 e M, a combinação dos dois compostos é mais eficiente, mostrando que esta terapia de combinação é mais efetiva para a quimioterapia do câncer de próstata.

Vários estudos foram realizados para determinar a concentração mínima da β -lap para inibir 50 % do crescimento celular (IC_{50}). Nasongkla e colaboradores (2003) em seus experimentos determinaram a IC_{50} da β -lap para células de câncer de mama humano (MCF-7) como sendo 0,41 $\mu\text{g/mL}$ (1,7 μM). Silva-Júnior e colaboradores (2007) determinaram a IC_{50} para as células de câncer humano do sistema nervoso central (SNC) (SF-295), de colo-retal (HCT-8), de mama (MDAMB-435) e células leucêmicas (HL-60), sendo 0,22 $\mu\text{g/mL}$ (0,91 μM), 0,20 $\mu\text{g/mL}$ (0,83 μM), 0,06 $\mu\text{g/mL}$ (0,25 μM) e 0,40 $\mu\text{g/mL}$ (1,65 μM), respectivamente (Tabela 1). Como pode ser observada a atividade antitumoral da β -lap é significativa já que ela apresenta baixos valores de IC_{50} , isto é, são necessárias quantidades pequenas de β -lap para eliminar 50 % das células tumorais. Além disso, como já havia sido relatado, a β -lap age em células que possuem teores mais elevados de NQO1 e isto pode ser observado nos

experimentos de Reinicke e colaboradores (2005), pois em seus trabalhos eles determinaram a IC_{50} da β -lap em células que apresentavam alta (NQO1+) e baixa (NQO1-) expressão de NQO1 e puderam concluir que a ação da β -lap sobre as células NQO1+ foi duas vezes maior do que para as células NQO1-.

Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da β -lapachona frente a diferentes linhagens de células cancerígenas humanas.

Linhagens de células	IC_{50}	Referências
Câncer de mama (MCF-7)	0,41 μ g/mL (1,7 μ M)	NASONGKLA et al., 2003.
Câncer de mama (MDAMB-435)	0,06 μ g/mL (0,25 μ M)	SILVA-JÚNIOR et al., 2007.
Câncer de colo-retal (HCT-8)	0,20 μ g/mL (0,83 μ M)	SILVA-JÚNIOR et al., 2007.
Câncer do SNC (SF-295)	0,22 μ g/mL (0,91 μ M)	SILVA-JÚNIOR et al., 2007.
Câncer leucêmico (HL-60)	0,40 μ g/mL (1,65 μ M)	SILVA-JÚNIOR et al., 2007.

Estes resultados apontam a β -lap como um novo e potente agente quimioterápico, porém por apresentar baixa solubilidade em água, a sua aplicação terapêutica é limitada. Desta forma a utilização de compostos que aumentem sua solubilidade é uma alternativa para ultrapassar esta limitação. Neste contexto, as ciclodextrinas (CDs) podem ser utilizadas para a formação de complexos de inclusão com a β -lap.

3.2 – Ciclodextrinas

3.2.1 – Características gerais

As CDs foram descobertas há mais de 100 anos, quando em 1891 foram produzidas pela primeira vez por Villier através da digestão do amido pelo *Bacillus amylobacter* (VAN DER VEEN et al., 2000). Esta digestão é promovida pela enzima Ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) que, atualmente, pode ser obtida por diferentes microrganismos (CHAROENLAP et al., 2004; CUCOLO et al., 2006).

Apesar do trabalho pioneiro de Villiers, as CDs foram primeiramente detalhadas por Schardinger em 1903, que descreveu o processo de preparação e isolamento das mesmas. Schardinger entre 1903 e 1911 identificou a α e β -CD (VEIGA et al., 2006a).

De 1930 a 1970 foram realizados estudos sistemáticos sobre CDs. Um grupo formado por Freudenberg e outros estudiosos concluiu, na segunda metade da década de 30, que as CDs apresentam estrutura cíclica e identificaram a γ -ciclodextrina (FREUDENBERG et al., 1936). Em 1938 Freudenberg e colaboradores descobriram que as CDs apresentam uma cavidade central e seus pesos moleculares foram determinados. Cramer em 1954 descreveu a estrutura básica e características físico-químicas de α , β e γ -ciclodextrina, como, por exemplo, estrutura molecular, tamanho de cavidade, solubilidade e habilidade de formar complexos de inclusão. Ao final da década de 60, o domínio do método de preparação de CDs em escala de laboratório levou a estudos aprofundados visando particularmente suas possíveis aplicações. No entanto, a obtenção das CDs ainda apresentava custo elevado e sua utilização em humanos era discutível, uma vez que aparentemente apresentavam toxicidade elevada (SZEJTLI, 1998).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 (Fig. 4) (CHALLA et al., 2005; GRILLO et al., 2008). As CDs apresentam-se na forma de “cones truncados” com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade das CDs. A presença das hidroxilas livres na parte externa das CDs confere a essas moléculas um caráter hidrofílico (BRITTO et al., 2004). Elas apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e outra superfície externa hidrofílica que são capazes de interagir com uma ampla variedade de compostos.

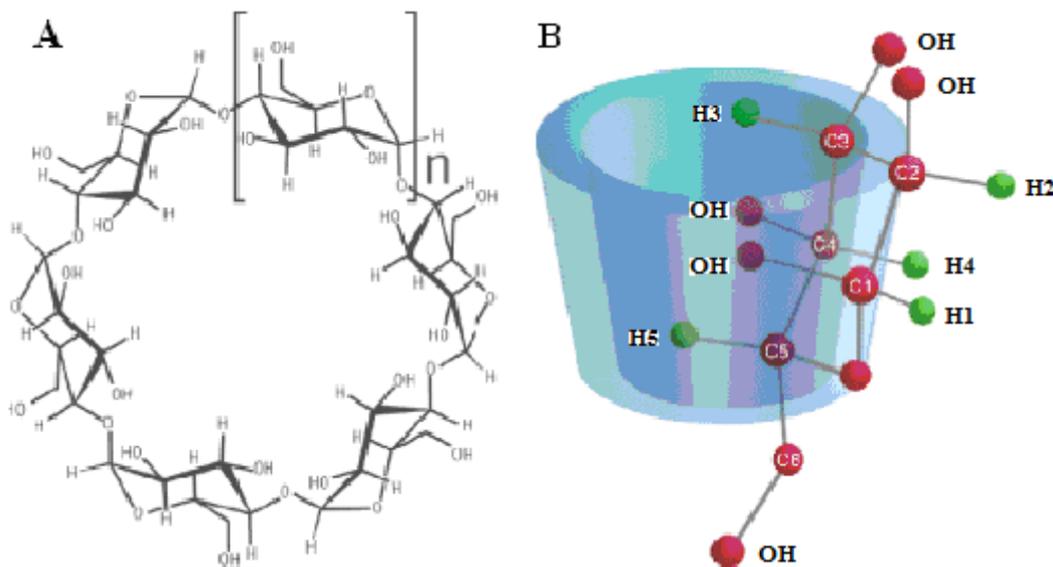


Figura 4 – Estrutura química geral das ciclodextrinas (A) e representação esquemática da estrutura tridimensional mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose (B) (Prótons representados por verde e hidroxilas em vermelho) (Disponível em: www.gerbras.com.br).

3.2.2 – Classificação das ciclodextrinas

As CDs podem ser classificadas quanto à dimensão da cavidade interna que é determinada pelo número de unidades de glicose. Segundo esta classificação existem três tipos de CDs: α , β e γ (FRACETO et al., 2007; GRAMMENOS et al., 2009). Assim, as α , β e γ CDs são classificadas como naturais e possuem seis, sete e oito unidades de glicose e diâmetro de aproximadamente 5,3, 6,5 e 8,4 Å respectivamente (Tabela 2) (Fig. 5) (DEL VALLE, 2004).

Tabela 2: Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

Propriedades	Ciclodextrinas		
	α	β	γ
Nº de unidades de glicopiranosose	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g /100 mL a 25 °C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Volume da cavidade (Å)	174	262	427
Fórmula empírica	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$

Fonte: Adaptado de SALTÃO; VEIGA, 2001.

Por muitos anos as ciclodextrinas têm sido extensivamente utilizadas como potentes agentes acentuadores da solubilidade, modificando a liberação e melhorando a biodisponibilidade de fármacos fracamente hidrossolúveis. Embora as CDs naturais sejam muito utilizadas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, elas apresentam algumas propriedades menos adequadas enquanto veículos de fármacos. Por exemplo, a β -ciclodextrina apresenta uma solubilidade aquosa bastante reduzida devido à estrutura rígida resultante da formação de pontes de hidrogênio intramoleculares entre os seus grupos hidroxilo secundários. Esta limitação incentivou o desenvolvimento de CDs quimicamente modificadas, que oferecem maior solubilidade, menor toxicidade e a possibilidade de aumentar a capacidade de inclusão dos seus derivados (HIRAYAMA; UEKAMA, 1999; DUCHÊNE et al., 1999; CALABRÒ et al., 2004; VEIGA et al., 2006a). Depois desta observação, vários derivados das CDs surgiram como, por exemplo, derivados hidroxipropil da β e γ -ciclodextrina.

Veiga (1996) referiu a obtenção dos derivados das ciclodextrinas com grupos metila, etila, carboximetila, hidroxietila, hidroxipropila, dentre outros. Porém, foi descoberto que a substituição de alguns grupamentos hidroxil, como a função metoxi, resultou em aumento significativo na sua solubilidade aquosa e desta forma o derivado de CDs que tem sido mais utilizado é a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD). Esta CD possui atenção especial pela sua alta solubilidade, baixa toxicidade e maior cavidade hidrofóbica em comparação as outras ciclodextrinas da mesma família, fazendo desta CD uma forte candidata para utilização em formulações farmacêuticas (MISIUK; ZALEWSKA, 2009).

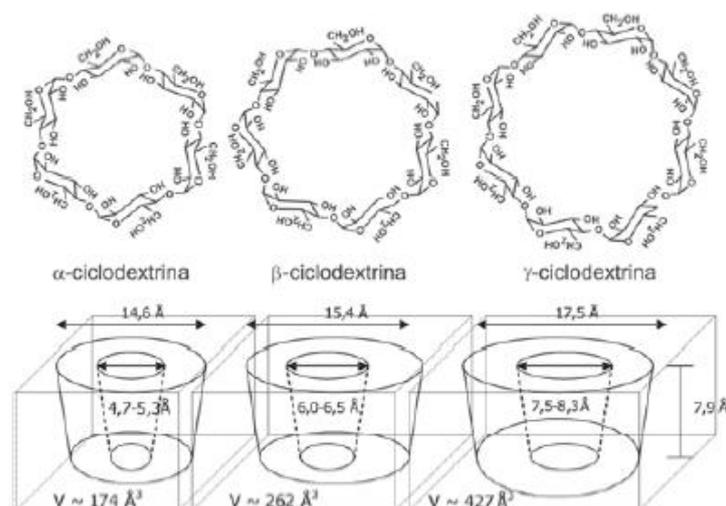


Figura 5 – Estrutura molecular e dimensões da cavidade das CDs α , β e γ (VENTURINI et al., 2008).

3.2.3 – Complexos de inclusão com ciclodextrinas

Devido à sua estrutura peculiar, as CDs podem ser consideradas cones abertos em ambas as extremidades, o que lhes permite a inclusão de uma enorme variedade de moléculas hóspedes, na sua cavidade central hidrofóbica (ZHANG et al., 2009), formando assim complexos de inclusão com vários compostos hidrofóbicos (DAVIS; BREWSTER, 2004). Os complexos de inclusão são formados por duas ou mais moléculas onde uma delas, a hospedeira, inclui total ou parcialmente uma molécula hóspede, sem o estabelecimento de ligações covalentes (VEIGA et al., 2006b). O complexo obtido exibe novas características físico-químicas quando comparadas às moléculas livres. A formação deste complexo proporciona uma melhoria na estabilidade, maior hidrossolubilidade e maior biodisponibilidade do composto utilizado como princípio ativo (BOUDAD et al., 2001; DUCHÊNE et al., 1999). Nestes complexos a molécula hóspede, isto é, a substância hidrofóbica, se aloja na cavidade interna hidrofóbica das ciclodextrinas (DEL VALLE, 2004).

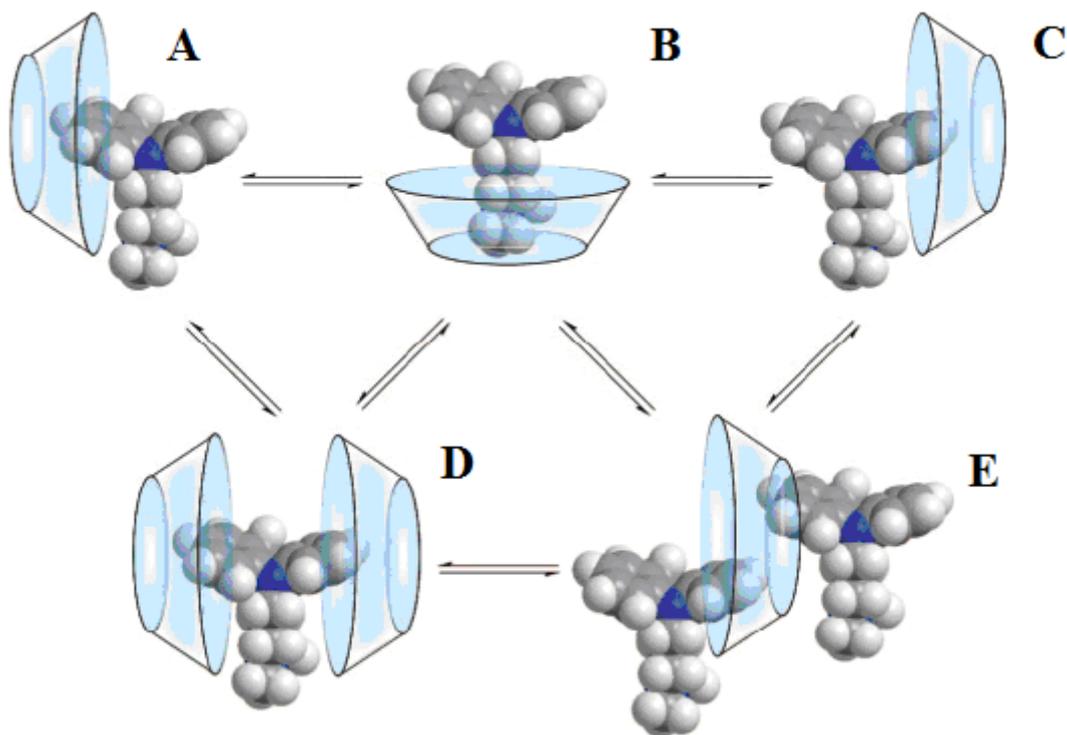


Figura 6 – Ilustração da associação entre a β -ciclodextrina e o cloridrato de imipramina (A, B e C: complexos de inclusão 1:1; D: complexos de inclusão 2:1; E: complexos de inclusão 1:2) (SOUSA et al., 2008).

Quanto à estequiometria do complexo de inclusão, são considerados quatro tipos mais comuns de complexo CD:substrato com 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2, dependendo do

tamanho e aspecto estrutural do substrato em relação à cavidade da CD (VENTURINI et al., 2008). Os diferentes tipos de complexos surgem das diferenças que o substrato em potencial apresenta para se adaptar à cavidade da CD e este ajuste espacial é considerado o fator mais importante para reger o processo de complexação (HARATA, 1998). Desta forma, para moléculas pequenas é mais fácil formar complexos com α - e β -CD devido à compatibilidade do volume do substrato e da CD. Um exemplo das possibilidades de formação de complexos de inclusão de cloridrato de imipramina com a β -ciclodextrina é apresentado na figura 6.

As extremidades da cavidade da CD isolada são abertas de tal forma que o substrato pode entrar no anel da CD por ambos os lados. Em solução aquosa, a cavidade levemente apolar é ocupada por moléculas de água que são energeticamente menos favoráveis que moléculas apolares, dada a natureza da interação polar-apolar e, portanto, podem ser facilmente substituídas por um substrato que seja menos polar que a água (VEIGA et al., 2006b). Considera-se que a força motriz para a complexação seja a substituição das moléculas de água de alta entalpia por substratos apropriados, desta forma a polaridade dos compostos é um fator condicionante da formação do complexo (SZEJTLI, 1998) (Fig. 7).

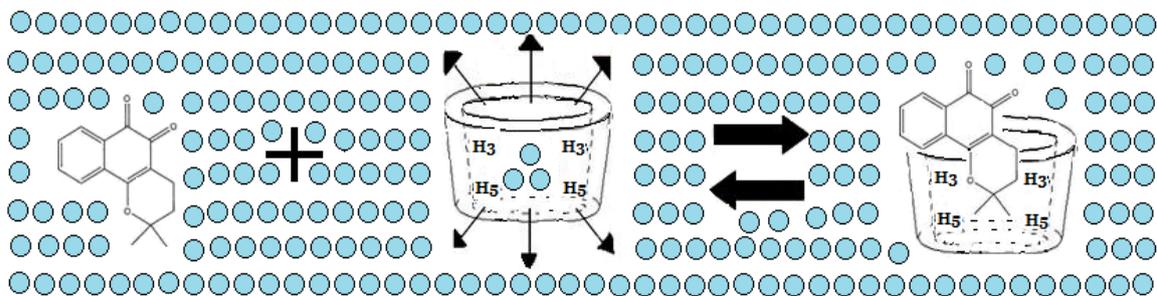


Figura 7 – Representação esquemática da formação do complexo de inclusão (Molécula hóspede: β -lapachona e círculos azuis: moléculas de água) (Adaptado de VEIGA et al., 2006b).

A formação de complexos de inclusão altera significativamente as características do substrato, como por exemplo, melhoria na solubilidade de compostos, estabilização de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação, proteção da degradação de substâncias por microorganismos, mascaramento de corantes ou pigmentos e fixação de substâncias muito voláteis. As conseqüências diretas mais importantes da inclusão de um substrato por uma CD em água são relativas ao aumento da solubilidade do substrato na solução (VENTURINI et al., 2008).

3.2.4 – Métodos de preparação dos complexos de inclusão

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

Co-evaporação: neste método a CD e o fármaco são solubilizados em uma mistura de água e solvente miscível na água. A solução permanece sob agitação constante e em seguida é levada à rota-evaporador para que o solvente seja retirado. O complexo obtido é seco à vácuo a temperatura ambiente (MANOLIKAR; SAWANT, 2003).

Co-precipitação: neste método a CD é solubilizada em água e o fármaco em solvente orgânico adequado. Após completa solubilização, os dois compostos são misturados e permanecem sob temperatura e agitação constantes. Em seguida a solução é resfriada a temperatura ambiente; o precipitado obtido é filtrado e lavado com solvente para a remoção do fármaco que não foi complexado. O precipitado é seco a vácuo a temperatura ambiente (MANOLIKAR; SAWANT, 2003; DEVARAKONDA et al., 2005).

Freeze-Drying: complexos de inclusão seguindo-se este método são obtidos com a completa solubilização da CD em água e posterior adição do fármaco na solução de CD. A mistura permanece sob agitação constante durante certo tempo, em seguida é congelada e a água é retirada por liofilização (BARBATO et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003; ZIGONE; RUBESSA, 2005). Este método tem como grande vantagem a possibilidade de ser utilizado tanto em escala laboratorial como em escala industrial.

3.2.5 – Métodos de caracterização dos complexos de inclusão

As propriedades físico-químicas do fármaco e da CD livre são relativamente diferentes das que possuem estes compostos quando estão complexados. São muitas as

metodologias que podem ser utilizadas para a investigação dos complexos de inclusão, apresentando todas elas características próprias que permitem não só detectar a formação do complexo de inclusão, como também conhecer a sua estrutura química e interações que se estabelecem entre os diferentes componentes que o constituem. Partindo deste conceito, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente para medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar estes complexos. Os métodos de caracterização mais utilizados são: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN H^1), Análise Termogravimétrica (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV), Difração de raio-X em pó e Espectroscopia Raman. Além destes métodos de caracterização dos complexos de inclusão, existe ainda o estudo de solubilidade de fases e a eficiência de complexação (VEIGA et al., 2006c).

3.2.5.1 – Estudo de solubilidade de fases

A solubilidade aquosa é um dos determinantes chaves no desenvolvimento de novas entidades químicas como, por exemplo, os fármacos. As CDs estão sendo utilizadas em várias formulações para compensar a baixa solubilidade e conseqüente baixo nível de dissolução dos fármacos.

A maioria dos compostos lipofílicos forma complexos de inclusão 1:1 fármaco/CD onde uma molécula do fármaco se complexa com uma de CD e esta relação é obtida através do estudo de solubilidade de fases (LOFTSSON et al., 2005).

A teoria desenvolvida por Higuchi e Connors em 1965 para o estudo de solubilidade de fases baseia-se na medição do efeito de complexação na solubilidade da molécula hóspede e permite fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar uma constante relacionada com o grau de estabilidade do complexo formado. O estudo de solubilidade é realizado experimentalmente com adições de concentrações crescentes de ciclodextrinas a uma quantidade em excesso da molécula hóspede. A capacidade das ciclodextrinas de aumentar a solubilidade dos fármacos em água é avaliada por intermédio do diagrama de solubilidade de fases. Segundo esta teoria, se classificam como perfis do tipo A (aumento na solubilidade), quando a solubilidade da molécula hóspede aumenta com o incremento da concentração de CD. Perfis do tipo B (queda da solubilidade) são obtidos com a formação de complexos de baixa solubilidade aquosa, em alguns casos, inclusive inferior à da molécula hospedeira e que precipitam à medida que há encapsulação. Estes dados do gráfico permitem calcular a estequiometria e a constante de associação ($K_{1:1}$) das curvas formadas (Fig. 8) que são utilizadas para

comparar as afinidades dos fármacos a diferentes CDs.

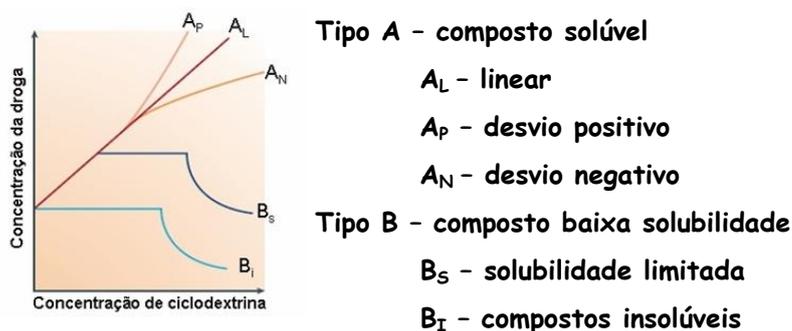


Figura 8 – Perfis de solubilidade segundo a teoria de Higuchi e Connors (Adaptado de DAVIS; BREWSTER, 2004).

3.2.5.2 – Eficiência de complexação

Sabe-se que em solução aquosa as CDs podem formar complexos de inclusão onde a molécula de água se localiza na posição externa da molécula e o fármaco hidrofóbico na cavidade da CD (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

A eficiência de complexação (CE) também revela a afinidade dos fármacos a diferentes CDs. Se CE é 0,1 então 1 a cada 11 moléculas de CD formam complexos com o fármaco e se CE é 0,01 então só 1 a cada 100 CD formam o complexo (LOFTSSON et al., 2005).

3.2.5.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN H^1)

Em sistema aquoso, a formação do complexo de inclusão com a CD pode ser detectada através de análise por RMN H^1 . Esta técnica fornece informações estruturais únicas sobre estequiometria, constantes de estabilidade e orientação molecular do fármaco dentro da cavidade da CD (FIELDING, 2000). A modificação nos sinais da CD é consequência direta das alterações causadas pela associação com o substrato, que altera o microambiente ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade. Da mesma forma, o substrato incluído também sofre alteração na leitura dos sinais correspondentes aos átomos que penetram na cavidade da CD, a qual constitui um microambiente diferente daquele em que ele estava originalmente solvatado.

3.2.5.4 – Análise Termogravimétrica (TG)

Análise Térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo, enquanto a temperatura da amostra, sob uma

atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada. Existem vários tipos de análise térmica, dentre eles a Análise Termogravimétrica (TG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A TG permite determinar as perdas de massa que se produzem nos compostos quando são submetidos a um aumento de temperatura. Este método determina as alterações de massa que ocorrem durante o processo (VEIGA et al., 2006c).

3.2.5.5 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Calorimetria exploratória diferencial é uma técnica na qual a diferença entre a quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de uma amostra e da referência são medidas em função da temperatura.

A DSC é utilizada como método de rotina para investigações qualitativas preliminares e rápidas, por avaliação do comportamento térmico dos componentes isolados, mistura física e respectivos complexos (GIORDANO et al., 2001). A finalidade da utilização desta metodologia analítica consiste na comparação dos perfis térmicos resultantes das misturas físicas de fármacos e CD com os perfis resultantes dos respectivos complexos, para que seja evidenciada ou não a ocorrência da inclusão do fármaco na cavidade da CD. Na ausência de qualquer tipo de interação entre o fármaco e CD, as curvas de DSC resultantes deverão corresponder ao somatório das curvas de DSC dos componentes individuais. Na eventualidade da ocorrência de interações entre fármaco e CD nos produtos obtidos pelas várias manipulações, as curvas de DSC deverão apresentar um perfil não coincidente com o somatório dos efeitos observados nos termogramas dos componentes isolados. Isto porque, quando uma molécula hóspede é incluída na cavidade de uma CD, os seus pontos de fusão e ebulição sofrem um deslocamento para temperaturas diferentes ou desaparecem no intervalo de temperaturas anterior à decomposição da respectiva CD (CABRAL MARQUES et al., 1990).

A DSC permite também determinar o calor absorvido ou liberado pela amostra a uma temperatura programada. Estas variações de calor resultam das alterações que se produzem num composto e que desaparecem quando está incluído numa CD (VEIGA et al., 2006c).

3.2.5.6 – Espectroscopia por Infravermelho (IV)

A IV é uma metodologia analítica que pode ser utilizada na avaliação da ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido. Contudo, este método apresenta algumas limitações no estudo da formação de complexos de inclusão

(VEIGA et al., 2006c). As bandas de absorção características da CD, que representa a maioria das bandas de absorção dos complexos, são pouco influenciadas pela complexação. Por sua vez, as bandas de absorção do fármaco representam desvios para maiores ou menores valores, acompanhadas de uma diminuição de intensidade, mas a proporção de fármaco raramente excede os 15% da massa dos complexos, por isso estas alterações são frequentemente pouco perceptíveis (SZEJTLI, 1998).

3.2.5.7 – Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que proporciona, em poucos segundos, informação química e estrutural de quase qualquer material, composto orgânico ou inorgânico permitindo assim sua identificação.

A espectroscopia Raman é uma técnica amplamente utilizada para a caracterização de materiais contendo carbono, identificando os tipos de ligações e fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina. Com recursos de microfocalização, as investigações são bastante precisas, identificando as diferentes formas cristalinas e amorfas que podem compor as amostras. De acordo com as suas possíveis aplicações, uma precisa caracterização dos materiais contendo carbono se faz necessária, de preferência por métodos não destrutivos, com análises não somente quanto a sua heterogeneidade, mas também quanto a sua forma estrutural (LOBO et al., 2005).

3.2.6 – Aplicação das ciclodextrinas

As CDs estão sendo utilizadas nas mais variadas áreas dentre elas, na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (VENTURINI et al., 2008). Na indústria alimentícia ela reduz odores e sabores indesejáveis, na cosmética ela diminui irritação local, propicia ação prolongada e também diminui odores e na farmacêutica ela é muito utilizada para aumentar a solubilidade de fármacos fracamente hidrossolúveis e aumentar também a estabilidade (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

As ciclodextrinas são conhecidas por permitirem a incorporação molecular de fármacos com características hidrofóbicas, alterando-lhes a solubilidade e, em alguns casos, melhorando a biodisponibilidade. Porém a estrutura química da ciclodextrina, seu peso molecular (>972 Da) e seu baixo coeficiente de partição são características que tornam este composto pouco permeável as membranas biológicas (LIPINSKI et al., 2001). Além disso, a capacidade destes complexos funcionarem como sistemas de vetorização de fármacos por si só é inexistente (FERNANDES et al., 2007). Desta

forma a utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos seria uma alternativa para ultrapassar estas limitações.

3.3 – Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

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

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou de outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada (DAS; DAS, 2003). Uma ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica (PIMENTEL et al., 2007).

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

O principal objetivo de uma forma farmacêutica de liberação controlada é manter constante a concentração plasmática do fármaco na faixa terapêutica, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento como a falta de efetividade (dose subterapêutica) ou efeitos tóxicos da substância ativa (Fig. 9).

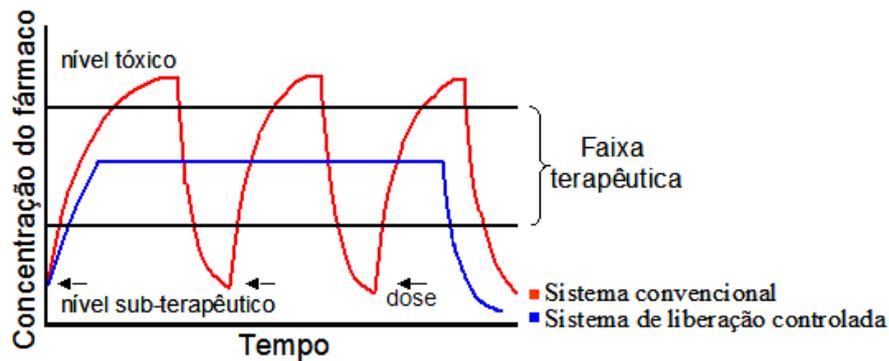


Figura 9 – Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada ou sustentada de fármacos (LIRA, 2007).

As principais vantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos são (GULATI et al., 1998; TORCHILIN, 2005; PIMENTEL et al., 2007):

- Promover a vetorização do fármaco;
- Proteger o conteúdo encapsulado;
- Manter os níveis plasmáticos do fármaco em concentração constante;
- Reduzir o número de administrações do fármaco;
- Reduzir a toxicidade devido a menor liberação do princípio ativo em tecidos saudáveis;
- Melhor adesão do paciente à terapêutica;
- Otimizar a dose terapêutica;
- Possibilitar a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos lipossomas;
- Promover liberação controlada do princípio ativo ao longo do tempo.

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

3.3.1 – Lipossomas

Alec Bangham há mais de 40 anos com sua observação pioneira de que fosfolípidos em soluções aquosas podem formar estruturas fechadas em bicamadas, permitiu que a pesquisa relacionada aos lipossomas percorresse um longo caminho,

convertendo-os de simples objetos de pesquisa biofísica em carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas (TORCHILIN, 2005). Imediatamente após o trabalho de Bangham, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica (SANTOS; CASTANHO, 2002). Na década de 70, Gregory Gregoriadis começou a investigar a capacidade de encapsulação de fármacos por vesículas lipossomais e sua posterior liberação e propôs pela primeira vez a utilização de lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área. (FRÉZARD et al., 2005).

Os lipossomas, descobertos em 1963, consistem de esferas microscópicas de tamanhos variados (em escalas de nm e μ m) com uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimento aquoso (TORCHILIN, 2005) (Fig. 10). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na bicamada (GILLET et al., 2009). Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa e aplicações terapêuticas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolípeos e esteróis (VEMURI; RHODES, 1995). Os fosfolípeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam forma cilíndrica como a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélna, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas nas preparações lipossomais, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA et al., 2007). Os fosfolípeos são substâncias graxas de origem natural ou sintética; sendo os principais componentes das membranas celulares apresentando a capacidade de auto-organização quando em soluções. Portanto, os lipossomas são compostos por uma porção hidrofílica (cavidade interna aquosa) e outra hidrofóbica (bicamada lipídica) (FATTAL et al., 1993; VEMURI; RHODES, 1995; LIRA, 2007).

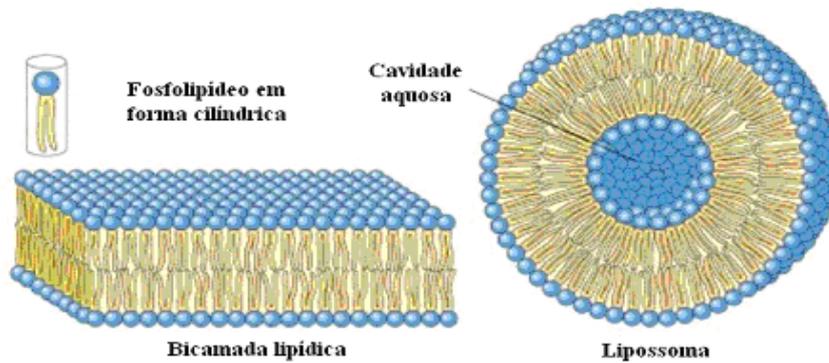


Figura 10 – Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma (Adaptado de: NELSON; COX, 2006).

3.3.2 – Classificação dos lipossomas

3.3.2.1 – Quanto ao número de lamelas e tamanho das vesículas

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente. Quanto ao tamanho e número de lamelas, podem ser classificados como vesículas multilamelares grandes (MLV - multilamellar large vesicles) que são lipossomas de tamanho em escala micrométrica que possuem vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados; vesículas unilamelares grandes (LUV - large unilamellar vesicles) que são lipossomas de tamanho em escala de micrômetros possuindo um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica); e os lipossomas em escala nanométrica que possuem um compartimento interno aquoso e um lipofílico que são classificados como vesículas unilamelares pequenas (SUV - small unilamellar vesicles) (Fig. 11) (BATISTA et al., 2007).

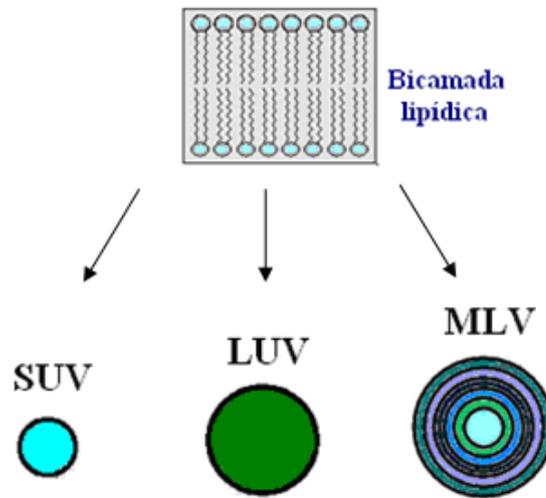


Figura 11 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas (Adaptado de: DANIELS, 2009).

3.3.2.2 – Quanto à composição química

De acordo com a composição química os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos ou Stealth[®], sítio-específicos e catiônicos (Fig. 12).

Lipossomas convencionais são compostos de fosfolípídeos e colesterol, além de um lípídeo com carga negativa ou positiva para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade em suspensão. *In vivo* os lipossomas convencionais são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, e conseqüentemente removidos da circulação; essa captura está diretamente relacionada ao tamanho das vesículas e sua superfície hidrofóbica, o que resulta em uma curta permanência desses lipossomas na corrente sanguínea após o contato com componentes do sangue (VEMURI; RHODES, 1995; PINTO-ALPHANDARY et al., 2000; BATISTA et al., 2007). Devido a essa alta captura pelo sistema retículo-endotelial, os lipossomas convencionais são potentes candidatos a carrear fármacos que vão agir nos macrófagos. Por outro lado, a rápida eliminação dos lipossomas convencionais da circulação pelos macrófagos, compromete a aplicação desses lipossomas no tratamento de várias patologias.

Os lipossomas furtivos, conhecidos também como “Stealth[®]”, têm a capacidade de diminuir a ação fagocítica do sistema retículo-endotelial. Lipossomas de longa duração são obtidos por diferentes métodos, incluindo o revestimento da superfície lipossomal com componentes hidrofílicos naturais como o fosfatidilinositol, ou de polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) (TORCHILIN, 2005). A camada hidrofílica superficial destes polímeros aumenta o

tempo de circulação dos lipossomas prevenindo o reconhecimento e conseqüente associação com as opsoninas no plasma, desse modo, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente as células de Kupffer no fígado (NEEDHAM et al., 1992; ABU LILA et al., 2009; LI et al., 2009).

Na tentativa de aumentar a especificidade de interação de lipossomas com células alvo e elevar a quantidade do fármaco liberado nestas células, a pesquisa neste campo foi focada no desenvolvimento de lipossomas direcionados ou sítio-específicos. Estes últimos utilizam ligantes acoplados em sua superfície, que conferem seletividade para distribuir o fármaco encapsulado no sítio de ação desejado (SAPRA; ALLEN, 2003). Alguns exemplos de ligantes de reconhecimento são os anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas virais e lectinas. Estes constituintes são ligados covalentemente a superfície dos lipossomas a fim de carregá-lo para o local específico de ação (BATISTA et al., 2007; EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Os lipossomas catiônicos, como o nome sugere, são lipossomas que apresentam carga positiva na superfície e são utilizados para terapia gênica. Os lipídios catiônicos interagem com o DNA, que possui carga negativa (LIRA, 2007).

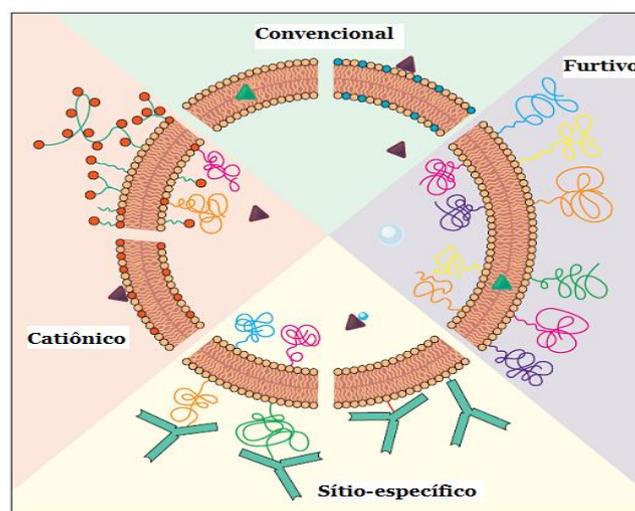


Figura 12 – Características estruturais de lipossomas: convencionais, furtivos ou Stealth[®], sítio-específicos e catiônicos (Adaptado de LASIC, 1996).

3.3.3 – Método de preparação dos lipossomas

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

No método da hidratação do filme lipídico, os lipídeos são solubilizados em solvente orgânico, em seguida, forma-se o filme lipídico pela evaporação do(s) solvente(s). Então, a fase aquosa é adicionada ao balão formando espontaneamente as vesículas. O diâmetro médio dos lipossomas obtidos por esse método é bastante elevado sendo apropriado para produzir MLVs (FATTAL et al., 1993; WATWE; BELLARE, 1995; 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 (FATTAL et al., 1993; WATWE; BELLARE, 1995; ANDRADE et al., 2004).

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

3.3.4 – Câncer e aplicações farmacêuticas dos lipossomas

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), constatou-se que anualmente 10 milhões de casos de câncer são diagnosticados em todo o mundo e seis milhões de pessoas morrem devido a esta patologia.

No Brasil, o câncer já figura como a segunda causa de morte na população, precedido apenas pelas doenças cardiovasculares. As estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (INCA, 2009).

Apesar das melhorias no tratamento do câncer, os regimes quimioterápicos existentes, que usam agentes citotóxicos clássicos, têm as limitações óbvias, que inclui um índice terapêutico estreito que não permite a administração de uma quantidade adequada do fármaco a fim de induzir a resposta pretendida. Além disso, os tratamentos convencionais (radioterapia e quimioterapia) não garantem que as células normais não sejam atingidas pelos fármacos não seletivos (NISHIYAMA et al., 2009). Portanto o desenvolvimento de novas terapêuticas eficazes com efeitos colaterais mínimos dos quimioterápicos e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes são os objetivos de estudo da comunidade científica na área de cancerologia. Neste contexto, os lipossomas podem contribuir para a terapêutica do câncer, já que esta patologia ainda apresenta

limitações quanto ao seu tratamento, como por exemplo, os efeitos colaterais e as repetidas administrações.

Atualmente há no mercado vários fármacos antineoplásicos encapsulados em lipossomas como o Doxil[®] (lipossomas de doxorubicina) e DaunoXome[®] (lipossomas de daunorrubicina) que já são amplamente utilizados clinicamente (TORCHILIN, 2006). Segundo Ferrari (2005) algumas formulações lipossomais foram aprovadas para o tratamento do câncer de mama metastático e sarcoma de Kaposi.

Estudos clínicos de fase I do Doxil[®] e de avaliação antitumoral deste medicamento em pacientes com tumores sólidos revelaram uma mudança importante no perfil de toxicidade da doxorubicina, caracterizada por toxicidade mucocutânea dose dependente, mielossupressão leve, alopecia mínima e não apresentou toxicidade cardíaca aparente (clínica e funcional) (UZIELY et al., 1995).

Em estudos clínicos de fase II realizados por Muggia e colaboradores (1997) foi possível observar que o Doxil[®] não induziu náuseas, perda de cabelo ou necrose extravasante. Os lipossomas contendo doxorubicina apresentaram toxicidade mínima e atividade significativa contra o câncer de ovário.

Gordon e colaboradores (2001), em estudos clínicos de fase III, observaram que o Doxil[®] é uma opção para o tratamento de pacientes com carcinoma epitelial de ovário já que eles observaram um perfil de segurança favorável e uma dosagem conveniente da doxorubicina para o tratamento desta patologia.

Estudos clínicos de fase I/II realizados por Gill e colaboradores (1995) revelaram que o DaunoXome[®] apresenta melhor perfil farmacocinético em comparação a daunorrubicina livre. O DaunoXome[®] foi bem tolerado pelos pacientes e apresentou atividade antitumoral significativa em pacientes com Sarcoma de Kaposi. Em 1996, Gill e colaboradores realizaram estudos clínicos de fase III do DaunoXome[®] em pacientes com Sarcoma de Kaposi. Eles observaram que o tratamento com lipossomas contendo daunorrubicina foi comparável ao regime de referência para o tratamento desta patologia (doxorubicina, bleomicina e vincristina). Desta forma, DaunoXome[®] se mostrou uma terapia eficaz e segura para o tratamento do Sarcoma de Kaposi.

4.0 – METODOLOGIA

4.1 – Material

A β -lapachona, obtida através de semi-síntese, foi gentilmente fornecida pelo Dr. Amorim (UFRPE). Fosfatidilcolina de soja (PC) (98% Epikuron 200[®]) foi obtida de Lucas Meyer (Hamburgo, Alemanha). Colesterol (CH), estearilamina (SA) e 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA). Clorofórmio (CHCl₃), metanol (MeOH) e etanol (CH₃CH₂OH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.2 – Estudo de solubilidade de fases

O estudo de solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método de Higuchi e Connors (1965). A β -lapachona foi adicionada em excesso a soluções aquosas contendo concentrações diferentes de HP β -CD. As suspensões foram mantidas sob agitação por 48 h a 25 °C. As amostras foram diluídas e a quantidade de β -lapachona foi determinada por espectrofotometria UV em 256 nm. O diagrama de solubilidade de fases foi obtido a partir da concentração da β -lapachona em função da concentração de HP β -CD. Os dados foram analisados por regressão linear e a equação da reta ajustada $[\beta\text{-lap}] = a [\text{HP}\beta\text{-CD}] + b$, onde a e b correspondem à inclinação e a ordenada na origem, respectivamente, foi utilizada para o cálculo da constante de associação ($K_{1:1}$), considerando uma relação molar na formação do complexo β -lap:HP β -CD e a solubilidade da β -lapachona em água na ausência da HP β -CD (S_0), pela seguinte fórmula:

$$K_{1:1} = a / [(S_0) (1 - a)]$$

A eficiência de complexação (CE) da β -lap foi determinada a partir de dados do estudo de solubilidade de fases de acordo com a equação abaixo (LOFTSSON et al., 2005):

$$CE = a / (1 - a)$$

4.3 – Obtenção e caracterização dos complexos de inclusão β -lap:HP β -CD

Os complexos foram preparados pelo método de liofilização, *Freeze-Drying*, que consiste na completa solubilização da ciclodextrina em água destilada e posterior adição da β -lap solubilizada em etanol (CUNHA-FILHO et al., 2007a). A suspensão permanece sob agitação a temperatura ambiente por 48 horas, em seguida congelada em

nitrogênio líquido e mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até realização da liofilização (72h). Os complexos foram obtidos utilizando-se concentrações equimolares (1:1) da β -lap e da HP β -CD. Após obtenção dos complexos de inclusão foi realizada a quantificação da β -lap nestes complexos. Uma amostra do complexo foi pesada e solubilizada em metanol. Em seguida as amostras foram quantificadas por espectrofotometria a 256 nm (Ultrospec[®] 300, Amsham Pharmaceutical). A caracterização físico-química dos complexos de inclusão foi realizada pelas seguintes técnicas: ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TG), espectroscopia de infravermelho (IR) e espectroscopia Raman. A modelagem molecular dos complexos de inclusão também foi realizada.

4.4 – Encapsulação da β -lapachona ou complexo de inclusão β -lap:HP β -CD em lipossomas

Os lipossomas foram preparados utilizando-se a técnica de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Fosfatidilcolina, colesterol, estearilamina e a β -lapachona foram pesados e solubilizados em uma mistura de solventes orgânicos, sob placa de agitação magnética (fase orgânica). A mistura foi submetida à evaporação a vácuo para eliminação do solvente orgânico. Para a hidratação do filme lipídico foi utilizado tampão fosfato em pH 7,4. No fim desta etapa, dispõe-se já de uma suspensão de Lipossomas Multilamelares (MLV). Para a obtenção de Lipossomas Unilamelares (SUV) as suspensões de MLV foram sonicadas em sonda de ultrassom (Bioblock Cientific – Vibra Cell[®]) por 300s. A formulação contendo o complexo de inclusão foi preparada de maneira semelhante substituindo a β -lapachona na fase orgânica pelo complexo β -lap:HP β -CD dissolvido na fase aquosa.

4.5 – Avaliação da estabilidade acelerada e a longo prazo das formulações

Para avaliar a estabilidade acelerada, as formulações lipossomais foram submetidas à centrifugação (6000rpm, 1h, 4°C) e agitação mecânica (180 agitações/min, 48 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para avaliar a estabilidade a longo prazo os parâmetros utilizados foram: aspecto macroscópico, pH, tamanho de partícula e índice de polidispersibilidade. O tamanho de partícula dos lipossomas foi determinado utilizando um analisador de partículas Beckman Coulter DelsaTM Nano S. A carga de superfície (potencial zeta) foi avaliada pelo Zetatrac NC-148, Microtrac.

4.6 – Doseamento da β -lapachona nos lipossomas

Após obtenção de lipossomas, foram selecionadas as formulações mais estáveis a fim de determinar a quantidade de β -lapachona incorporado. O teor da β -lapachona nos lipossomas foi quantificado por espectrofotometria a 256 nm.

4.7 – Determinação da eficiência de encapsulação

A quantidade de β -lap encapsulada foi determinada através da técnica de ultrafiltração-centrifugação. Os lipossomas foram filtradas em unidades ultrafree[®] (Millipore) sob centrifugação a 10.000 rpm por 1 hora à 4 °C. A quantidade de β -lap encapsulada foi obtida por diferença entre a quantidade total dosada na formulação e aquele no filtrado obtido após centrifugação. As leituras foram realizadas por espectrofotometria UV no $\lambda = 256$ nm.

4.8 – Cinética de liberação *in vitro* da β -lapachona a partir dos lipossomas

A cinética de liberação *in vitro* da β -lapachona a partir de lipossomas foi realizada pelo método de diálise (SANTOS et al., 2005). Uma alíquota de lipossomas foi depositada em membranas de diálise hermeticamente fechadas e as membranas foram distribuídas em um meio receptor constituído por tampão fosfato pH 7,4. O sistema foi deixado sob agitação constante a temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e em tempos predeterminados 1mL do meio era retirado e a β -lap era quantificada por espectrofotometria a 256 nm. A mesma quantidade de tampão era reposta no sistema receptor para manter as condições sink.

5.0 – RESULTADOS

5.1 – ARTIGO 1 (Submetido ao International Journal of Pharmaceutics)

Enhancement of β -lapachone solubility in inclusion complex and liposomal formulations

Isabella M. F. Cavalcanti^a, Elisângela A. M. Mendonça^{a,b}, Sara B. Honrato^c, Celso Amorim^d, Rosa V. S. Amorim^e, Josué Mendes Filho^c, Marcelo M. Rabello^f, Marcelo Z. Hernandez^f, Alejandro P. Ayala^c and Nereide S. Santos-Magalhães^{a,*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Recife-PE, Brazil

^bUniversidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, João Pessoa-PB, Brazil

^cDepartamento de Física, Universidade Federal do Ceará (UFC), 60455-760, Fortaleza-CE, Brazil

^dUniversidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brazil

^eUniversidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Biológicas, João Pessoa-PB, Brazil

^fUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Química Teórica Medicinal, Recife-PE, Brazil

*Corresponding author:

Dr. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

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

50670-901, Recife, PE, Brazil

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

E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the enhancement of β -lapachone (β -lap) solubility in the 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (β -lap:HP β -CD), to characterize the complex using molecular modeling and to analyze its behavior when encapsulated into liposomes. A phase solubility study of β -lap in HP β -CD was performed and the β -lap:HP β -CD was prepared by the freeze-drying technique. A 302-fold increase of solubility was achieved for β -lap in HP β -CD solution with a constant of association $K_{1:1}$ of 961 M^{-1} . $^1\text{H-NMR}$, TG, DSC, IR and Raman indicated a change in the molecular environment of β -lap in the inclusion complex. The interaction energy of β -lap:HP β -CD inclusion complex was $-23.67 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. The results suggest that β -lap was included in the cavity of HP β -CD by replacing inside water, confirmed by molecular modeling studies. β -lap:HP β -CD and β -lap-loaded liposomes presented encapsulation efficiencies of 93% and 97%, respectively. The kinetic rate constants of $183.95 \pm 1.82 \text{ }\mu\text{g/h}$ and $216.25 \pm 2.34 \text{ }\mu\text{g/h}$ were calculated for β -lap and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes, respectively. The encapsulation of the β -lap and β -lap:HP β -CD into liposomes could provide an alternative means of overcoming β -lapachone low solubility, leading eventually to its clinical use in cancer therapy.

Keywords: β -lapachone; 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin; inclusion complex; molecular modeling; liposomes; kinetics

1. Introduction

β -lapachone (β -lap) is a natural *ortho*-naphthoquinone (Fig. 1) obtained from the bark of the *Tabebuia avellanedae* of the family Bignoneaceae (Silva-Júnior et al., 2007), a native tree originating in South America and found particularly in Brazil. β -lap has been shown to have a variety of pharmacological effects (Guiraud et al., 1994; Andrade-Neto et al., 2004), but the major concern regarding this molecule is the fact that it presents significant cytotoxic effects by inducing apoptosis in human cancer cells, particularly in the lung (Woo and Choi, 2005; Blanco et al., 2007), prostate (Li et al., 1995; Choi et al., 2003; Blanco et al., 2007), pancreas (Ough et al., 2005), breasts (Pink et al., 2000) and ovaries (Li et al., 1999). Several studies have suggested that β -lap could directly target DNA topoisomerases and inhibit their activity (Li et al., 1993; Li et al., 1995; Li et al., 2000; Pardee et al., 2002) without causing any damage to DNA (Pardee et al., 2002). The therapeutic use of β -lap remains limited to some extent, mainly due to its poor water solubility (0.16 mM) (Nasongkla et al., 2003).

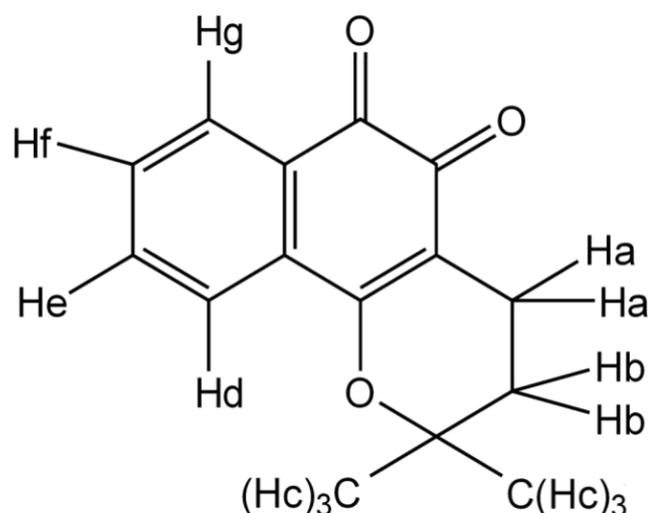


Fig. 1. Chemical structure of β -lapachone ($C_{15}H_4O_3$).

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides able to form a stable inclusion complex with several drugs (Davis and Brewster, 2004). For many years the cyclodextrins and their hydrophilic derivatives have been described in the literature as solubilizers for several drugs forming host-guest inclusion complexes (Duchêne et al., 1999). On the other hand, entrapping drug complexes into drug delivery systems such as liposomes restrains *in vivo* dissociation of the drug complex, thereby contributing to improvements in the pharmacokinetic profile of the drugs (McCormack and Gregoriadis, 1998; Loftsson and Duchêne, 2007).

Liposomes are vesicles that consist of one or more concentric phospholipidic bilayers organized around an aqueous inner compartment. They are carriers of drugs, biomolecules and diagnostic agents (Torchilin, 2006). Liposomal formulations have shown an ability to enhance the pharmacokinetics and pharmacodynamics of associated anticancer drugs (Sapra et al., 2005). To date, liposome-based formulations of several anticancer agents have been approved for the treatment of metastatic breast cancer and Kaposi's sarcoma (Ferrari, 2005).

Taking into account all these findings, the aim of the present research is to investigate more deeply the solubility of β -lap in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β -CD). Furthermore, the preparation and characterization of the β -lap inclusion complex with HP β -CD (β -lap:HP β -CD) through the intermolecular interaction energy using the molecular modeling approach were performed. The encapsulation efficiency of the β -lap:HP β -CD inclusion complex in liposomes and the *in vitro* release kinetics of β -lap are also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β -lapachone, obtained by the semi-synthetic route, was supplied by Dr. Amorim (UFRPE, Brazil). Cholesterol (CHOL), trehalose, stearylamine (SA) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β -CD) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); soybean phosphatidylcholine (SPC) (98% Epikuron 200[®]) was obtained from Lucas Meyer (Hamburg, Germany). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Methodology

2.2.1. Phase-solubility study of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin solutions

A phase-solubility assay of β -lap in HP β -CD was performed in water at 25 °C according to Higuchi and Connors (1965). An excess amount of β -lap (3 mg) was added to 1.5 mL of an aqueous HP β -CD solution at concentrations ranging from 0 to 362.32 mM. The mixtures were shaken vigorously at 25 \pm 1 °C until equilibrium was attained (about 48 h). Samples were centrifuged at 8,792 *g* for 10 minutes and the supernatant filtered (millex[®] filter, Millipore, USA). An aliquot (100 μ L) of the filtrate was

removed and analyzed for β-lap content using UV spectrophotometry (Ultrospec® 300, Armsham Pharmaceutical) at 256 nm (Cunha-Filho et al., 2005). Solubility data were fitted using linear regression. Assuming the formation of a complex with a 1:1 stoichiometric ratio, the apparent stability constant ($K_{1:1}$) of β-lap was calculated from the linear relationship between the molar concentration of β-lap in the solution medium versus the HPβ-CD molar concentration according to the equation 1, where S_0 is the solubility of the β-lap in the absence of HPβ-CD.

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

The complexation efficiency (CE) of β-lap was determined from data of the phase-solubility curve according to equation 2 (Loftsson et al., 2005).

$$\text{CE} = \text{slope}/(1 - \text{slope}) \quad [\text{Eq. 2}]$$

2.2.2. Preparation of β-lap:HPβ-CD inclusion complex

β-lap:HPβ-CD was prepared using the *freeze-drying* technique. First, stoichiometric amounts of HPβ-CD and β-lap were dissolved in purified water and ethanol, respectively. Then the HPβ-CD solution was added to the β-lap solution and the mixture was stirred for 48 h at 25 °C, then frozen in liquid nitrogen at -80 °C and finally lyophilized at 4×10^{-6} Barr at -80 °C for 72 h.

2.2.3 Characterization β-lap:HPβ-CD inclusion complex

2.2.3.1 Thermal analysis

Simultaneous thermogravimetric (TG) and differential thermal analysis (DTA) experiments were performed in a Netzsch STA 409 PC/PG apparatus, coupled to a Bruker Tensor 27 Fourier-transformed infrared spectrometer, which analyses the released gases. A Netzsch Phoenix 204F1 apparatus was used to obtain differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of the investigated samples. The measurements were performed from room temperature up to 500 °C, at 10 °C.min⁻¹, under nitrogen flow, by using an open aluminum pan, in which approximately 5 mg of the sample was placed.

2.2.3.2 Vibrational and Raman spectroscopic analyses

Infrared spectra were recorded on a Bruker Vertex 70 FT-IR spectrometer with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. KBr pellets of solid samples were prepared from mixtures

of 200 mg KBr in a 1 mg of sample. FT-Raman spectra were recorded from the original samples on a Bruker Ram II spectrometer equipped with a Nd:YAG laser (1064 nm excitation line) and a liquid-nitrogen cooled Ge detector. FT-Raman spectra were acquired by accumulating 1024 scans at a spectral resolution of 4 cm⁻¹.

2.2.3.3 ¹H-NMR analysis

¹H-NMR spectra of free β-lap or in the presence of HPβ-CD were obtained on a Varian Unity Plus 300 MHz NMR spectrometer; the probe temperature was set at 25 °C and the results were processed using the MestReC software. The experiments were carried out using the following pulse sequence: for the β-lap and β-lap:HPβ-CD inclusion complex a presat (pulse sequence with pre-saturation of water signal in δ 4.72 ppm) was used with a 90° pulse width and acquisition time, 3.641 sec.; for HPβ-CD a pulse sequence s2pul with a 45° pulse width and acquisition time, 3.641 sec. All the samples were solubilized in D₂O and the β-lap was also analyzed after dilution in CDCl₃ to verify the purity of the sample. Chemical shifts were reported in ppm.

2.2.4 Molecular modeling of the β-lap:HPβ-CD inclusion complex

There are several reports in the literature (Mura et al., 1995; Aicart and Junqueira, 2003; Illapakurthy et al., 2003; Araújo et al., 2008) on the molecular modeling of drugs in HPβ-CD inclusion complexes. In order to deal with this problem, our approach was to construct a structure for the HPβ-CD, starting from the tridimensional structure of the β-cyclodextrin (β-CD) (Saenger et al., 1998). Considering the average degree of substitution of 0.7 HP units per glucose unit, it seems reasonable to consider that the HPβ-CD structure (7 glucose units) has, on average, 5 HP units. After that, the geometry optimizations of the isolated molecules (β-lap and HPβ-CD) and inclusion complex (β-lap:HPβ-CD) were computed using the semi-empirical RM1 (Rocha et al., 2006) quantum chemical method, available in the Spartan'08 software package (<http://www.wavefun.com>).

The value of the intermolecular interaction energy (ΔE) for the host-guest (β-lap:HPβ-CD) inclusion complex was calculated by the supermolecule approach, where the RM1 energies of the monomers (E_{β-lap} and E_{HPβ-CD}) were subtracted from the RM1 energy of the complex (E_{β-lap:HPβ-CD}), i.e.,

$$\Delta E = E_{\beta\text{-lap:HP}\beta\text{-CD}} - E_{\beta\text{-lap}} - E_{\text{HP}\beta\text{-CD}} \quad [\text{Eq. 3}]$$

2.2.5 Preparation of β -lap-loaded liposomes

β -lap-loaded liposomes were prepared using the thin lipid film method (Andrade et al., 2004). Briefly, lipids (soybean phosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine 7:2:1) ranging from 42 to 117.6 mM and β -lap (1.0 mg/mL) were dissolved in a mixture of CHCl_3 :MeOH (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed in a vacuum for 60 min (37 ± 1 °C, 80 rpm), resulting in a thin lipid film formation. This film was then hydrated with 10 mL of pH 7.4 phosphate buffer solution (PBS), producing multilamellar liposomes. The liposomal suspension was kept under magnetic stirring for 5 min and was then sonicated (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s to produce small unilamellar liposomes.

The liposomes were also lyophilized at 4×10^{-6} Barr at -80 °C using trehalose as a cryo-protector in the freeze-drying process (1 g of trehalose that represents 10 % of the formulation total volume or 264 mM).

2.2.6 Preparation of β -lap:HP β -CD-loaded liposomes

β -lap:HP β -CD-loaded liposomes were prepared as described above, but the aqueous phase was consisted of a solution of pH 7.4 PBS containing β -lap:HP β -CD inclusion complex (60 mg), corresponding to 10 mg of β -lap.

2.2.7 Characterization of β -lap and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes

2.2.7.1 Stability of liposomes

The stability of the liposomes was evaluated using standard accelerated and long-term stability testing. After preparation, samples of liposomal suspension were submitted to centrifugation (3,165 g for 1 h at 4 °C) and horizontal mechanical stirring (180 strokes/min for 48 h at 37 °C). For long-term stability evaluation, macroscopic appearance, pH variation, particle size and polydispersity index (PDI) were monitored after preparation and during storage of liposomal formulations at predetermined time intervals. The pH of liposome dispersions was measured with a glass electrode and a digital pH meter (Bioblock Scientific 99622, Prolabo, Paris, France) at room temperature. Liposome dispersions were sized by photon correlation spectroscopy (Beckman Coulter Delsa™ Nano S Particle analyzer). Measurements were made at 25 °C with a fixed angle of 90° and sizes quoted are the mean of the liposomal hydrodynamic diameter. Three hundred microliters of the liposomes dispersions were

diluted with 1 mL of purified water. The polydispersity index was also measured by the same method and equipment. The zeta potential of the liposomes was measured (Zetatrac NC-148, Microtrac) to analyze the surface charge of the vesicles. In this experiment 50 μL of the liposome dispersions were diluted with 5 mL of purified water and analyzed.

2.2.7.2 Determination of drug content

An aliquot of liposomal sample (200 μL) was diluted to 10 mL with methanol, sonicated during 10 min and diluted again with methanol to 10 mL. Samples were analyzed for determining the β-lap content at 256 nm using a β-lap standard curve with concentrations varying from 0.5 to 3 μg/mL.

2.2.7.3 Entrapment drug efficiency

Drug encapsulation efficiency was determined by the ultrafiltration/ultracentrifugation technique, using Ultrafree[®] units (Millipore, USA). Samples of liposomes (400 μL) were inserted in the filtration unit and submitted to ultracentrifugation at 8,792 g for 1 h. The drug content was quantified in the supernatant as described above. Data are presented as the percentage of the initial drug entrapped in liposomes.

2.2.8 In vitro release kinetics of β-lapachone from liposomes

The *in vitro* release kinetics of β-lap or β-lap:HPβ-CD from liposomes was analyzed using the dialysis technique against pH 7.4 PBS at 37 °C under *sink* conditions. Briefly, an aliquot of the liposomal formulation (1 mL) containing β-lap or β-lap:HPβ-CD was inserted into a dialysis membrane (Cut-off = M.W. 12,400), which was subsequently sealed and suspended in the release medium (150 mL). The system was maintained under magnetic stirring at 37 °C. At appropriate intervals, 1 mL samples of the release medium were removed and assayed for β-lap detection by spectrophotometer at 256 nm. A standard curve of β-lap from 0.5 to 3 μg/mL concentrations was used to determine β-lap concentration. After collection, the release medium was replaced by fresh buffer phosphate solution (1 mL).

The kinetic data of β-lap from liposomal formulations were fitted according to an exponential model using the following equation:

$$M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t}) \quad [\text{Eq. 4}]$$

where, M_t and M_∞ are the mass of the drug released at a determined time (t) and at an infinite time (t_∞) of the kinetic process, respectively; k_1 is a fitting constant, and k_2 is the kinetic rate constant.

3. Results

3.1 Phase-solubility study of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin solutions

The phase-solubility diagram of β -lap in the aqueous solution of HP β -CD showed an A_L-curve type (Fig. 2), yielding the following regression equation ($r^2=0.99992$):

$$[\beta\text{-lap}]_{\text{water}} = 0.1333 \times [\text{HP}\beta\text{-CD}] + 0.02439 \quad [\text{Eq. 5}]$$

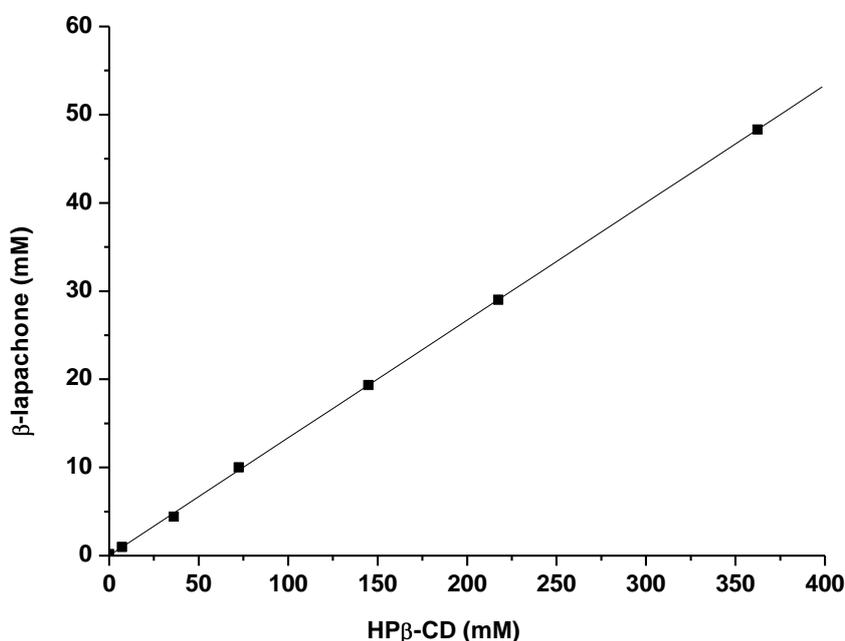


Fig. 2. Phase solubility diagram of β -lap as a function of HP β -CD concentrations in water at 25°C. The linear fitting with regression analysis yielded: $[\beta\text{-lap}]_{\text{water}} = 0.1333 \times [\text{HP}\beta\text{-CD}] + 0.02439$ ($r^2=0.9999$).

The solubility constant of β -lap in the aqueous HP β -CD solution at 25 °C was $K_{1:1} = 0.961 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, where the $S_0 = 0.16$. The maximum enhancement in β -lap solubility achieved 48.32 mM in HP β -CD, more than a 302-fold increase over β -lap solubility in water (0.16 mM). The complexation efficiency (CE) of β -lap in the aqueous HP β -CD solution, calculated according to Eq. 2, was 0.1538.

3.2 Characterization of β -lap:HP β -CD inclusion complex

3.2.1 Thermal analysis

The thermal stability of the raw materials and final products was investigated through TG and DSC measurements. Fig. 3 shows the TG thermograms, while the DSC curves are presented in Fig. 4. According to the TG results, β -lap and HP β -CD are stable up to 218 and 318 °C, respectively. These results are confirmed by the DSC curves, but additional features are observed in both compounds. HP β -CD exhibits a broad and rounded endotherm in the range 40–130°C, which is associated with a dehydration process. A varying number of water molecules are usually contained in HP β -CD due to its hydrophilicity. The dehydration process is confirmed by the increasing content of water vapor observed in the IR spectra of the released gases around 80 °C. On the other hand, the melting of β -lap is characterized by the broad endotherm feature with an onset temperature of 128 °C. This temperature is lower than the one reported previously (Cunha-Filho et al., 2007a), but the chemical purity of samples was confirmed by the infrared absorbance spectra (see below).

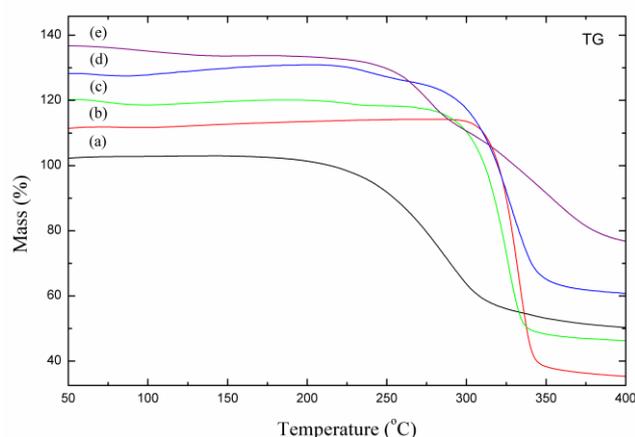


Fig. 3. Thermogravimetric curves of β -lapachone (a), HP β -CD (b), 1:1 physical mixture (c), β -lap:HP β -CD inclusion complex (d) and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes (e).

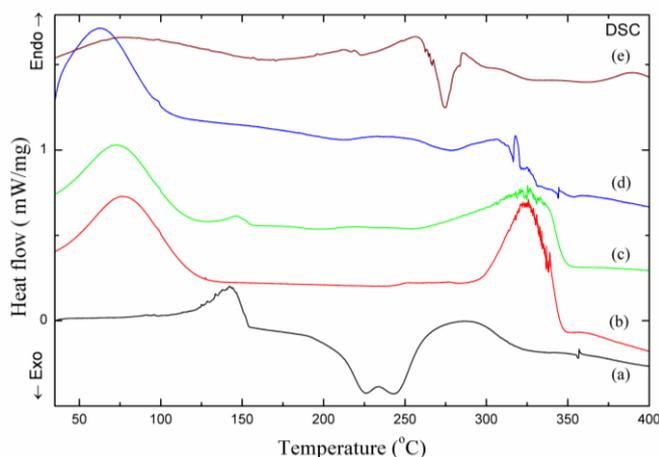


Fig. 4. Differential scanning calorimetry curves of β -lapachone (a), HP β -CD (b), 1:1 physical mixture (c), β -lap:HP β -CD inclusion complex (d) and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes (e).

3.2.2 Vibrational and Raman spectroscopic analysis

Infrared and Raman spectra of the investigated compounds are shown in Figs. 5 and 6, where only the fingerprint region was selected in order to improve the comparison. As was previously stated, the infrared spectra of β -lap, as well as that of HP β -CD, exhibit an excellent agreement with those reported in the literature (Cunha Filho et al., 2007a; Cunha Filho et al., 2007b), confirming the chemical identity of the samples. Furthermore, the physical mixture can be directly interpreted as the linear combination of the corresponding spectra. An interesting feature is the superposition of the infrared bands of β -lap and HP β -CD in the spectral region investigated. As a result, hardly any changes in the vibrational modes associated with the formation of the inclusion complex are observed. It should be noted that only the most intense bands of β -lap are weakly observed in the infrared spectrum of the complex, but no clear evidence of the intermolecular interaction can be obtained from this result. On the other hand, the Raman spectrum of HP β -CD does not present bands above 1500 cm^{-1} , whereas the most intense modes of β -lap lie in this region. Consequently, this feature allows us to easily compare the main bands of β -lap as a crystalline solid and an inclusion complex. These bands can be approximately classified as the stretching modes of the C=O (1694 cm^{-1}) and aromatic ring (1643 , 1633 , 1598 and 1569 cm^{-1}) bonds. The first indication of a change in the molecular environment of β -lap in the inclusion complex is the broadening of the Raman bands. Additional support for the β -lap:HP β -

CD interaction is provided by the shift towards higher energies of the bands related to the stretching of the carbonyl groups and phenyl ring. NMR investigations have suggested that β -lap is bound inside the cavity of HP β -CD through the methyl moiety (Nasongkla et al., 2003). On the other hand, the crystalline structure of β -lap is stabilized by weak C=O \cdots H-C hydrogen bonds (Cunha-Filho et al., 2006). This kind of intermolecular interaction is expected to shift the carbonyl group stretching towards lower wavenumbers. The loss of the crystal packing in favor of the formation of the inclusion complex should exhibit the opposite behavior in the ν (C=O) bands, as was observed. Nasongkla et al. (2003) also reported an anomalous dependence of some protons of the phenyl group as a function of the β -lap concentration. Even though there is no acceptable explanation for this effect, it correlates very well with the shift of the ν (C=C) bands of the phenyl group.

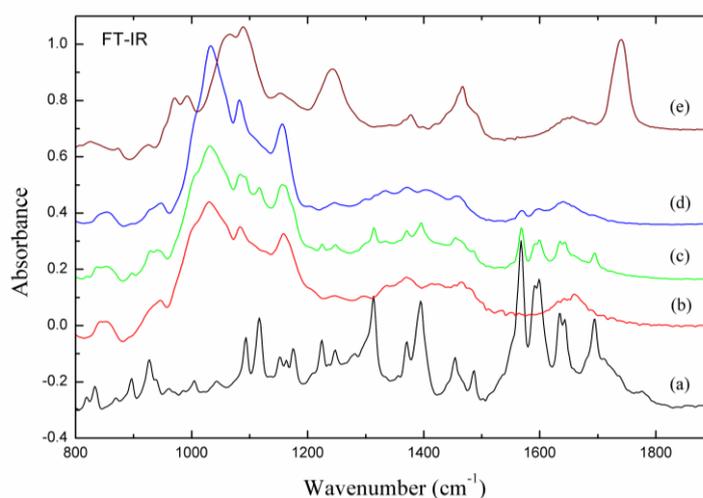


Fig. 5. Infrared spectra of β -lapachone (a), HP β -CD (b), 1:1 physical mixture (c), β -lap:HP β -CD inclusion complex (d) and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes (e).

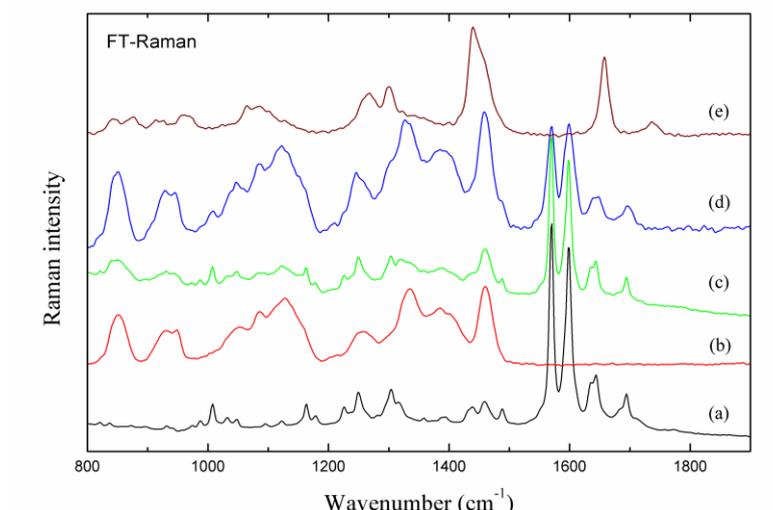


Fig. 6. Raman spectra of β -lapachone (a), HP β -CD (b), 1:1 physical mixture (c), β -lap:HP β -CD inclusion complex (d) and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes (e).

3.2.3 ¹H-NMR analysis

¹H-NMR experiments were performed to evaluate the changes in the chemical shifts ($\Delta\delta$) of pure compounds (β -lap and HP β -CD) and the β -lap:HP β -CD inclusion complex (Tables 1 and 2). For the β -lap a singlet at 1.469 ppm, triplets at 1.856 and 2.574 ppm and the aromatic protons at 7.508, 7.647, 7.818 and 8.066 ppm were observed. All β -lap chemical shifts are in agreement with that previously reported by Alves et al. (2008) indicating the purity of the sample. In the presence of β -lap, both H₃ and H₅ protons of the HP β -CD are up field shifted ($\Delta\delta$ = 0.018 and 0.009 ppm, respectively). Because these protons are located inside the hydrophobic cavity of HP β -CD, their shifts suggest that the β -lap formed a 1:1 complex by inclusion inside the cavity of HP β -CD. Moreover, an excitation of β -lap H_c protons ($\Delta\delta$ = -0.070 ppm) was observed, as reported in the literature (Nasongkla et al., 2003), suggesting that the interaction of β -lap with HP β -CD may occur with the methyl group.

Table 1Proton NMR signals of β -lap and β -lap:HP β -CD (shifts observed in signals of β -lap).

β -lap*	δ β -lap (ppm)	δ β lap:HP β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H _a	2.402	2.496	-0.094
H _b	1.804	1.847	-0.043
H _c	1.377	1.447	-0.070
H _d	7.823	7.793	0.030
H _e	7.522	7.588	-0.066
H _f	7.645	7.705	-0.060
H _g	7.904	7.954	-0.050

* β -lap in D₂O**Table 2**Proton NMR signal of HP β -CD and β -lap:HP β -CD (shifts observed in signals of HP β -CD).

HP β -CD*	δ HP β -CD (ppm)	δ β -lap:HP β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H ₁	5.154	5.150	0.004
H ₂	3.614	3.608	0.006
H ₃	3.919	3.901	0.018
H ₄	3.401	3.401	0.000
H ₅	3.646	3.637	0.009
H ₆	3.759	3.750	0.009

* HP β -CD in D₂O

3.3 Molecular modeling calculations

The most stable geometry found for the β -lap:HP β -CD inclusion complex can be observed in Fig. 7. The interaction energy (ΔE) is $-23.67 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, where the main interactions between the C=O acceptor groups of the guest (β -lap) and the OH donor groups of the host (HP β -CD) are two hydrogen bonds with 3.21 and 3.31 Å. These important polar interactions constitute the main intermolecular reasons for the stability of the β -lap:HP β -CD inclusion complex.

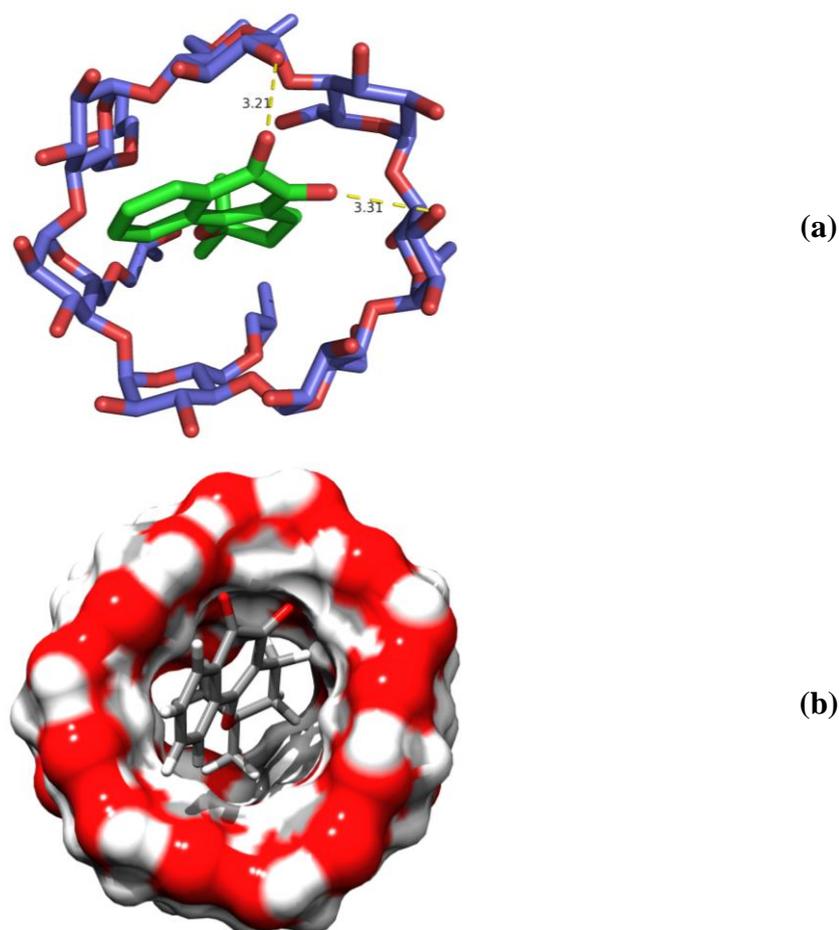


Fig. 7. Optimized geometry of the β -lap:HP β -CD inclusion complex. (a) The most important hydrogen bonds between the HP β -CD donor and the β -lap acceptor are labeled in Å and the hydrogen atoms are not shown for clarity reasons. (b) The β -lap guest is entirely included in the cavity of the HP β -CD host.

3.4 Characterization of β -lap and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes

In the study of preformulation, different batches of β -lap-loaded liposomes were prepared by varying the drug/lipid ratio (1:10.17 - 1:28.48), the total lipids (from 42 to 117.6 mM) and drug concentration (0.5 – 2 mg/mL). The stability of β -lap-loaded liposomes was evaluated according to their micro and macroscopic appearance (Table 3). The presence of β -lap crystals was detected in unstable liposome formulations through optical microscopic analysis. The most stable formulation of β -lap-loaded liposomes was obtained with a drug/lipid ratio of 1:28.48 and 117.6 mM of lipids at a β -lap concentration of 1mg/mL. Based on these results, stable β -lap:HP β -CD-loaded liposomes were obtained with 117.6 mM of lipids and the β -lap:HP β -CD inclusion complex in the aqueous phase, corresponding to a β -lap concentration of 1mg/mL .

Table 3

Pre-formulation study and stability of liposomes containing β-lapachone in a suspension dosage form.

Drug/lipid molar ratio	Lipids (SPC:CH:SA) (mM)	[β-lap] (mg/mL)	Micro and macroscopic Appearance	Time (days)
1:10.17	42	1	Unstable*	2
1:14.25	117.6	2	Unstable	4
1:20.39	42	0.5	Unstable	5
1:20.34	84	1	Unstable	7
1:28.48	117.6	1	Stable	60

*Unstable=Precipitation of β-lap and the presence of β-lap crystals

β-lap and β-lap:HPβ-CD-loaded liposomes in the suspension dosage forms presented mean vesicle sizes of 104 ± 2.33 nm (PDI = 0.30) and 112 ± 1.49 nm (PDI = 0.30), respectively. The surface charge of β-lap-loaded liposomes, evaluated by means of the zeta potential, and the encapsulation efficiency were $+23.22 \pm 1.90$ mV and 97.09 ± 0.02 %, respectively, while β-lap:HPβ-CD-loaded liposomes presented a zeta potential of $+21.03 \pm 4.64$ mV and an encapsulation efficiency of 93.56 ± 0.04 %.

After hydration of the lyophilized formulation, β-lap and β-lap:HPβ-CD-loaded liposomes in the suspension dosage forms presented mean vesicle sizes of 98 ± 8.00 nm (PDI = 0.33) and 89 ± 4.78 nm (PDI = 0.24), respectively.

With regard to accelerated stability, β-lap and β-lap:HPβ-CD-loaded liposomes (suspension form) proved resistant to testing, maintaining their initial characteristics regarding particle size and polydispersity index. The β-lap and β-lap:HPβ-CD-loaded liposomes presented, respectively, particle sizes of 108 ± 2.60 nm (PDI = 0.24) and 103 ± 5.66 nm (PDI = 0.45) after being submitted to mechanical stirring, and 111 ± 0.74 nm (PDI = 0.33) and 107 ± 2.91 nm (PDI = 0.29) following centrifugation.

As to long-term stability, the β-lap and β-lap:HPβ-CD liposomal formulations in the suspension and lyophilized dosage forms stored at 4 °C maintained their stability for 60 days and at least 90 days, respectively (Table 4). The stability of lyophilized liposomal formulations was also evaluated and it was observed that the particle size was not changed following the lyophilization process. After hydration, β-lap-loaded

liposomes presented zeta potential of $+20.84 \pm 1.69$ mV and encapsulation efficiency of 97.48 ± 0.02 %. On the other hand, β -lap:HP β -CD-loaded liposomes presented potential of $+20.75 \pm 2.21$ mV and encapsulation efficiency of 96.84 ± 0.03 %. These formulations maintained their stability for 90 days (Table 4).

Table 4

Long-term stability of β -lap and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes in suspension and lyophilized dosage forms.

Time (days)	β -lap-loaded liposomes			β -lap:HP β -CD-loaded liposomes		
	pH	\emptyset (nm)	PDI	pH	\emptyset (nm)	PDI
Suspension						
0	7.5	104.35 ± 2.33	0.30 ± 0.01	7.6	112.30 ± 1.49	0.30 ± 0.01
15	7.5	100.07 ± 0.59	0.31 ± 0.01	7.6	118.87 ± 12.48	0.25 ± 0.04
30	7.4	102.10 ± 2.34	0.34 ± 0.03	7.6	132.77 ± 6.36	0.34 ± 0.07
60	7.4	100.20 ± 1.46	0.34 ± 0.07	7.5	127.60 ± 7.40	0.34 ± 0.05
Lyophilized						
0	7.5	97.73 ± 8.00	0.33 ± 0.06	7.7	89.34 ± 4.78	0.24 ± 0.08
30	7.5	110.75 ± 0.25	0.17 ± 0.02	7.6	87.70 ± 0.85	0.24 ± 0.03
90	7.4	115.43 ± 1.05	0.20 ± 0.02	7.4	93.37 ± 5.87	0.30 ± 0.05

\emptyset : particle size; PDI: polydispersity index

The β -lap:HP β -CD inclusion complex encapsulated into liposomes was also characterized by thermal analysis (Figs. 3e and 4e) and vibrational spectroscopy (Figs. 5e and 6e) compared with unloaded and β -lap-loaded liposomes. Unfortunately, the low relative concentration of the inclusion complex was not enough to provide an appreciable signal in any of the techniques applied to identify either the β -lap or the HP β -CD.

3.5 *In vitro* release kinetics of β -lapachone from liposome formulations

A slower release pattern of β -lap from the liposomal formulation with β -lap incorporated into the phospholipid bilayer was observed when compared to the formulation containing the inclusion complex encapsulated in the aqueous cavity (Fig.

8). The kinetic profile of the drug from β -lap-loaded liposomes and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes showed burst effects of 33 and 38 %, respectively, after the first 4 hours. The maximum releases of β -lap were approximately 60 % and 70% for β -lap and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes at 24 h, respectively.

The release kinetics of β -lap from the liposomes was fitted according to the exponential model $M_t/M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$. For the β -lap-loaded liposomes $M_\infty = 583.43 \pm 7.68 \mu\text{g}$, $k_1 = 0.9464 \pm 0.0037$ and $k_2 = 0.2011 \pm 0.0070$ was obtained and the release of β -lap from β -lap:HP β -CD-loaded liposomes yielded $M_\infty = 609.53 \pm 2.440 \mu\text{g}$, $k_1 = 1.0083 \pm 0.0034$ and $k_2 = 0.2075 \pm 0.0034$ with a correlation coefficient of $r^2 = 0.999$. The rate constants of $183.95 \pm 1.82 \mu\text{g/h}$ (Fig. 8, insert A) and $216.25 \pm 2.34 \mu\text{g/h}$ (Fig. 8, insert B) were calculated for β -lap-loaded liposomes and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes, respectively, considering the first 8 hours of the kinetics.

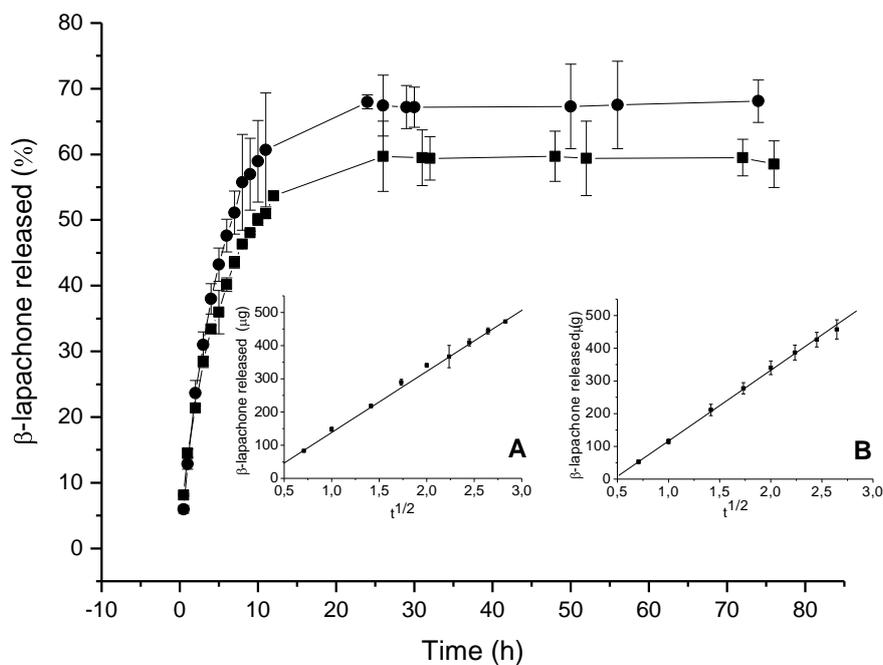


Fig. 8. Release kinetics of β -lapachone from liposomal formulations in pH 7.4 phosphate buffer solution at 37 °C: β -lap-loaded liposomes (■) and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes (●). Inserts A and B: release of β -lap from β -lap-loaded liposomes and β -lap:HP β -CD-loaded liposomes, respectively. The linear fitting with square root of time was carried out for the first 8 h of the kinetics.

4. Discussion

This study was focused on the enhancement of solubility of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin through the formation of an inclusion complex and its encapsulation into liposomes. Further, a physicochemical characterization and a molecular modeling of the β -lap:HP β -CD inclusion complex was performed. The stability and *in vitro* release pattern of β -lapachone of liposomal formulations were also investigated.

According to the literature, phase-solubility analysis is one of the preliminary requirements for developing an inclusion complex of drugs in cyclodextrins as it permits an evaluation of the affinity between the drug molecule and cyclodextrin. Many researchers have used this approach to determine the exact molar ratio in which a drug can form a complex with cyclodextrins (Connors and Higuchi, 1965; Loftsson et al., 2005).

The solubility constant found in the present study for β -lap in the aqueous HP β -CD solution at 25 °C was almost identical to that previously reported ($K_{1:1} = 0.876 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) by Cunha-Filho and coworkers (2007a). Further, from our results it can be stated that the stability constant for β -lap in HP β -CD solution is not influenced by the pH, since a $K_{1:1} = 0.94 \pm 0.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ was found for the β -lap in the phosphate buffer HP β -CD solution at 25 °C (Nasongkla et al., 2003). As shown in the results section, the presence of HP β -CD hugely increased β -lap solubility in water (about 302 fold). Moreover, it is necessary to evaluate the complexation efficiency (CE) of β -lap in HP β -CD to determine the affinity of these molecules. The CE of β -lap in the aqueous HP β -CD solution was 0.1538, which means that 1 out of every 16.5 cyclodextrin molecules forms a complex with the drug. A CE value of 0.1 means that 1 out of every 11 cyclodextrin molecules forms a complex with the drug, while a CE of 0.01 indicates that only 1 out of every 100 cyclodextrin molecules forms a complex (Loftsson et al., 2005). Our results thus suggest that only a small amount of HP β -CD is in a non-complexed form in the β -lap in HP β -CD inclusion complex.

TG and DSC results of β -lap:HP β -CD inclusion complex compared to β -lap and HP β -CD could be considered as evidence of the successful complexation procedure, because the melting point is determined by the intermolecular interactions stabilizing the crystalline structure of the compound. If β -lap molecules are linked to HP β -CD, the thermodynamic stability of the new structure should be determined by a new set of

interactions, giving rise to a different thermal behavior. In addition, it can be seen that the broad band related to the release of water molecules associated with HP β -CD has shifted towards lower temperatures. Thus, our results suggest that β -lap could replace water inside the cavity of HP β -CD, occupying the strongly bonded sites as the decrease in the broad band corresponds to the release of the weakly bonded water.

The formation of complexes containing β -lap and HP β -CD was investigated by comparing the thermal behavior of a 1:1 physical mixture of the constituents and the final products. The TG and DSC curves of the physical mixture exhibit the superposition of the characteristic features of the individual components. Thus, the mass loss is divided into two consecutive processes related to the decomposition of β -lap and HP β -CD, whereas the two endothermic peaks associated with each melting point are clearly identified in the DSC curve. The main difference observed in the thermal analysis of the physical mixture and the β -lap:HP β -CD complex is the absence of the peak corresponding to the melting point of β -lap. It may be noted that the decomposition process exhibits the same two-step pattern, showing that β -lap decomposes first and confirming the presence of this compound in the sample.

The characterization of the β -lap:HP β -CD inclusion complex through $^1\text{H-NMR}$ analysis confirmed that in the presence of β -lap, the H₃ and H₅ protons of the HP β -CD cavity are up field shifted, suggesting that the β -lap molecule is included inside the HP β -CD cavity. These results corroborate those previously reported ([Nasongkla et al., 2003](#)).

Taken together, all spectroscopic results confirmed the β -lap:HP β -CD inclusion complex formation and suggested that β -lap was included in the cavity of HP β -CD replacing the water molecules inside it. Furthermore, the molecular modeling results corroborate this, since it was observed that the stability of the β -lap:HP β -CD inclusion complex is mainly related to major hydrogen bonds between the guest (β -lap) and the host (HP β -CD).

Stable liposomes containing β -lap or the β -lap:HP β -CD inclusion complex were obtained with a 1:28.48 molar drug/lipid ratio, lipid concentration of 117.6 mM and 1 mg/mL of β -lap. β -lap or β -lap:HP β -CD-loaded liposomes were homogeneous in size as the polydispersity index was always lower than 0.35. These results point to almost homogeneous β -lap liposomal formulations, as this index ranges from 0 for a monodispersed sample up to 1 for a polydispersed sample ([Hinrichs et al., 2006](#)). These

formulations were resistant to tests of accelerated stability and maintained their initial properties even after 60 days in suspension form and up to 90 days in the lyophilized form.

Regarding the influence of lyophilization in the particle size, the liposomes submitted to this process usually increased significantly their size in comparison with the initial vesicle size caused by the fusion of particles after rehydration (Cui et al., 2006). However, in our experiments this process exerted almost no influence on the size and size distribution of β -lap or β -lap:HP β -CD-loaded liposomes, which may indicate that the concentration of the cryo-protectant (264 mM) was appropriate. In fact, β -lap or β -lap:HP β -CD-loaded liposomes after lyophilization presented a better polydispersity index and the encapsulation efficiency was almost the same as that of the liposomes in suspension. Based on the results of Christensen et al. (2007), liposomal formulations lyophilized with 211 mM trehalose and above had regained their initial particle size after rehydration because the trehalose provided protection from the aggregation of the vesicles. In fact, based on the literature, the *freeze-drying* technology might be suitable for the production of rehydrated liposomes, because numerous studies of long-term stability have been performed and shown the preservation of liposomes in the dried state in the presence of sugars such as trehalose (Crowe and Crowe, 1988; Pinto-Alphandary et al., 2000).

The encapsulation efficiency of β -lap in liposomes, above 90%, had a significant advantage over other drug delivery systems described for encapsulation of β -lap, for example, micelles of PLA-PEG that showed a maximum encapsulation efficiency of 41.9 ± 5.6 % (Blanco et al., 2007). This result could be due to the fact that liposomes have a lipid bilayer that may contribute to an environment more appropriate for the entrapment of β -lap than the monolayer structure of the micelles.

Regarding the *in vitro* release kinetics of β -lapachone from liposomes, two major observations may be made. First, the initial faster drug release (almost 40 % in the first 4 h) from liposomes is attributable to their smaller size (100 nm), which is in agreement with the results of Verma et al. (2003) and Maestrelli et al. (2006). Second, the β -lap released from the β -lap:HP β -CD inclusion complex entrapped in the aqueous cavity of liposomes was apparently higher than from the liposomal formulation with the drug entrapped in the phospholipid bilayer. However, a more careful analysis, considering the broad standard deviations of data, reveals that both kinetic profiles are similar. These unexpected results can be explained by the destabilization of the membrane of

liposomes caused by the presence of HP β -CD, leading to a fast drug release. In fact, the ability of CDs to remove lipid components from liposome membranes by forming inclusion complex with them is well established (Fatouros et al., 2001; Hatzi et al., 2007; Puskás and Csempesz, 2007). According to Fatouros et al. (2001), this destabilizing phenomenon of the liposome membrane by CD inclusion complexes might cause a drug release similar to or greater than the release of the drug imbibed in the lipid bilayer. In effect, membrane lipids may enter the hydrophobic CD cavity and displace the drug from the complex, which in turn is release from the vesicles. Furthermore, because of the higher solubility of the β -lap:HP β -CD inclusion complex, the presence of the complex also in the continuous aqueous phase of the liposomal formulation should not be neglected. This may contributed to the fast release of β -lap from the β -lap:HP β -CD-loaded liposomes.

All the findings of the present study, indicate that the encapsulation of the β -lap:HP β -CD inclusion complex into liposomes provides an alternative means of overcoming the low solubility of β -lapachone, leading eventually to its practical use in cancer therapy.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for grant # 474071/2007-3. This work was supported by the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE, Recife, Brazil).

References

- Alves, G.M.C., Rolim, L.A., Rolim-Neto, P.J., Leite, A.C.L., Brondani, D.J., Medeiros, F.P.M., Bieber, L.W., Mendonça-Junior, F.J.B., 2008. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Quím. Nova*, 31, 413-416.
- Aicart, E. and Junqueira, E., 2003. Complex formation between purine derivatives and cyclodextrins: a fluorescence spectroscopy study. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 47, 161-165.
- Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santo-Magalhães, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int. J. Pharm.*, 278, 435-445.

- Andrade-Neto, V.F., Goulart, M.O.F., Silva-Filho, J.F., Silva, M.J., Pinto M.C.F.R., Pinto, A.V., Zalis, M.G., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1145-1149.
- Araújo, M.V.G., Vieira, E.K.B., Lázaro, G.S., Conegero, L.S., Almeida, L.E., Barreto, L.S., Costa, N.B., Gimenez, I.F., 2008. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 5788-5794.
- Blanco, E., Bey, E.A., Dong, Y., Weinberg, B.D., Sutton, D.M., Boothman, D.A., Gao, J., 2007. β -Lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. *J. Control. Release*, 122, 365-374.
- Choi, Y.H., Kang, H.S., Yoo, M.A., 2003. Suppression of human prostate cancer cell Growth by β -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 36, 223-229.
- Christensen, D., Foged, C., Rosenkrands, I., Nielsen, H.M., Andersen, P., Agger, E.M., 2007. Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 2120-2129.
- Crowe, J.H. and Crowe, L.M., 1988. Factors affecting the stability of drug liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 939, 327-334.
- Cui, J., Li, C., Deng, Y., Wang, Y., Wang, W., 2006. Freeze-drying of liposomes using tertiary butyl alcohol/water cosolvent systems. *Int. J. Pharm.*, 312, 131-136.
- Cunha-Filho, M.S.S., Alves, F.C., Alves, G.M.C., Monteiro, D.B., Medeiros, F.P.M., Rolim-Neto, P.J., 2005. Beta-lapachona: desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa terapêutica antineoplásica. *Rev. Bras. Farm.*, 86, 39-43.
- Cunha-Filho, M.S.S., Dacunha-Marinho, B., Torres-Labandeira, J., Martínez-Pacheco J.R., Landín, M., 2007a. Characterization of β -lapachone and methylated β -cyclodextrin solid-state systems. *AAPS PharmSciTech.*, 8, E68-E77.
- Cunha-Filho, M.S.S., Martinez-Pacheco, R., Landin, M., 2007b. Compatibility of the antitumoral β -lapachone with different solid dosage form excipients. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45, 590-598.

- Cunha-Filho, M.S.S., Landin, M., Martinez-Pacheco, R., Dacunha-Marinho, B., 2006. β -lapachone. *Acta Crys. C.*, 62, 473-475.
- Davis, M.E. and Brewster, M.E., 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Rev.*, 3, 1023-1035.
- Duchêne, D., Ponchel, G., Wouessidjewe, D., 1999. Cyclodextrins in targeting application to nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, 29-40.
- Fatouros, D.G., Hatzidimitriou, K., Antimisiaris S.G., 2001. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone–cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 287-296.
- Ferrari, M., 2005. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Rev.*, 5, 161-171.
- Guiraud, P., Steiman, R., Campos-Takaki, G.M., Seigle-Murandi, F., Simeon de Buochberg, M., 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. *Plant. Med.*, 60, 373-374.
- Hatzi, P., Mourtas, S., Klepetsanis, P.G., Antimisiaris, S.G., 2007. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. *Int. J. Pharm.*, 333, 167-176.
- Higuchi, T. and Connors, K.A., 1965. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 4, 117-212.
- Hinrichs, W.L.J., Mancenido, F.A., Sanders, N.N., De Smedt, S.C., Demeester, J., Frijlink H.W., 2006. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *Int. J. Pharm.*, 311, 237-244.
- Illapakurthy, A.C., Sabnis, Y.A., Avery, B.A., Avery, M.A., Wyandt, C.M., 2003. Interaction of artemisinin and its related compounds with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution state: experimental and molecular-modeling studies. *J. Pharm. Sci.*, 92, 649-655.
- Li, C., Li, Y.Z., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999. Potent inhibition of tumor survival in vivo by β -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 13369-13374.
- Li, C.J., Wang, C., Pardee, A.B., 1995. Induction of apoptosis by β -lapachone in Human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 55, 3712-3715.

- Li, Y., Li, C.J., Yu, D., Pardee, A.B., 2000. Potent induction of apoptosis by β-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. *Molec. Med.*, 6, 1008-1015.
- Li, C.J., Averbouk, L., Pardee, A.B., 1993. β-lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J. Biol. Chem.*, 268, 22463-22468.
- Loftsson, T. and Duchêne, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.*, 329, 1-11.
- Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., Másson, M., 2005. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.*, 302, 18-28.
- Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Mura, P., 2006. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int. J. Pharm.*, 312, 53-60.
- McCormack, B. and Gregoriadis, G., 1998. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. *Int. J. Pharm.*, 162, 59-69.
- Mura, P., Bettinetti, G., Melani, F., Manderioli, A., 1995. Interaction between naproxen and chemically modified β-cyclodextrins in the liquid and solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3, 347-355.
- Nasongkla, N., Wiedmann, A.F., Bruening, A., Beman, M., Ray, D., Bommann, W.G., Boothman, D.A., Gao, J., 2003. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.*, 20, 1626-1633.
- Nishijo, J., Shiota, S., Mazima, K., Inoue, Y., Mizuno, H., Yoshida, J., 2000. Interactions of cyclodextrins with dipalmitoyl, distearoyl, and dimyristoyl phosphatidyl choline liposomes. A study by leakage of carboxyfluorescein in inner aqueous phase of unilamellar liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 48-52.
- Ough, M., Lewis, A., Bey, E.A., Gao, J., Ritchie, J.M., Bornmann, W., Boothman, D.A., Oberley, L.W., Culle, N.J.J., 2005. Efficacy of β-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. *Cancer Biol. Ther.*, 4, 95-102.
- Pardee, A.B, Li, Y.Z., Li, C.J., 2002. Cancer therapy with β-lapachone. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2, 227-242.

- Pink, J.J., Planchon, S.M., Tagliarino, C., Varnes, M.E., Siegel, D., Boothman, D.A., 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β-lapachone cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 275, 5416-5424.
- Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., Couvreur, P., 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antim. Agents*, 13, 155-168.
- Puskás, I. and Csemesz, F., 2007. Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes. *Colloids Surf.*, 58, 218-224.
- Rocha, G.B., Freire, R.O., Simas, A.M., Stewart, J.J.P., 2006. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J. Comput. Chem.*, 27, 1101-1111.
- Saenger, W., Jacob, J., Gessler, K., Steiner, T., Hoffmann, D., Sanbe, H., Koizumi, K., Smith, S. M., Takaha, T., 1998. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues - Beyond the doughnut. *Chem. Rev.*, 98, 1787-1802.
- Sapra, P., Tyagi, P., Allen, T.M., 2005. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr. Drug Deliv.*, 2, 369-381.
- Silva-Júnior, E.N., Souza, M.C.B.V., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Goulart, M.O.F., Barros, F.W.A., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Moraes, M.O., Ferreira, V.F., 2007. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor-β-lapachone and nor-α-lapachone. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 7035-7041.
- Torchilin, V.P., 2006. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 1532-1555.
- Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A., 2003. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int. J. Pharm.*, 258, 141-151.
- Wang, F., Blanco, E., Ai, H., Boothman, D.A., Gao, J., 2006. Modulating β-lapachone release from polymer micelles through cyclodextrin complexation. *J. Pharm. Sci.*, 95, 2309-2319.
- Woo, H.J. and Choi, Y.H., 2005. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. *Int. J. Oncol.*, 26, 1017-1023.
- <http://www.wavefun.com>, accessed in July 2009.

6.0 – CONCLUSÕES

- O diagrama de solubilidade de fases da β -lapachona em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) apresentou curva do tipo A_L, mostrando assim uma relação linear entre a solubilidade da β -lapachona e a concentração da HP β -CD;
- Complexos de inclusão β -lap:HP β -CD foram obtidos pelo método de liofilização e comprovados por RMN H¹, DSC, TG, IR e Raman;
- Os resultados da modelagem molecular sugerem a possibilidade da formação do complexo de inclusão, indicando que a β -lap está incluída na cavidade hidrofóbica da HP β -CD;
- Lipossomas contendo β -lapachona ou complexo de inclusão β -lap:HP β -CD permaneceram estáveis aos testes de estabilidade acelerada e ao armazenamento na forma de suspensão por aproximadamente 60 dias a 4 °C;
- A utilização de trealose como agente crioprotetor foi eficiente em conservar as características iniciais das formulações lipossomais após liofilização por 90 dias;
- Os lipossomas contendo β -lap:HP β -CD apresentaram uma maior velocidade de liberação de β -lap comparado aos lipossomas contendo apenas o fármaco;
- A encapsulação de β -lap e complexo de inclusão β -lap:HP β -CD em lipossomas pode ser uma alternativa para aumentar a solubilidade da β -lap e, em consequência, viabilizar sua utilização na terapêutica do câncer.

7.0 – PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho, isto é, a associação dos complexos de inclusão aos lipossomas, aumenta a nossa curiosidade para investigar a farmacocinética, biodistribuição, citotoxicidade e atividade antitumoral dos lipossomas desenvolvidos, assim como, desenvolver sistemas furtivos e sítio-específicos que permitam a utilização da β -lap na terapia de câncer de forma eficaz e segura.

8.0 – REFERÊNCIAS

ABU LILA, A. S.; KIZUKI, S.; DOI, Y.; SUZUKI, T.; ISHIDA, T.; KIWADA, H. Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. **Journal of Controlled Release**, v. 137, p. 8-14, 2009.

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

BARBATO, F.; CAPPELO, B.; ROTONDA, M. I.; MIRO, A.; QUAGLIA, F. Diclofenac/ β -Cyclodextrin binary systems: a study in solution and in solid state. **Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic**, v. 46, p. 179-185, 2003.

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

BELINSKY, M.; JAISWAL, A.K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DTdiaphorase) expression in normal and tumor tissues, **Cancer Metastasis Review**, v. 12, p. 103-117, 1993.

BLANCO, E.; BEY, E. A.; DONG, Y.; WEINBERG, B. D.; SUTTON, D. M.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. β -Lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. **Journal of Controlled Release**, v. 122, p. 365-374, 2007.

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

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO-JR. C. S.; SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v. 27, p. 882-888, 2004.

CABRAL MARQUES, H.M.; HADGRAFT, J.; KELLAWAY, I.W. Studies of cyclodextrin complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 63, p. 259-266, 1990.

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

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

CHAROENLAP, N.; DHARMSTHITI, S.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; LERTSIRI, S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 49-54, 2004.

CHOI, Y. H.; KANG, H. S.; YOO, M. A. Suppression of Human Prostate Cancer Cell Growth by β -Lapachone via Down-regulation of pRB Phosphorylation and Induction of Cdk Inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 223-229, 2003.

Complexo de Ácido Azeláico a 50% em Ciclodextrinas. Tratamento da acne com menor índice de irritação. Disponível em: <<http://www.gerbras.com.br>>. Acesso em: 01 de Dezembro de 2009.

CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* sp subgrupo alcalophilus E16 em polvilho doce em fermentação submersa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 201-208, 2006.

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

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

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews**, v. 3, p. 1023-1035, 2004.

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

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

DOCAMPO R.; CRUZ F. S.; BOVERIS A. β -Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by Sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 723-728, 1979.

DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G.; WOUESSIDJEWÉ, D. Cyclodextrins in targeting application to nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 29-40, 1999.

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

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

FERNANDES, V. C.; DENADAI, Â. M. L.; MILLÁN, R. D. S.; ALVES, R. J.; CUNHA-JÚNIOR, A. S. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil- β - ciclodextrina e insulina:hidroxipropil- β -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 4, p. 543-553, 2007.

FIELDING, L. Determination of association constant (k_a) from solution NMR data. **Tetrahedron**, v. 56, p. 6151-6170, 2000.

FRACETO, L. F.; GONCALVES, M. M.; MORAES, C. M.; ARAÚJO, D.R.; ZANELLA, L.; DE PAULA, E.; PERTINHEZ, T. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, p. 1203-1207, 2007.

FREUDENBERG, K.; BLOMQUIST G.; EWALD, L.; SOFF, K. Hydrolysis and acetolysis of starch and of the Schardinger dextrans. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, n. 69, p. 1258, 1936.

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

GILL, P. S.; ESPINA, B. M.; MUGGIA, F.; CABRIALES, S.; TULPULE, A.; ESPLIN, J. A.; LIEBMAN, H. A.; FORSSSEN, E.; ROSS, M. E.; LEVINE, A. M. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. **Journal of clinical oncology**, v. 13, p. 996-1003, 1995.

GILL, P. S.; WERNZ, J.; SCADDEN, D. T.; COHEN, P.; MUKWAYA, G. M.; ROENN, J. H. V.; JACOBS, M.; KEMPIN, S.; SILVERBERG, I.; GONZALES, G.; RARICK, M. U.; MYERS, A. M.; SHEPHERD, F.; SAWKA, C.; PIKE, M. C.; ROSS, M. E. Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's Sarcoma. **Journal of clinical oncology**, v. 14, p. 2353-2364, 1996.

GILLET, A.; GRAMMENOS, A.; COMPÈRE, P.; EVRARD, B.; PIEL G. Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, p. 174-180, 2009.

GIORDANO, F.; NOVÁK, C. S.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, p. 123-151, 2001.

GORDON, A. N.; FLEAGLE, J. T.; GUTHRIE, D.; PARKIN, D. E.; GORE, M. E.; LACAVE, A. J. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, p. 3312-3322, 2001.

GOULART, M. O. F.; FREITAS, L. R.; TONHOLO, J.; DE ABREU, F. C.; RASLAN, D. S.; STARLING, S.; ZANI, C. L.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 2043-2048, 1997.

GRAMMENOS, A.; BAHRI, M. A.; GUELLEY, P. H.; PIEL, G.; HOEBEKE M. Quantification of Randomly-methylated- β -cyclodextrin effect on liposome: An ESR study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, *in press*, 2009.

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; FACETO, L. F.; BRITO, C. L.; TROSSINI, H. G.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I., MORAES, C. M. Caracterização físico-química de complexos de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 31, p. 290-295, 2008.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SEIGLE-MURANDI, F.; SIMEON DE BUOCHBERG, M. Comparison of Antibacterial and Antifungal Activities of Lapachol and β -Lapachone. **Planta Médica**, v. 60, p. 373-374, 1994.

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

HARATA, K. Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1803-1827, 1998.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Advanced in Analytical Chemistry Instrumental**, v. 4, p. 117-212, 1965.

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

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN I. R. Lapachol: an overview. **Special Issue Reviews and Accounts**, p. 145-171, 2007.

INCA: Instituto nacional do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>
Acesso em: 01 de Dezembro de 2009.

KUMI-DIAKA, J. Chemosensitivity of human prostate cancer cells PC3 and LNCaP to genistein isoflavone and β -lapachone. **Biology of the Cell**, v. 94, p. 37-44, 2002.

LAI, C. C.; LIU, T. J.; HO, L. K.; DON, M. J.; CHAU, Y. P. Beta-Lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. **Histology and Histopathology**, v. 13, p. 89-97, 1998.

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

LEE, T. W. Y.; ROBINSON, J. T. Controlled-release drug-delivery systems. In: **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**, p. 933-960, 2004.

LEWIS, A. M.; OUGH, M.; DU, J.; TSAO, M. S.; OBERLEY, L. W.; CULLEN, J. J. Targeting NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer, **Molecular Carcinogenesis**, v. 43, p. 215-224, 2005.

LI, C. J.; AVERBOUK, L.; PARDEE, A. B. β-lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463-22468, 1993.

LI, C. J.; LI, Y. Z.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β-lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13369-13374, 1999.

LI, Y.; LI, C. J.; YU, D.; PARDEE, A. B.; Potent induction of apoptosis by β-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, v. 6, p. 1008-1015, 2000.

LI, Y.; SUN, X.; LAMONT, J. T.; PARDEE, A. B.; LI, C. J. Selective killing of cancer by β-lapachone: Direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **Medical Science**, v. 100, p. 2674-2678, 2002.

LI, X.; DING, L.; XU, Y.; WANG, Y.; PING, Q. N. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p. 116-123, 2009.

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

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LOBO, A. O.; MARTIN, A. A.; ANTUNES, E. F.; TRAVA-AIROLDI, V. J.; CORAT, E. J. Caracterização de materiais carbonosos por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, n. 2, p. 98-103, 2005.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 18-28, 2005.

LOGSDON, C. D.; SIMEONE, D. M.; BINKLEY, C.; ARUMUGAM, T.; GREENSON, J. K.; GIORDANO, T. J.; MISEK, D. E.; KUICK, R.; HANASH, S. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer, **Cancer Research**, v. 63, p. 2649-2657, 2003.

LOPES, J. N.; CRUZ, F. S.; CAMPO, R.; VASCONCELLOS, M. E.; SAMPAIO, M. C. R.; PINTO, A. V.; GILBERT, B. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, p. 523-531, 1978.

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

MISIUK, W.; ZALEWSKA, M. Investigation of inclusion complex of trazodone hydrochloride with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 482-488, 2009.

MOON, D.; CHOI, Y. H.; KIM, N.; PARK, Y.; KIM, G. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 506-514, 2007.

MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 325-338, 2001.

MUGGIA, F. M.; HAINSWORTH, J. D.; JEFFERS, S.; MILLER, P.; GROSHEN, S.; TAN, M.; ROMAN, L.; UZIELY, B.; MUDERSPACH, L.; GARCIA, A.; BURNETT, A.; GRECO, F. A.; MORROW, C. P.; PARADISO, L. J.; LIANG, L. J. Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, p. 987-993, 1997.

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

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BOMMANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1626-1633, 2003.

NEEDHAM, D.; MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1108, p. 40-48, 1992.

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

NISHIYAMA, M.; EGUCHI, H. Recent advances in cancer chemotherapy: current strategies, pharmacokinetics, and pharmacogenomics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 367-368, 2009.

OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E. A.; GAO, J.; RITCHIE, J. M.; BORNMANN, W.; BOOTHMAN, D. A.; OBERLEY, L. W.; CULLE, N. J. J. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biotherapy**, v. 4, p. 95-102, 2005.

PARDEE, A. B; LI, Y. Z.; LI, C. J. Cancer therapy with β -lapachone. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, p. 227-242, 2002.

PESSOA-ANTUNES, R. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CÂMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; RAMALHO CATÃO, R. M.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SARMENTO SILVA, T. M. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 517-524, 2006.

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

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

PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5416-5424, 2000.

PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W. G.; VARNES, M. E.; BOOT, D. A. β -Lapachone-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, v. 267, p. 95-106, 2001.

REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMANN, W. G.;

SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Development of β -Lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 levels. **Cancer Therapy: Preclinical**, v. 11, p. 3055-3064, 2005.

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

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 1-17, 2001.

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

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

SCHAFFNER-SABBA, K.; SCHMIDT-RUPPIN, K. H.; WEHRLI, W.; SCHUERCH, A. R.; WASLEYL, J. W. F. β -Lapachone: synthesis of serivatives and scivities in tumor models. **Journal of Medical Chemistry**, v. 27, p. 990-994, 1984.

SCHUERCH, A.R.; WEHRLI, W. β -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase- α . **Journal of Biochemistry**, v. 84, p. 197-205, 1978.

SCOPUSTM. Disponível em: <<http://www.scopus.com/home.url>>. Acesso em: 01 de Novembro de 2009.

SIEGEL, D.; ROSS D. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 246-253, 2000.

SILVA-JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- β -lapachone and nor- α -lapachone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7035-7041, 2007.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SOUSA, F. B.; DENADAI, A. M.; LULA, L. I. S.; NASCIMENTO-JUNIOR, C. S.; FERNADES-NETO, N. S. G.; LIMA, A. C.; ALMEIDA, W. B.; SINISTERRA, R. D. Supramolecular self-assembly of cyclodextrin and higher water soluble guest: thermodynamics and topological. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 8426-8436, 2008.

SUZUKI, M.; AMANO, M.; CHOI, J.; PARK, H. J.; WILLIAMS, B. W.; ONOB, K.; SONGA, C. W. Synergistic effects of radiation and b-lapachone in du-145 human prostate cancer cells in vitro. **Radiation Research**, v.165, p.525-531, 2006.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**. v. 98, p. 1743-1753, 1998.

TEIXEIRA, L. R.; SINISTERRA, R. D.; VIEIRA, R. P.; DORETTO, M. C.; BERALDO, H. Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into β -cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 47, p. 77-82, 2003.

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

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

UZIELY, B.; JEFFERS, S.; ISACSON, R.; KUTSCH, K.; WEI-TSAO, D.; YEHOOSHUA, Z.; LIBSON, E.; MUGGIA, F. M.; GABIZON, A. Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, p. 1777-85, 1995.

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAGB, J. C. M.; DIJKSTRAB, B. W.; DIJKHUIZENET, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336-360, 2000.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. Ciclodextrinas e seus complexos de inclusão. In: **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, v. 1, p. 11-19, 2006a.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. Formação de detecção dos complexos de inclusão. In: **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, v. 1, p. 41-42, 2006b.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. Formação de detecção dos complexos de inclusão. In: **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, v. 1, p. 52-86, 2006c.

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

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.

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

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

WHITACRE, C. M.; ZBOROWSKA, E.; GORDON, N. H.; MACKAY, W.; BERGER, N. A. Topotecan increases topoisomerase ii levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process. **Cancer Research**, v. 57, p. 1425-1428, 1997.

WOO, H. J.; CHOI, Y. H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β -lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **International Journal of Oncology**, v. 26, p. 1017-1023, 2005.

WOODLE M. C.; STORM G. Long-circulating liposomes: Old Drugs New Therapeutics. **Landes Bioscience, Georgetown, TX**, p. 1-206, 1998.

ZHANG, X.; WU, Z.; GAO, X.; SHU, S.; ZHANG, H.; WANG, Z.; LI, C. Chitosan bearing pendant cyclodextrin as a carrier for controlled protein release. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 394-401, 2009.

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

9.0 – ANEXOS

9.1 – ANEXO A

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

Resumos apresentados em congressos nacionais:

- Complexos de inclusão de β -lapachona em hidroxipropil- β -ciclodextrina: preparação e caracterização. 1º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, Dezembro de 2009, Recife, Pernambuco, meio digital.
- Spectrophotometric method applied to β -lapachone in hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. II Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental, V Jornada científica do LIKA e II Fórum brasileiro de genética em neuropsiquiatria, Novembro de 2009, Recife, Pernambuco, meio digital.
- Enhancement the solubility of Beta-lapachone by cyclodextrin inclusion complex: a characterization study. 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Novembro de 2008, Porto de Galinhas, Pernambuco, meio digital.
- Characterization of liposomes containing inclusion complex of β -lapachone with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. I Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental e IV Jornada Científica do LIKA, Recife, Pernambuco, Novembro de 2008, meio digital.
- Nanocapsules containing β -lapachone: A Factorial Design Study. I Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental e IV Jornada Científica do LIKA, Recife, Pernambuco, Novembro de 2008, meio digital.
- Preparation, characterization and *in vitro* kinetic profile of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing β -lapachone. I Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental e IV Jornada Científica do LIKA, Recife, Pernambuco, Novembro de 2008, meio digital.

Resumos apresentados em congressos internacionais:

- Validation of a UV-spectrophotometric method for determining β -lapachone applied to β -lapachone:hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. 7^o International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, São Paulo, Setembro de 2009, pg. 99.
- Physicochemical characterization of β -lapachone:HP- β -cyclodextrin inclusion complex and encapsulation into liposomes. 2nd PharmSciFair, Nice, França, Junho de 2009, pg. 154-155.
- Liposomes with beta-lapachone and beta-lapachone:hydroxiopropil-beta-cyclodextrin inclusion complex: enhancement of solubility and release kinetics. Meeting on Nanotechnology, Liposome and Health, Itaparica, Bahia, Abril de 2009, pg. 48.
- Caracterização de lipossomas contendo β -lapachona e complexos de inclusão β -lap-2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. XII Congresso da Federação Farmacêutica Sul-americana (FEFAS), Uruguai, Novembro de 2008, pg. 176.

9.2 – ANEXO B

NORMAS DA REVISTA (International Journal of Pharmaceutics)



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>

INTERNATIONAL JOURNAL OF
PHARMACEUTICS

Guide for Authors

Scope of the journal

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

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

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

Editorial Policy

The over-riding criteria for publication are originality, high scientific quality and interest to a multidisciplinary audience. Papers not sufficiently substantiated by experimental detail will not be published. Any technical queries will be referred back to the author, although the Editors reserve the right to make alterations in the text without altering the technical content. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a

copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the manuscript shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher.

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

Submission of Manuscripts

Authors are strongly encouraged to submit their manuscript electronically by using the Elsevier submission site at (<http://www.elsevier.com/journals>)

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

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

found at: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. When the paper is to be published as a Rapid Communication, this should be clearly indicated to the Editor-in-Chief.

Europe, Africa, Near East

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

The Americas, Australia and New Zealand

Professor D.J. Burgess, University of Connecticut, School of Pharmacy, Room 432, 69 North Eagleville Road, Unit 3092, CT 06269-3092, Storrs, USA, Fax.: +1 860 486-2076; E-mail: d.burgess@uconn.edu

Japan and Far East

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

Manuscript Types

(1) Full Length Manuscripts

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

(a) Title

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

(b) List of Authors

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

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

(d) *Abstract*

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

(e) *Keywords*

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

(f) *Corresponding Author*

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

(g) *Text*

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

(h) *Nomenclature*

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

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

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

(j) *References*

See below for full details.

(2) **Rapid Communications**

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

(3) **Notes**

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

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

(4) **Reviews and Mini-Reviews**

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

References

(a) *Text citation*

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

Examples of text citations:

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

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

(b) Reference list

All references cited in the text should be listed at the end of the paper (typed with double spacing) and assembled alphabetically. More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a b c, etc. placed after the year of publication.

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

Example of arrangement in the reference list:

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

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

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

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

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

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

Examples of presentation for various types of publication:

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

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

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

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

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

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

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

(b) Use of Digital Object Identifier (DOI)

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

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

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

Figures and Tables

Figures

Line drawings (including graphs) should be drawn in black ink on white paper or on tracing paper with blue or faint grey rulings; graduation will not be reproduced.

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

Colour illustrations should be submitted as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are *not* suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, **at no additional charge**, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. The 2008 price for color figures is EUR 285 for the first page and EUR 191 for subsequent pages. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Tables

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

DNA sequences and GenBank Accession numbers.

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Copyright guidelines for authors

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

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Authors' rights

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

Proofs, Offprints and Page Charges

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

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Page Charges

There are no page charges.

Language Services.

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

Funding body agreements and policies

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

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/ijpharm>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

No responsibility is assumed by the Publisher for any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of the rapid advances made in the medical sciences, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.